

Universitat de Lleida

Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata

Néstor Alfredo Alor Romero

Dipòsit Legal: L.229-2015

<http://hdl.handle.net/10803/286188>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Tesis Doctoral

Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata

Néstor Alfredo Alor Romero

Lleida, 2015



Universitat de Lleida



Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata

Tesis presentada por:

Néstor Alfredo Alor Romero

Para obtener el Grado de Doctor
por la Universidad de Lleida.

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Producción y Protección Vegetal de Neiker – Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario.

Bajo la dirección:

Dr. José Ignacio Ruíz de Galarreta Gómez.

Departamento de Producción y Protección Vegetal, Neiker – Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario.

Tutor:

Dra. Francisca Santiveri Morata.

Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal de la Universidad de Lleida.



UNIVERSITAT DE LLEIDA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

Memoria presentada por **Néstor Alfredo Alor Romero**,
Ingeniero Agrónomo, para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Lleida.

El Doctorando

Néstor Alfredo Alor Romero

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Dr. JOSÉ IGNACIO RUÍZ DE GALARRETA GÓMEZ, Investigador Principal
del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Neiker -Tecnalia.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata**" ha sido realizada por el Ingeniero Agrónomo D. Néstor Alfredo Alor Romero, en el Departamento de Producción y Protección Vegetal, del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Neiker – Tecnalia, bajo mi Dirección y reúne, a mi juicio las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor.

Vitoria, 18 de Noviembre de 2014



Fdo. José Ignacio Ruiz de Galarreta Gómez



Universitat de Lleida
Departament de Producció
Vegetal i Ciència Forestal

Av. Alcalde Rovira Roure, 191
E 25198 LLEIDA (Catalunya)
Tel. +34 973 70 25 24
Fax +34 973 70 26 90
secretaria@pvcf.udl.cat
<http://www.etsea.udl.cat/dept/pvcf/>

Francisca Santiveri Morata, professora titular d'universitat del Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal de la Universitat de Lleida,

INFORMO:

Que la Tesi Doctoral titulada "Caracterización de Phytophthora infestans y mejora genética para la resistencia en patata", de la qual és autor el senyor Néstor Alfredo Alor Romero i dirigida pel Dr. José Ignacio Ruiz de Galarreta, ha estat realitzada sota la meva tutoria.

Que en aquesta tesi s'ha obtingut informació suficient per considerar els objectius proposats coberts i considero que reuneix les condicions exigides en la legislació vigent per procedir a la seva exposició i defensa pública per tal d'optar al títol de doctor.

Lleida, 18 de noviembre de 2014

Francisca Santiveri

Agradecimientos

Primeramente deseo agradecer especialmente a Dios por ser fuente de motivación en los momentos difíciles de mi vida, pero con su gran ayuda y con su luz divina me guio para no desmayar por este camino que hoy veo realizado.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Fundación Cándido Iturriaga y Maria de Doñabeitia, por la concesión de la beca predoctoral, que me ha permitido realizar mi formación académica. También agradezco a Neiker-Tecnalia al poner a mi disposición de las instalaciones y equipamientos que han hecho posible la realización de la parte experimental de esta Tesis Doctoral.

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Francisca Santiveri Morata, Profesora Titular del Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal de la Universitat de Lleida por aceptar ser la Tutora de esta Tesis, también al Dr. José Ignacio Ruíz de Galarreta Gómez, Director de Tesis; al cual debo gratitud y estimación personal, agradezco el haber depositado su confianza en mi persona, por su orientación y colaboración; antes, durante y después de la realización de mi trabajo de Tesis.

También deseo expresar un agradecimiento especial a MSc. Raquel Marquínez y a la Dra. Ana Díez, por sus palabras de aliento en cada momento y por compartir conmigo los “pequeños descubrimientos del mildiu en España”.

A Begoña, que con sus conocimientos, experiencia y paciencia me brindó su apoyo, siendo una parte importante en mi aprendizaje en lo relacionado al mildiu, a quien estoy muy agradecido. Como olvidar a mi amigo Alex por su colaboración y apoyo en la portada de esta tesis. También agradezco a mis queridas amigas Isi y Emma, que con su experiencia en el tema molecular fueron muy importantes en este trabajo; nunca olvidare los “haplotipos mitocondriales”.

A Yoli, gracias por tus ánimos, tu paciencia, tu comprensión, por compartir momentos inolvidables plasmados en esta tesis.

A Cristina, mi gran amiga que aprecio mucho, gracias por tus consejos, echaré de menos nuestras conversaciones en el pequeño coche rojo. A mis amigos Carlos C., Carlos H. y Roberto, personas que me brindaron su experiencia y confianza; que me permitieron entrar en sus vidas durante todo este tiempo y convivir con ellos dentro y fuera del horario de trabajo.

Definitivamente este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me brindaron su ayuda, siempre resultará difícil agradecer a todos aquellos que de una u otra manera me han acompañado en este camino para el desarrollo de mi formación profesional. Gracias a Todos...Eskerrik asko!!

Dedicatoria

A mi Familia, a la que quiero mucho, a mi madre Zoraida Romero, por ser el mejor ejemplo de amor y por su apoyo incondicional a través de la distancia, a mis hermanos Isabel, Cristian, Ivone, Pilar y en especial a Piero, agradecerte por tu gran apoyo incondicional durante mi formación académica en la universidad.

A mis Tíos, Eliana Silva y Edilberto Romero, por quienes siento un cariño y aprecio especial, agradecerles de todo corazón su confianza, orientación y consejos, el cual ha sido muy importante para mi formación personal y profesional. ¡¡Muchas gracias!!

RESUM

L'Oomicet *Phytophthora infestans* és el principal patògen de la patata, el qual ha ocasionat grans pèrdues en la producció d'aquest cultiu i ha constituït una amenaça per a la seguretat alimentària. Recentment a Europa s'han descrit noves varietats més agressives, relacionades amb el tipus d'aparellament A2, que sembla ser més complex i podria estar desplaçant al tipus d'aparellament original A1. En aquest context es va realitzar una prospecció a nivell nacional, a les principals zones productores de la patata a Espanya, obtenint un total de 52 aïllats procedents de les províncies d'Àlava, Cádiz, Córdoba, Ciudad Real, Jaén, Orense, Tenerife y Sevilla. Mitjançant tècniques moleculars s'ha identificat, per primer cop a Espanya, l'existència d'ambdós tipus d'aparellament, amb valors del 44,2% i 55,8%, respectivament.

D'altra banda, es va estudiar l'estructura genètica del patògen mitjançant haplotips mitocondrials (mtDNA), apareixent com a predominants el tipus Ia, associats als llinatges clonals US-7 i US-8. Es va realitzar el genotipat amb 12 marcadors microsatèl·lits (SSR) identificant 12 genotips, essent el majoritari el 2_A1, seguit per la variant Blue 13 (13_A2), caracteritzant-se per la seva gran virulència i agressivitat, a més de la seva resistència al Metalaxyl.

Tanmateix, es va evidenciar la presència de dos aïllats anomenats 'Misc', els quals no coincideixen amb cap dels descrits fins ara a Europa, pel que es podria tractar d'una varietat originada a partir de la recombinació sexual. De l'estudi de l'espectre de virulència en cultius diferencials de *S. demissum*, s'han identificat 17 varietats fisiològiques, sent un grup d'aïllat procedents de Cádiz, la més complexa amb 11 gens de virulència. També es va avaluar la resistència a fungicides, trobant-se en la matèria activa Ciazofamida la que va controlar els quatre aïllats provats amb totes les dosis aplicades. Referent a la identificació de les fonts de resistència, les espècies silvestres *Solanum bulbocastanum*, *S. caripense* y *S. fraxinifolium*, van resultar resistents a la inoculació amb la varietat més complexa.

S'ha iniciat un programa de millora genètica mitjançant encreuaments dirigits amb les espècies silvestres i aquells híbrids somàtics que mostraren resistència. De la selecció realitzada s'han obtingut fins ara 33 clons de 2ⁿ any, alguns d'ells amb bones caràcters agronòmics i resistents a *P. infestans*. Els resultats presentats en aquest treball poden constituir l'inici de futurs estudis de prospecció d'un major nombre d'aïllats, per tal d'aprofundir en la genètica de resistència i continuar amb el procés de selecció en programes de millora per fer front a aquest patògen.

RESUMEN

El Oomiceto *Phytophthora infestans* es el principal patógeno de la patata, el cual ocasiona grandes pérdidas en la producción de este cultivo, constituyendo una amenaza en la seguridad alimentaria. Recientemente en Europa se han descrito nuevas razas más agresivas, relacionadas con el tipo de apareamiento A2, el cual parece ser más complejo y podría estar desplazando al tipo de apareamiento original A1. Bajo este contexto se realizó una prospección en las principales zonas productoras de patata en España, obteniendo un total de 52 aislados procedentes de las provincias de Álava, Cádiz, Córdoba, Ciudad Real, Jaén, Orense, Tenerife y Sevilla. Mediante técnicas moleculares se ha identificado por primera vez en España, la existencia de ambos tipos de apareamiento con valores de 44,2% y 55,8%, respectivamente.

Por otro lado, se estudió la estructura genética del patógeno mediante haplotipos mitocondriales (mtDNA), apareciendo como predominante el tipo Ia, asociado a los linajes clonales US-7 y US-8. Se realizó el genotipado con 12 marcadores microsatélites (SSR) identificando 12 genotipos, siendo mayoritario el 2_A1, seguido de las variantes del Blue 13 (13_A2), caracterizándose por ser muy virulenta y agresiva, además de mostrar resistencia al Metalaxyl.

Asimismo, se evidenció la presencia de dos aislados denominados 'Misc', los cuales no coinciden con lo descrito hasta la fecha en Europa, por lo que podría constituir una variante originada mediante recombinación sexual. Del estudio del espectro de virulencia con cultivares diferenciales de *S. demissum*, se han identificado 17 razas fisiológicas, siendo un grupo de aislados procedentes de Cádiz, la raza más compleja con 11 genes de virulencia. También se ha evaluado la resistencia a fungicidas encontrándose a la materia activa Ciazofamida la que controló a los cuatro aislados probados con todas las dosis aplicadas. En cuanto a la identificación de fuentes de resistencia, las especies silvestres *Solanum bulbocastanum*, *S. caripense* y *S. fraxinifolium*, resultaron resistentes frente a la inoculación con la raza más compleja.

Se ha iniciado un programa de mejora genética mediante cruzamientos dirigidos con las especies silvestres e híbridos somáticos que mostraron resistencia. De la selección realizada se han obtenido hasta la fecha 33 clones de 2º año, algunos de ellos con buenos caracteres agronómicos y resistentes a *P. infestans*. Los resultados presentados en este trabajo pueden constituir, el inicio de futuros estudios de prospección de un mayor número de aislados para profundizar en el conocimiento de la genética de resistencia y poder continuar con el proceso de selección en programas de mejora frente a este patógeno.

ABSTRACT

Phytophthora infestans is an Oomycete, causes big losses in the production of potato therefore it's one of the main pathogen for this crop, threatening to food security. Recently new races have been described in Europe. They are more aggressive races related to the A2 mating type which seems to be more complex and may be displacing the original mating type A1.

For this reason a prospecting was conducted in the major producing areas of Spain. It obtained 52 isolates from Alava, Cadiz, Cordoba, Ciudad Real, Jaen, Orense, Tenerife and Sevilla. Molecular techniques have been identified for the first time in Spain, the existence of both mating types with values of 44,2% and 55,8% respectively.

Furthermore, the genetic structure of the pathogen was studied by mitochondrial haplotypes (mtDNA). The types Ia, associated with clonal lineages US-7 and US-8, show as predominant. 12 genotypes were identified using 12 microsatellite (SSR), which were identified 2_A1 and the variant of Blue 13 (13_A2). This genotype is characterized by a high virulence and aggressiveness in addition to its resistance to Metalaxyl. Also two isolated 'Misc' were identified, which does not reach with description to date in Europe. This could be a variant originated by sexual recombination.

The virulence spectrum study with differential cultivars of *S. demissum* identified 17 physiological races, being a group of isolates from Cadiz, the most complex of all with 11 virulence genes. The resistance of fungicide was also evaluated. The active ingredient Cyazofamid controlled the 4 isolated tested with all doses applied.

The identification of sources of resistance displayed that *Solanum bulbocastanum*, *S. caripense* y *S. fraxinifolium* wild species were resistant to inoculation against more complex race.

A breeding program started with controlled crosses with wild species and resistant somatic hybrids. To date 33 second year clones have been obtained, some with desirable traits and resistant to *P. infestans*. The results of this work could be the start of future prospective studies of a large number of isolates to deepen the understanding of the genetics of resistance and to continue with the breeding programs against this pathogen.

ÍNDICE GENERAL
CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA PATATA	3
1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	4
1.3. TAXONOMÍA Y BOTÁNICA.....	7
1.4. IMPORTANCIA DEL MILDIU EN LA PRODUCCIÓN	8
1.5. EVOLUCIÓN Y BIOLOGÍA DE <i>P. infestans</i>	10
1.5.1. Clasificación taxonómica.....	10
1.5.2. Ciclo biológico.....	11
1.5.2.1. Ciclo asexual	13
1.5.2.2. Ciclo sexual	14
1.6. LA ENFERMEDAD: MILDIU O TIZÓN TARDÍO.....	16
1.6.1. Epidemiología	16
1.6.2. Sintomatología	17

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS	21
---------------------------	-----------

CAPÍTULO 3

3. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE <i>P. infestans</i>	25
3.1. INTRODUCCIÓN	27
3.1.1. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO.....	27
3.1.2. HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES.....	28
3.1.3. MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR).....	28
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	30

3.2.1.1. Aislados de <i>P. infestans</i>	30
3.2.1.2. Cepas de referencia.....	31
3.2.1.3. Cultivo y mantenimiento de los aislados.....	31
3.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO	33
3.2.2.1. Tipo de apareamiento mediante cruzamiento <i>in vitro</i>	33
3.2.2.2. Tipo de apareamiento mediante técnicas moleculares	33
3.2.2.2.1. Extracción y cuantificación del ADN.....	33
3.2.2.2.2. Amplificación del ADN	34
3.2.3. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS AISLADOS	39
3.2.3.1. Determinación de haplotipos mitocondriales (mtDNA)	39
3.2.3.2. Genotipado con marcadores microsatélites (SSR).....	42
3.2.3.3. Reacción de PCR multiplex.....	42
3.2.3.4. Análisis de datos.....	44
3.3. RESULTADOS.....	44
3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.....	44
3.3.1.1. Tipo de apareamiento mediante cruzamiento <i>in vitro</i>	44
3.3.1.2. Tipo de apareamiento mediante técnicas moleculares	45
3.3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS AISLADOS	47
3.3.2.1. Determinación de haplotipos mitocondriales (mtDNA)	47
3.3.2.2. Genotipado con marcadores microsatélites (SSR).....	50
3.4. DISCUSIÓN.....	55
3.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.....	55
3.4.2. ESTRUCTURA GENÉTICA	58
3.4.2.1. Haplotipos mitocondriales.....	58
3.4.2.2. Genotipado con marcadores microsatélites.....	60

CAPITULO 4

4. RAZAS FISIOLÓGICAS Y RESISTENCIA A FUNGICIDAS

SISTÉMICOS.....	63
4.1 INTRODUCCIÓN	65
4.1.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS EN <i>P. infestans</i>	65
4.1.2. CAMBIOS GENÉTICOS EN POBLACIONES DE <i>P. infestans</i>	65
4.1.3. MÉTODOS DE CONTROL	66
4.1.4. RESISTENCIA DE <i>P. infestans</i> A FUNGICIDAS	67
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	68
4.2.1. AISLADOS Y CEPA DE REFERENCIA	68
4.2.2. MICROPROPAGACIÓN DE LAS PLÁNTULAS.....	69
4.2.3. FUNGICIDAS.....	69
4.2.4. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS	70
4.2.4.1. Preparación de los folíolos e inóculo.....	71
4.2.4.2. Inoculación e índices de diversidad	71
4.2.5. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS.....	74
4.3. RESULTADOS.....	76
4.3.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS	76
4.3.2. EVALUACIÓN A FUNGICIDAS MEDIANTE AUDPCrel.....	80
4.4. DISCUSIÓN	85
4.4.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS	85
4.4.2. RESISTENCIA DE LOS AISLADOS A FUNGICIDAS.....	87

CAPITULO 5

5. EVALUACIÓN DE FUENTES DE RESISTENCIA A <i>P. infestans</i>	91
5.1. INTRODUCCIÓN	93

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	94
5.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	94
5.2.2. MATERIAL VEGETAL.....	95
5.2.3. FUENTES DE RESISTENCIA	96
5.2.3.1. Búsqueda de fuentes de resistencia.....	96
5.2.3.2. Evaluación de la resistencia	97
5.2.3.3. Determinación del Índice de la Enfermedad (IE).....	97
5.2.3.4. Análisis estadístico	98
5.3. RESULTADOS.....	98
5.3.1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA	98
5.3.1.1. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad Relativa.....	99
5.3.1.2. Índice de la Enfermedad (IE).....	100
5.4. DISCUSIÓN.....	105

CAPITULO 6

6. MEJORA GENÉTICA PARA LA RESISTENCIA A <i>P. infestans</i>.....	109
6.1. INTRODUCCIÓN	111
6.1.1. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA	111
6.1.2. MÉTODOS DE MEJORA Y CRITERIOS DE SELECCIÓN	112
6.1.3. INCORPORACIÓN DE LA RESISTENCIA A <i>P. infestans</i>	115
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	118
6.2.1. CRUZAMIENTOS Y PLÁNTULAS.....	118
6.2.2. CLONES DE PRIMER AÑO	121

6.3. RESULTADOS	122
6.3.1. CRUZAMIENTOS Y OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS.....	122
6.3.2. CLONES DE PRIMER AÑO	124
6.4. DISCUSIÓN	125
CAPITULO 7	
7. CONCLUSIONES	129
CAPITULO 8	
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Superficie, rendimiento y producción de patata en España (MAGRAMA, 2012).....	6
Tabla 1.2.	Taxonomía de las especies silvestres y cultivadas de patata (Hawkes, 1994).....	9
Tabla 1.3.	Clasificación taxonómica de <i>P. infestans</i> (Raven <i>et al.</i> , 1999; Evert y Eichhorn, 1999; Erwin y Ribeiro, 1996).....	12
Tabla 3.1.	Cepas de referencia utilizadas para cada tipo de apareamiento	31
Tabla 3.2.	Identificación y procedencia de los aislados	32
Tabla 3.3.	Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR específica para el tipo sexual <i>A1</i>	35
Tabla 3.4.	Reactivos y condiciones de amplificación para la PCR específica del tipo de apareamiento <i>A1</i>	36
Tabla 3.5.	Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR específica para el tipo sexual <i>A2</i>	36
Tabla 3.6.	Reactivos y condiciones de amplificación para la PCR específica del tipo de apareamiento <i>A2</i>	37
Tabla 3.7.	Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR para marcadores CAPS.....	37
Tabla 3.8.	Reactivos y condiciones de amplificación para la PCR para marcadores CAPS.....	38
Tabla 3.9.	Reactivos y condiciones de la digestión del producto de PCR para marcadores CAPS.....	38
Tabla 3.10.	Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR para la determinación de los haplotipos mitocondriales	39
Tabla 3.11.	Reactivos y condiciones de amplificación de la PCR para los cebadores P1, P2 y P4.....	40
Tabla 3.12.	Reactivos y condiciones de amplificación de la PCR para el cebador P3.....	40
Tabla 3.13.	Reactivos y condiciones para la digestión del producto de PCR con <i>CfoI</i>	41

Tabla 3.14.	Reactivos y condiciones para la digestión del producto de PCR con <i>MspI</i>	41
Tabla 3.15.	Reactivos y condiciones para la digestión del producto de PCR con <i>EcoRI</i>	41
Tabla 3.16.	Tamaños de los fragmentos generados tras la digestión de los cuatro productos de PCR.....	42
Tabla 3.17.	Cebadores SSR y concentración final empleada en la PCR multiplex.....	43
Tabla 3.18.	Identificación del tipo de apareamiento del conjunto de los aislados.....	48
Tabla 3.19.	Polimorfismos detectados con marcadores microsatélites (SSR).....	50
Tabla 3.20.	Numero de alelos y genotipos identificados mediante el análisis con SSRs.....	54
Tabla 4.1.	Aislados de <i>P. infestans</i> utilizados en la evaluación de resistencia a fungicidas.....	68
Tabla 4.2.	Características de la cepa MP-324.....	68
Tabla 4.3.	Composición del medio MS utilizado en la micropropagación.....	69
Tabla 4.4.	Dosis de fungicidas utilizados en el estudio.....	74
Tabla 4.5.	Compatibilidad e incompatibilidad de los aislados con los genes <i>R</i>	77
Tabla 4.6.	Razas fisiológicas de los aislados de <i>P. infestans</i> evaluados.....	78
Tabla 4.7.	Frecuencia de los factores de virulencia en las zonas geográficas prospectadas.....	78
Tabla 4.8.	Razas identificadas e índices de diversidad.....	80
Tabla 5.1.	Especies silvestres evaluados a <i>P. infestans</i>	96
Tabla 5.2.	Híbridos somáticos evaluados a <i>P. infestans</i>	97
Tabla 5.3.	Criterios utilizados para la evaluación del área foliar necrosada y el grado de esporulación.....	98
Tabla 5.4.	ANOVA para el AUDPCrel en 24 especies silvestres y 17 híbridos somáticos.....	99

Tabla 5.5.	ANOVA para el área foliar necrosada.....	100
Tabla 5.6.	Medias del área foliar necrosada en el conjunto de genotipos evaluados	102
Tabla 5.7.	ANOVA para el grado de esporulación	103
Tabla 5.8.	Medias del grado de esporulación en los genotipos evaluados	104
Tabla 6.1.	Especies silvestres seleccionados resistentes a mildiu.....	119
Tabla 6.2.	Híbridos somáticos seleccionados resistentes a mildiu.....	119
Tabla 6.3.	Clones (2x) de <i>S. tuberosum</i> utilizados como progenitores.....	119
Tabla 6.4.	Variedades de <i>S. tuberosum</i> (4x) empleadas como genitores.....	120
Tabla 6.5.	Cruzamientos, bayas y semillas obtenidas	122
Tabla 6.6.	Clones de primer año (CL1) seleccionado	123
Tabla 6.7.	Clones de segundo año (CL2) seleccionado	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Producción mundial de patata por continentes (FAOSTAT, 2013)	5
Figura 1.2.	Morfología de la planta de patata (Huamán, 1986)	8
Figura 1.3.	Relaciones filogenéticas entre los cinco reinos eucariotas (Cavalier-Smith, 1987; Foster <i>et al.</i> , 2000)	12
Figura 1.4.	Microscopía electrónica de una sección de hoja de patata infectada por <i>P. infestans</i> (www.agenciasinc.es).....	13
Figura 1.5.	A: Zoosporas penetrando por los estomas. B: Zoosporas atravesando la epidermis (www.agenciasinc.es).....	14
Figura 1.6.	Ciclo biológico de <i>P. infestans</i> (www.agrofaena.blogspot.com.es)	15
Figura 1.7.	Imagen de microscopía electrónica de una oospora de <i>P. infestans</i> (www.agenciasinc.es).....	15
Figura 1.8.	A: Muerte del foliolo por ataque de <i>P. infestans</i> . B: Lesiones necróticas en el envés, desarrollo de micelio y necrosis	18
Figura 1.9.	Lesiones necróticas en tallo causado por <i>P. infestans</i>	18
Figura 1.10.	Sección transversal de un tubérculo con presencia de necrosis (www.agrofaena.blogspot.com.es)	19
Figura 3.1.	Genoma mitocondrial de <i>P. infestans</i> con la ubicación de los productos de amplificación (P1 a P4). Griffith y Shaw, (1998).....	29
Figura 3.2.	A: Muestras en cámara húmeda. B: Parte de micelio transferido a patata	31
Figura 3.3.	A y B: Apareamiento <i>in vitro</i> de los aislados con las cepas de referencia A1 (MP-324) y A2 (R1-A2).....	34
Figura 3.4.	A: Reacción de compatibilidad entre los dos tipos de apareamiento complementarios. B: Formación de oosporas.....	45
Figura 3.5.	Patrones moleculares identificados con el tipo de apareamiento A1. Fragmentos obtenidos mediante la técnica PCR. M : Marcador de peso molecular. W : Control negativo (agua). C-A1 y C-A2 : Cepas de referencia. Muestras del 1 al 8 : Aislados A1 de <i>P. infestans</i> caracterizados	46

Figura 3.6.	Patrones moleculares identificados con el tipo de apareamiento A2. Fragmentos obtenidos mediante la técnica PCR. M: Marcador de peso molecular. W: Control negativo (agua). C-A1 y C-A2: Cepas de referencia. Muestras 1, 4 y 5: Aislados del tipo A1. Muestras 2, 3, 6, 7 y 8: Aislados del tipo A2 de <i>P. infestans</i> caracterizados	46
Figura 3.7.	Patrones moleculares identificados con los tipos de apareamiento A1 y A2. Fragmentos obtenidos mediante la técnica CAPS. M: Marcador de peso molecular. W: Control negativo (agua). C-A1 y C-A2: Cepas de referencia. Muestras 1 y 4: Aislados del tipo A1. Muestras 2, 3, y 5: Aislados del tipo A2 tras la digestión.....	47
Figura 3.8.	Fragmentos obtenidos mediante la técnica PCR-RFLP. M: Marcador de peso molecular. P1, P2, P3 y P4: Cebadores específicos para cada región mitocondrial. Ia, Ib y IIa: Haplotipos mitocondriales identificados con cada cebador tras la digestión	49
Figura 3.9.	Evolución de los genotipos dominantes en Europa identificados mediante marcadores SSR en el período 2003-2013 (Cooke y Andersson, 2013)	51
Figura 3.10.	Ubicación geográfica de los genotipos de <i>P. infestans</i> presentes en España	52
Figura 3.11.	Porcentajes de genotipos de <i>P. infestans</i> por localidades.....	52
Figura 3.12.	Proporción de los genotipos presentes en los 52 aislados de <i>P. infestans</i>	53
Figura 3.13.	Dendograma obtenido con los 52 aislados de <i>P. infestans</i> recolectados en España utilizando el método de agrupación UPGMA.....	56
Figura 4.1.	A: Cámara Neubauer con las zonas deprimidas. B: Divisiones del cuadro primario (1), secundario (2), y terciario (3)	72
Figura 4.2.	A: Foliolos inoculados. B: Incubación en cámara de crecimiento	72
Figura 4.3.	Frecuencia de los factores de virulencia en el conjunto de los aislados.....	76
Figura 4.4.	Espectro de virulencia de los aislados evaluados	79
Figura 4.5.	Evaluación de la sensibilidad del fungicida Ridomil Gold Mz (Metalaxyl+Mancozeb) a cuatro aislados de <i>P. infestans</i>	81

Figura 4.6.	Evaluación de la sensibilidad del fungicida Curzate 60 WG (Cimoxanilo) a cuatro aislados de <i>P. infestans</i>	82
Figura 4.7.	Evaluación de la sensibilidad del fungicida Galben M (Benalaxil) a cuatro aislados de <i>P. infestans</i>	82
Figura 4.8.	Evaluación de la sensibilidad del fungicida Ranman (Ciazofamida) a cuatro aislados de <i>P. infestans</i>	83
Figura 4.9.	Aislados inoculados en foliolos y tratados con fungicida Ranman.....	83
Figura 4.10.	Representación gráfica de la acción de los fungicidas a cuatro aislados de <i>P. infestans</i>	84
Figura 5.1.	A: Aclimatación de las especies silvestres e híbridos somáticos. B: Trasplante a macetas en invernadero	95
Figura 5.2.	AUDPCrel para las especies silvestres e híbridos somáticos evaluados	100
Figura 5.3.	Área foliar necrosada para ambos aislados.....	101
Figura 5.4.	Grado de esporulación para ambos aislados.....	101
Figura 5.5.	Índice de la enfermedad para las especies silvestres e híbridos somáticos evaluados.....	103
Figura 5.6.	Índice de la enfermedad para ambos aislados	105
Figura 6.1.	Esquema de mejora genética de patata realizada en Neiker-Tecnalia	114
Figura 6.2.	A: Genitores en invernadero. B: Flor emasculada. C: Polinización	120
Figura 6.3.	A: Enmallado de bayas. B: Maduración de las bayas	121
Figura 6.4.	A: Semilleros. B: Plántulas trasplantadas a macetas.....	123
Figura 6.5.	Evaluación en campo de los clones de 1º año	124
Figura 6.6.	A y B: Clones de 2º año seleccionado	125

ABREVIATURAS

AUDPC	: Area Under the Disease-Progress Curve
AUDPCrel	: Area Under the Disease-Progress Curve relative
ADN	: Ácido Desoxirribonucleico
AFLP	: Ampified Fragment Lengh Polymosphism
ARN	: Ácido Ribonucleico
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CIP	: Centro Internacional de la Papa
EBN	: Endosperm Balance Number
FAO	: Organización para la agricultura y la alimentación
FRAC	: Fungicide Resistance Action Commite
Gpi	: Glucosa 6-fosfato isomerasa
g	: Gramos
G. <i>Solanum</i>	: Género <i>Solanum</i>
h	: Hora
IE	: Índice de la enfermedad
ITS	: Regiones espaciadoras transcritas
Kb	: Kilobase
l	: Litros
LSD	: Least Significant Difference
MAGRAMA:	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Mm	: Micrómetros
mM	: Milimolar
mm³	: Milímetros al cubo
min	: Minutos
mil	: Mililitros
nm	: Nanómetro
ng	: Nanogramo

pb	: Pares de bases
PCR	: Polimerase Chain Reaction
Pep	: Peptidasa
<i>P. infestans</i>	: <i>Phytophthora infestans</i>
p/v	: Peso/volumen
QTL	: Quantitative Trait Locus
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphisms
RG57	: Marcador genómico de 1,2 kb de la librería parcial de <i>P. infestans</i>
SSR	: Simple Sequence Repeats
s	: Segundo
subsp.	: Subespecie
TAE	: Tampón Tris-Acetato/EDTA
U/μl	: Unidades por microlitros
μl	: Microlitros
μM	: Micromolar
t/ha	: Toneladas por hectárea
°C	: Grados centígrados

Capítulo 1

Introducción general

1.1. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA PATATA

La patata (*Solanum tuberosum* L.) es una Solanácea que posee, probablemente, más especies silvestres relacionadas que cualquier otro cultivo. A lo largo de toda la cordillera andina, existe una gran variabilidad englobando alrededor de 2.000 especies del género *Solanum* y ocho especies cultivadas. Todas ellas, afines a *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, se distribuyen desde el sureste de Norteamérica, pasando por América Central y del Sur hasta llegar a latitudes más allá de los 50° S (Clausen, 2003). La evolución filogenética y las fuerzas de la selección, migración, mutación, hibridación, poliploidización e introgresión, han contribuido a la divergencia y a explicar el origen de la gran variabilidad genética presente en las especies silvestres y cultivadas (Egúsquiza, 1987).

La patata, alimento básico de América del Sur y descrito como la mayor riqueza del imperio de los incas, fue domesticada hace unos 10.000 años en el altiplano, entre Perú y Bolivia, alrededor del lago Titicaca a 3.800 m sobre el nivel del mar. Es el lugar de la cordillera de los Andes, donde se encuentra la mayor diversidad genética de las especies afines (Engel, 1964).

Según Hawkes (1979) las primeras patatas domesticadas pertenecieron a la especie *S. stenotomum*, la cual se derivó de *S. leptophyes*. A su vez, *S. stenotomum* probablemente se cruzó con *S. sparsipilum*, una especie silvestre diploide, lo que dio lugar a *S. andigena*, precursora de la patata tetraploide actual. La duplicación de los cromosomas pudo originarse por la producción de gametos $2n$ en los genitores originales. Posteriormente, se desarrolló una mayor introgresión por cruzamientos en los cuales intervinieron *S. acaule* y *S. megistacrolobum*, que aportaron genes de resistencia a las heladas, tan necesarios en el altiplano andino, dando origen a una serie de patatas poliploides.

Según Chávez (1995) el origen y evolución de la especie cultivada ha sido estudiado desde la expedición científica de Juzepczuk y Bukasov en América Central y Sudamérica entre 1925 y 1932, mostrando al mundo la inmensa variabilidad genética existente entre Perú y Bolivia. Hawkes (1990) mencionó que la patata tiene su origen en estos dos centros de América del Sur. Una especie de hojas pequeñas y tuberización en días cortos, haciendo referencia a *S. tuberosum* subsp. *andigena*, y otra denominada *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cultivada en el sur de Chile, con hojas anchas y tuberización de día largo.

Por otro lado Ruíz de Galarreta y Ríos (2008) mencionan que el primer registro de la patata a Europa fue a fines del siglo XVI por los conquistadores españoles que regresaban de América. La primera constancia del tubérculo en el viejo continente data de 1565, pero podría haber sido introducida aún antes, sobre 1562 desde las Islas Canarias. Hacia 1573 ya se cultivaba en Sevilla (Ríos et

al., 2007). La patata, posiblemente, llegó hasta Inglaterra hacia 1590, llevada por Drake o Robergh (Hawkes y Ortega, 1992).

La aristocracia europea admiraba las flores y los campesinos creían que el tubérculo era venenoso, siendo los marineros los primeros que apreciaron la patata como alimento, el cual lo llevaban para consumir en sus largos viajes. De esta manera, el tubérculo llegó a Irlanda, India, China y Japón a principios del siglo XVII. Pasaron 150 años hasta la aparición de variedades adaptadas a climas templados de días largos, siendo éstas fundamentales para combatir las hambrunas que devastaban el continente europeo.

Durante la revolución industrial se convirtió en un alimento moderno por sus cualidades energéticas, nutricionales, de fácil preparación y bajo precio. Ya en el siglo XIX ayudó a reducir el escorbuto y sarampión, contribuyendo a la explosión demográfica en Europa, Estados Unidos y Reino Unido. Sin embargo, la presencia de una nueva enfermedad, denominada mildiu o tizón tardío, causó la muerte de más de un millón de personas en Irlanda, produciéndose un gran éxodo y conduciendo años más tarde, al inicio del desarrollo de variedades resistentes a las principales enfermedades que afectaban al cultivo (FAO, 2008).

1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

A diferencia del arroz, el trigo y el maíz, la patata no participa en el comercio mundial y sus precios por lo general se determinan a través de la oferta y la demanda local. Un estudio de la FAO en más de 70 de los países más vulnerables del mundo, revela que la inflación de los precios de la patata es muy inferior respecto al de los cereales. Por lo tanto, es un cultivo muy recomendado para la seguridad alimentaria, que puede ayudar a los países de bajos ingresos a compensar los problemas causados por el aumento de los precios de los alimentos (FAO, 2008). El Centro Internacional de la Papa (CIP), menciona que la patata es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo después del arroz y el trigo, en términos de consumo humano.

Económicamente, la patata ocupa el cuarto lugar a nivel mundial, representando más de 6.000 millones de dólares anuales en el comercio mundial. El tubérculo contiene en torno al 80% de agua y un 20% de materia seca, además de una importante cantidad de vitaminas como la C, B1, B3 y B6, y minerales como K, P y Mg.

Durante la mayor parte del siglo XX Europa fue el primer productor mundial, lugar que ahora ocupa a Asia (Figura 1.1). No obstante, actualmente

siete países europeos están entre los primeros 10 productores. También debemos destacar que Europa posee el mayor consumo del mundo con 90 kg por persona y año. La producción de patata en los países más desarrollados, ha disminuido en promedio un 1% anual en los últimos 20 años.

Sin embargo, la producción en los que están en vías de desarrollo se ha incrementado en un 5%, siendo China e India, los impulsores de este crecimiento (FAOSTAT, 2013). En Europa, los mayores productores son Alemania con 10.201.900 t y una superficie de 255.200 ha, teniendo un rendimiento de 39,9 t/ha, seguido de Holanda con 6.843,53 t y 156.969 ha, alcanzando un rendimiento medio de 43,5 t/ha. Por su parte Reino Unido produce 6.045.000 t con una superficie de 138.000 ha y rendimiento de 43,8 t/ha, seguida de Francia con 6.582.190 t, superficie de 165.576 ha y un rendimiento medio de 39,7 t/ha.

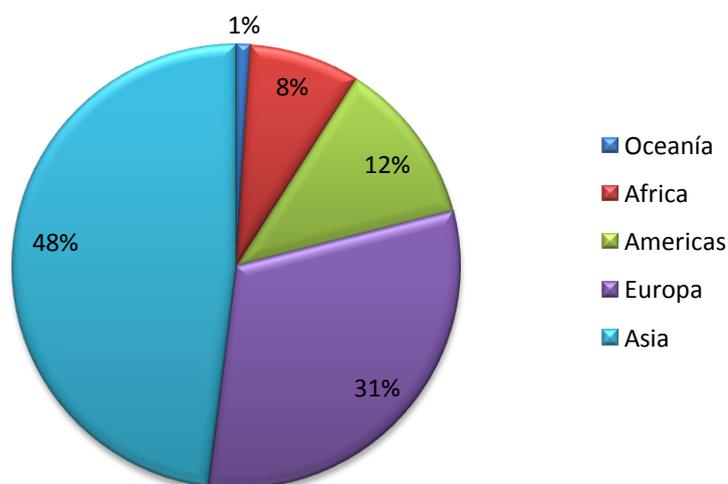


Figura 1.1. Producción mundial de patata por continentes (FAOSTAT, 2013).

La producción en España en el 2012 alcanzó 2.192,284 t, con una superficie de 72.023 ha y un rendimiento de 34 t/ha.

Castilla y León es la principal comunidad autónoma con 841.065 t y 19.888 ha, seguida de Galicia con 473.498 t y 19.667 ha y Andalucía con 311.863 t y 11.757 ha cultivadas.

Le siguen en orden decreciente La Rioja, Castilla la Mancha y Murcia entre otras (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Superficie, rendimiento y producción de patata en España (MAGRAMA 2012).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			Rendimiento (Kg/ha)		Producción (toneladas)
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	
A Coruña	5.802	301	6.103	20.386	20.619	124.486
Lugo	4.283	18	4.301	20.513	20.940	88.234
Ourense	2.711	3.689	6.400	23.884	38.240	205.817
Pontevedra	2.756	107	2.863	19.269	17.343	54.961
GALICIA	15.552	4.115	19.667	20.833	36.332	473.498
P. DE ASTURIAS	1.100	-	1.100	22.000	-	24.200
CANTABRIA	179	-	179	6.458	-	1.156
Álava	25	1.285	1.310	17.920	29.050	37.777
Guipúzcoa	135	-	135	20.585	-	2.779
Vizcaya	215	-	215	22.321	-	4.799
PAÍS VASCO	375	1.285	1.660	21.403	29.050	45.355
NAVARRA	286	330	616	15.599	34.491	15.843
LA RIOJA	-	1.756	1.756	-	46.778	82.142
Huesca	-	15	15	-	30.000	450
Teruel	66	146	212	8.000	23.470	3.955
Zaragoza	-	80	80	-	25.000	2.000
ARAGÓN	66	241	307	8.000	24.384	6.405
Barcelona	123	323	446	17.344	20.061	8.613
Girona	87	178	265	17.690	29.517	6.793
Lleida	141	152	293	14.200	22.030	5.351
Tarragona	-	356	356	-	20.011	7.124
CATALUÑA	351	1.009	1.360	16.167	22.008	27.881
BALEARES	-	1.386	1.386	-	37.875	52.495
Ávila	-	1.006	1.006	-	52.887	53.205
Burgos	27	2.666	2.693	18.050	35.676	95.600
León	-	1.900	1.900	-	41.197	78.275
Palencia	29	921	950	32.000	32.227	30.609
Salamanca	15	4.385	4.400	20.000	43.221	189.825
Segovia	42	1.958	2.000	20.000	38.387	76.001
Soria	-	507	507	-	40.000	20.280
Valladolid	-	5.505	5.505	-	46.183	254.240
Zamora	35	892	927	14.143	47.685	43.030
CASTILLA Y LEÓN	148	19.740	19.888	20.611	42.452	841.065
MADRID	-	65	65	-	31.708	2.061
Albacete	-	1.100	1.100	-	30.218	33.240
Ciudad Real	-	850	850	-	28.700	24.395
Cuenca	48	116	164	3.541	22.500	2.780
Guadalajara	-	168	168	-	24.000	4.032
Toledo	-	658	658	-	26.568	17.482
CASTILLA-LA MANCHA	48	2.892	2.940	3.541	28.271	81.929
Alicante	-	569	569	-	26.764	15.229
Castellón	306	427	733	6.971	23.667	12.239
Valencia	9	544	553	7.000	35.656	19.460
C. VALENCIANA	315	1.540	1.855	6.972	29.046	46.928
R. DE MURCIA	-	2.364	2.364	-	33.353	78.846
Badajoz	-	614	614	-	37.483	23.015
Cáceres	-	442	442	-	35.227	15.570
EXTREMADURA	-	1.056	1.056	-	36.539	38.585
Almería	-	445	445	-	23.004	10.237
Cádiz	-	2.405	2.405	-	25.749	61.927
Córdoba	9	690	699	-	38.261	26.400
Granada	2	972	974	4.000	24.351	23.677
Huelva	232	351	583	-	-	12.075
Jaén	10	338	348	9.000	23.248	7.948
Málaga	65	1.760	1.825	-	-	43.833
Sevilla	261	4.217	4.478	5.712	29.470	125.766
ANDALUCÍA	579	11.178	11.757	2.744	22.756	311.863
Las Palmas	162	954	1.116	13.148	27.626	28.485
S.C. de Tenerife	1.469	1.483	2.951	4.132	18.532	33.547
CANARIAS	1.631	2.437	4.067	5.028	22.092	62.032
ESPAÑA	20.630	51.394	72.023	18.577	34.112	2.192.284

1.3. TAXONOMÍA Y BOTÁNICA

La patata, posee un número básico de cromosomas $x=12$. Es una especie poliploide que varía desde $2n=24, 36, 48, 60$ y 72 cromosomas, cuya evolución parece que se realizó a nivel diploide (Ross 1986, Hawkes 1990).

Entre las especies cultivadas destaca *S. tuberosum* ($2n=4x=48$) que cubre el 98% de la superficie global del cultivo con sus dos subespecies, *tuberosum* y *andígena*. La primera está adaptada a latitudes de 25° a 50° S ó N y fotoperíodo largo, y la segunda entre 0° a 20° S ó N, de día corto.

En la Tabla 1.2 se muestra la clasificación taxonómica de las principales especies silvestres y cultivadas de patata.

La especie *S. tuberosum* se diferencia de otras especies de la misma serie taxonómica por presentar articulación del pedicelo en el tercio medio y los lóbulos del cáliz corto y dispuesto de modo regular. Posee estolones o tallos laterales que crecen horizontalmente y es ahí donde se inicia el llenado del tubérculo, en la parte apical del mismo (Figura 1.2).

La reproducción vegetativa se realiza a través de los tubérculos, brotes o yemas, dando lugar a clones genéticamente idénticos a la planta original. De esta forma se pueden obtener fácilmente copias idénticas de los genotipos seleccionados, lo cual es una gran ventaja para los mejoradores. Otra utilización práctica de la propagación asexual es el cultivo de tejidos y de meristemos, cuya finalidad está relacionada con la eliminación de algunos de los principales patógenos del cultivo (Orillo y Bonierbale, 2009).

Por otra parte, la reproducción sexual permite que el material genético de dos individuos se recombinen y formen nuevas estructuras alélicas. Este proceso requiere de la polinización de los órganos reproductores femeninos o pistilos por los masculinos o anteras, formando las bayas con un número variable de semillas. Cada una de éstas constituye un nuevo individuo potencial.

Hawkes (1988) describió la patata como una planta dicotiledónea, herbácea, anual, considerada como perenne potencial debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente mediante tubérculos. Se caracteriza por sus hojas imparipinnadas o simples con foliolos que varían en número, tamaño y forma según las especies y ambiente dentro del cual se desarrollan. Las flores son hermafrodita de color blanco, azul, rojo o morado. Asimismo, son pentámeras, corola entera, ovario bilocular, estilo y estigma simples con cinco estambres

consideradas como autógamas y agrupadas en racimos terminales que conforman una inflorescencia cimosa.

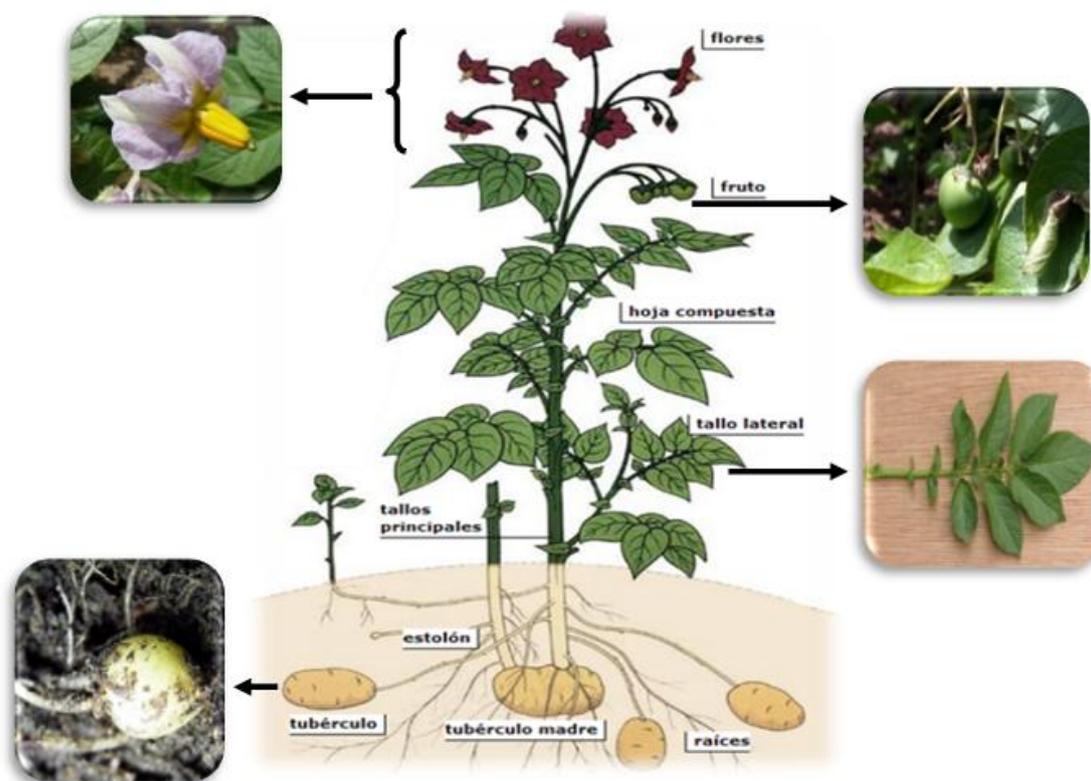


Figura 1.2. Morfología de la planta de patata (Huamán, 1986).

Los tubérculos son tallos modificados que constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta. Presentan ojos que se distribuyen por la superficie variando su forma de acuerdo a la especie, pudiendo ser redondos, ovalados, oblongos o con formas irregulares. El peridermo o la piel es una capa delgada en el exterior del tubérculo. El color de ésta y de la pulpa varía entre blanco, amarillo, crema o morado, apareciendo en algunos casos de forma bicolor (Egúsquiza, 2000).

1.4. IMPORTANCIA DEL MILDIU EN LA PRODUCCIÓN

En la actualidad, sólo treinta cultivos alimenticios proporcionan el 95% de las necesidades energéticas en el hombre, de los cuales cuatro (arroz, trigo, patata y maíz) son responsables de más del 60% del consumo energético de gran parte de la población mundial (Graziano, 2012). De esta forma, la patata es uno de los alimentos en los que se basa la dieta de muchas poblaciones.

Tabla 1.2. Taxonomía de las especies silvestres y cultivadas de patata (Hawkes, 1994).

Subsecciones/ Series	Ploidía				
	2x	3x	4x	5x	6x
Subsección Estolonífera Series					
I. Etuberosa	<i>S.brevidens</i> <i>S.etuberosum</i>				
II.Juglandifolia Subsección Potatoe Series	<i>S.lycoperiscoides</i>				
I.Morelliformia	<i>S.morelliforma</i>				
II.Bulbocatana	<i>S.bulbocastanum</i> <i>S.clarum</i>	<i>S.bulbocastanum</i>			
III.Pinnatisecta	<i>S.brachistotricum</i> <i>S.cardiophyllum</i> <i>S.jamesii</i> <i>S.pinnatisectum</i> <i>S.trifidum</i>	<i>S.cardiophyllum</i> <i>S.jamesii</i>			
IV.Polyadenia	<i>S.polyadenium</i> <i>S.lesteri</i>				
V.Comersoniana	<i>S.comersonii</i> <i>S.capsicibaccatum</i>	<i>S.comersonii</i>			
VI.Circaeifolia	<i>S.circaeifolium</i>				
VII.Lignicaulia	<i>S.lignicaule</i>				
VIII.Olmosiana	<i>S.olmosense</i>				
IX.Yungasensa	<i>S.chacoense</i> <i>S.tarijense</i> <i>S.yungasense</i>				
X.Megistracoloba	<i>S.boliviense</i> <i>S.megistacrolobum</i> <i>S.sanctae-rosae</i> <i>S.toralapanum</i>				
XI.Cuneolata	<i>S.infundibuliforme</i>				
XII.Conicibaccata	<i>S.chomatophilum</i> <i>S.santolallae</i> <i>S.violaceimarmoratum</i>		<i>S.agrimonofolium</i> <i>S.colombianum</i> <i>S.longiconicum</i> <i>S.oxycarpum</i> <i>S.tuquerrense</i>		<i>S.moscopaum</i>
XIII.Piurana	<i>S.piurae</i>				
XIV.Ignifolia	<i>S.ingifolium</i>				
XV.Maglia	<i>S.maglia</i>	<i>S.maglia</i>			
XVI.Tuberosa (silvestre)	<i>S.alandiae</i> <i>S.berthaultii</i> <i>S.brevicaule</i> <i>S.bukasovii</i> <i>S.canasense</i> <i>S.gandarillasii</i> <i>S.gourlayi</i> <i>S.hondelmannii</i> <i>S.kurtzianum</i> <i>S.leptophyes</i> <i>S.marinasense</i> <i>S.microdontum</i> <i>S.multidisectum</i> <i>S.neocardenasii</i> <i>S.oplocense</i> <i>S.sparsipillum</i> <i>S.spegazzinii</i> <i>S.vernei</i> <i>S.verrucosum</i>	<i>S. x chaucha</i> <i>S. x juzepczukii</i>	<i>S.tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i> <i>S.tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> <i>S. acaule</i> <i>S. fendleri</i> <i>Shjertingii</i> <i>S.papita</i> <i>S.polytrichon</i> <i>S.stoloniferum</i>	<i>S. x curtilobum</i>	
XVI.Tuberosa (cultivada)	<i>S. x ajanhuiri</i> <i>S.phureja</i> <i>S.stenotomum</i>				
XVII.Acaulia					<i>S. albicans</i>
XVIII.Logipedicellata		<i>S. x vallis-mexici</i>			
XIX.Demissa				<i>S. x semidemissum</i> <i>S. x edinense</i>	<i>S. brachycarpum</i> <i>S. demissum</i> <i>S. guerreroense</i> <i>S. hougasii</i> <i>S. iopetalum</i> <i>S. schenckii</i>

Según estimaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP), a pesar del uso de cultivares resistentes y altas dosis de fungicidas (Metalaxil y Mancozeb), esta enfermedad implica una pérdida de rendimiento global del 16% de la cosecha de patata, lo que representa una pérdida económica anual de € 5.2 mil millones en todo el mundo (Haverkort *et al.*, 2009).

El mildiu o tizón tardío es la enfermedad fúngica más importante del cultivo. Es causada por el oomiceto *Phytophthora infestans*, y ocasiona daños devastadores en la patata, imposibilitando la comercialización y consumo de los tubérculos afectados. Esto se traduce, en casos extremos, en un problema de seguridad alimentaria, entendida ésta como la falta de disponibilidad del alimento para la población que depende de sus necesidades nutricionales. Por otro lado, desde el punto de vista agronómico, causa una disminución en la productividad del cultivo, como grandes pérdidas económicas, lo que hace necesario un control temprano del avance de la enfermedad para evitar o reducir estos daños (Lees *et al.*, 2012). A raíz de la gran crisis provocada por el tizón tardío en Irlanda en 1846-1850, se tomó conciencia de su magnitud, dado que arrasó con los cultivos de patata que eran la base alimentaria del pueblo irlandés, causando una gran hambruna y desencadenando la muerte y migración de un 25% de la población. Desde esa fecha a la actualidad se han realizado numerosos estudios sobre la etiología, epidemiología y control de la enfermedad, los cuales se han intensificado aún más desde el hallazgo del tipo A2 en Europa en 1984, donde inicialmente sólo existía un linaje clonal del tipo A1 (Jaramillo, 2003). El desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares ha permitido conocer la variación genética del patógeno, principalmente debido a la aparición de razas más virulentas y resistentes a fungicidas sistémicos, con una mayor aptitud parasítica, mediante la aparición de oosporas resultado de la reproducción sexual del patógeno.

1.5. EVOLUCIÓN Y BIOLOGÍA DE *P. infestans*

1.5.1. Clasificación taxonómica

El pseudohongo *P. infestans* (Mont) de Bary, fue inicialmente descrito por Montagne en 1845 como *Botrytis infestans*, y posteriormente Anton de Bary en 1876 lo identificó como *P. infestans* (Erwin y Ribeiro, 1996). Es una especie de distribución mundial, conocida por ser el agente causal del tizón tardío o mildiu, una de las enfermedades más devastadoras de la patata que también afecta a otras Solanáceas, como el pepino dulce (*S. muricatum* Ait.), tomate (*S. lycopersicum*) y, ocasionalmente, a la berenjena (*S. melongena*) (Abad y Abad, 1997). El nombre de *P. infestans*, se deriva de las palabras griegas Phyto= planta

y *Phthora*= destructor. El patógeno, miembro de la clase oomiceto, pertenece al reino Cromista y está relacionado filogenéticamente con las diatomeas y algas pardas (Pérez y Forbes, 2008).

El Phylum Oomycota, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos. Poseen dos flagelos en las zoosporas y presentan gametos masculinos con paredes formadas por celulosa o polímeros similares, hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia del agua.

Los oomicetos, están más relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Son conocidos como organismos “heterocontes”, lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Éstos se presentan en pares, uno largo y adornado con nastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y uno más corto, delgado, cilíndrico y en forma de látigo o flecha. La pared celular contiene principalmente celulosa y β -glucanos antes que quitina y no tienen capacidad de sintetizar los esteroides. Estas características hacen suponer que los oomicetos han coevolucionado a partir de líneas diferentes de los hongos superiores como Ascomycetos y Basidiomycetos (Llácer *et al.*, 1996; Judelson, 1997).

Las características que diferencian el género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología tubular de las crestas mitocondriales y la bioquímica de las paredes celulares. Éstas contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de β '- β 1-3 glucano en vez de quitina, carencia de hipoxidación del esqualene a esteroides y diferencias en las vías metabólicas, como resultado de un sistema genético único (Erwin y Ribeiro, 1996). Debido a su morfología filamentosa, inicialmente se le incluyó en el Reino *Fungi* (Raven *et al.*, 1999), pero estudios posteriores pusieron de manifiesto otras características que diferencian a este género de los hongos verdaderos, incluyéndose finalmente en el Reino Cromista, Clase Oomycete (Rossman y Palm, 2007). Igualmente, el análisis de secuencias moleculares del ARN ribosomal ha confirmado la estrecha relación filogenética con las diatomeas y las algas pardas, a pesar de que se separaron relativamente pronto de las formas pigmentadas (Raven *et al.*, 1999).

1.5.2. Ciclo biológico

El genoma de *P. infestans* fue secuenciado en 2009 en el Laboratorio Sainsbury de Norwich (Hass *et al.*, 2009). Su estudio reveló que es extraordinariamente largo, más del doble que las especies oomicetos más cercanas. Este gran tamaño se debe a la enorme cantidad de secuencias

repetidas que posee. Los autores describen dos velocidades diferentes en la estructura del genoma, pero la más importante es la capacidad de evolucionar más rápido, lo que permite al hongo adaptarse a las plantas que se vuelven resistentes a la enfermedad. El patógeno, al igual que la mayoría de las especies de oomicetos, puede reproducirse sexual o asexualmente (Figura 1.4).

Tabla 1.3. Clasificación taxonómica de *P. infestans*.
(Raven *et al.*, 1999; Evert y Eichhorn, 1999; Erwin y Ribeiro, 1996).

REINO	: Cromista (grupo <i>Stramenophyle</i>)
PHYLUM	: Oomycota
CLASE	: Oomycete
SUBCLASE	: Peronosporomycetidae
ORDEN	: Pythiales
FAMILIA	: Phytiaceae
GÉNERO	: <i>Phytophthora</i>
ESPECIE	: <i>infestans</i>

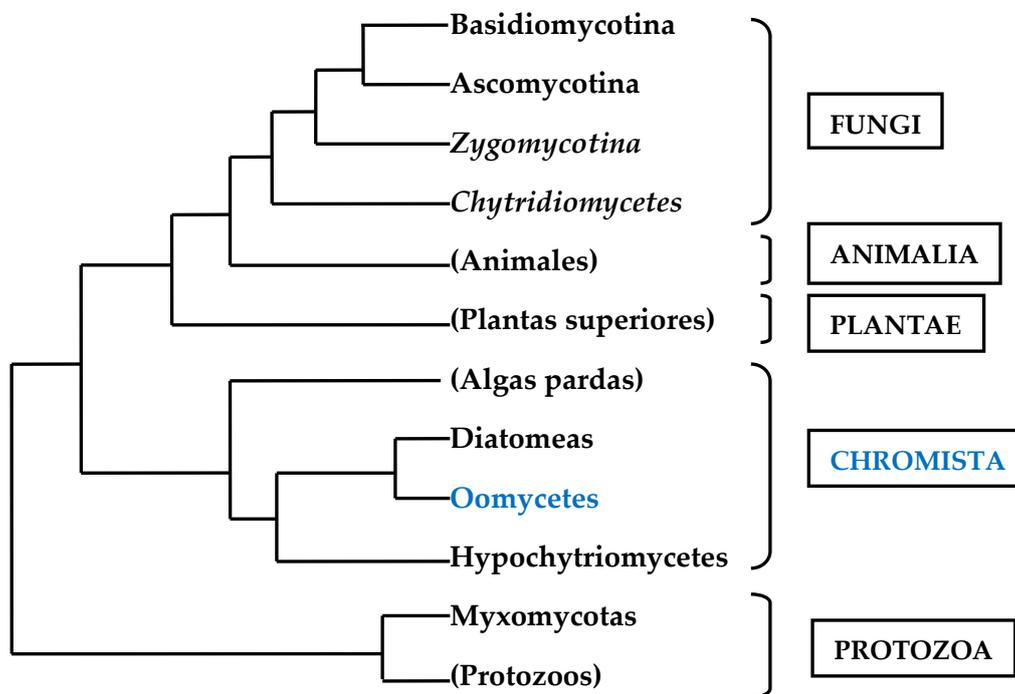


Figura 1.3. Relaciones filogenéticas entre los cinco reinos eucariotas.
(Cavalier-Smith, 1987; Forster *et al.*, 2000).

La reproducción sexual, mediante formación de oosporas, da lugar a un comportamiento de parásito obligado, debido a que el micelio no puede sobrevivir en ausencia de la célula hospedante, lo que implica la infección de células vegetales, causando la enfermedad en diversas Solanáceas. Por otro lado, la reproducción asexual a través de los esporangios, le permite generar un estado de supervivencia de las oosporas y nuevas combinaciones de genes (Jaramillo, 2003).

1.5.2.1. Ciclo asexual

El ciclo asexual involucra únicamente un solo tipo de apareamiento. El conjunto de aislados provenientes de una cepa que se reproduce de forma asexual se conoce como linaje clonal. En este caso no se produce recombinación meiótica, por lo que la variabilidad se originaría por mutaciones (Fry, 2008). Este tipo de reproducción se produce a través de esporangios, zoosporas e hifas. Las zoosporas se forman dentro del esporangio y son estructuras hialinas con morfología limoniforme, conteniendo entre 6 y 10 núcleos en su interior. Su tamaño varía de $36 \times 22 \mu\text{m}$ a $29 \times 19 \mu\text{m}$, siendo liberadas cuando se rompe la pared esporangial. Se dispersan por el viento, lo que les permite alcanzar los tejidos de las plantas huéspedes y germinar cuando las condiciones ambientales son favorables (Pérez y Forbes, 2008).

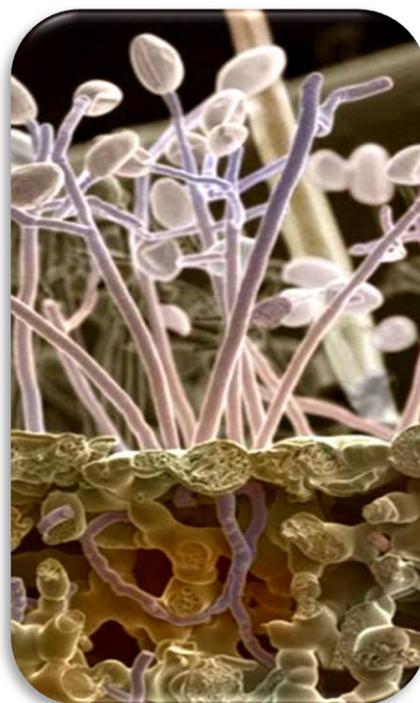


Figura 1.4. Microscopía electrónica de una sección de hoja de patata infectada por *P. infestans*. (www.agenciasinc.es)

En presencia de agua libre, las zoosporas, nadan libremente en busca de superficies sólidas dónde enquistarse. Posteriormente, éstas pueden desarrollar un tubo germinativo y penetrar en la hoja por los estomas (Figura 1.5-A), o pueden formar apresorios, en cuyo caso la hifa de penetración ingresa a través de la cutícula (Figura 1.5-B).

Una vez dentro de la planta, el micelio se desarrolla intercelularmente formando haustorios (Jaramillo, 2003). Tras 10 días de infección, los esporangios emergen a través de los estomas de la planta huésped.

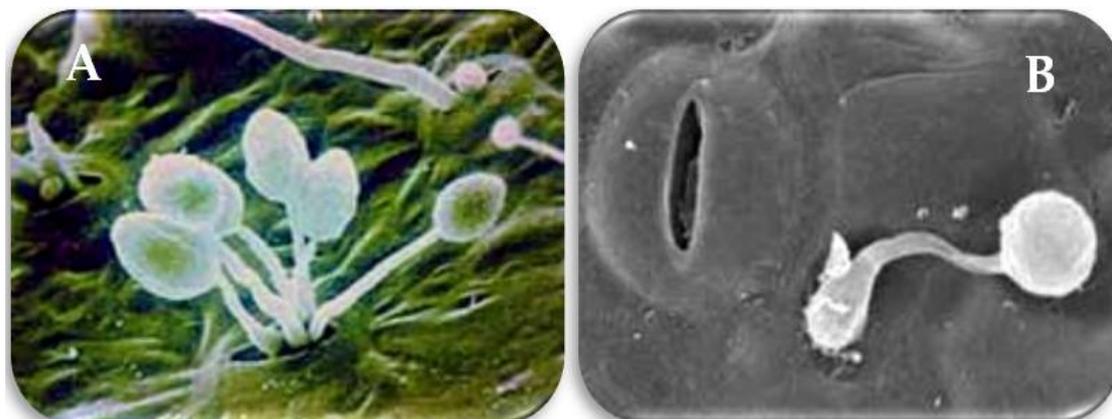


Figura 1.5. A: Zoosporas penetrando por los estomas. B: Zoosporas atravesando la epidermis (www.agenciasinc.es).

1.5.2.2. Ciclo sexual

P. infestans es una especie heterotálica, por lo tanto necesita dos tipos de apareamiento (*A1* y *A2*) cuya coexistencia espacio-temporal es imprescindible para que se produzca la reproducción sexual.

A pesar de ello, la diferencia entre ambos grupos no radica en un dimorfismo sexual, puesto que ambos tipos presentan órganos reproductores masculinos y femeninos en el mismo individuo, sino en la autoincompatibilidad de éstos y la necesidad de una estimulación hormonal del tipo de apareamiento opuesto para que se desencadene este tipo de reproducción (Pérez y Forbes, 2008).

La meiosis ocurre inmediatamente antes del desarrollo de los gametangios, representando el único estado haploide del ciclo de vida de este organismo. La cariogamia se da entre estos dos núcleos haploides, formando una oospora diploide uninucleada de paredes gruesas, que puede servir además, como estructura de supervivencia para el invierno en las zonas templadas (Smart *et al.*, 2000).

Las oosporas se forman cuando los micelios con distinto tipo de apareamiento *A1* y *A2*, crecen juntos, formando uno de ellos células masculinas o anteridios, y la otra célula femenina u oogonios. El oogonio fertilizado se convierte en una oospora diploide uninucleada de paredes gruesas que le permite resistir condiciones desfavorables, como la sequía o las bajas temperaturas (Jaramillo, 2003) (Figura 1.7). Las oosporas desarrolladas en las hojas tienen un diámetro medio de 30 μm (24 - 35 μm) frente a 24 a 56 μm , de las originadas en medio de cultivo.

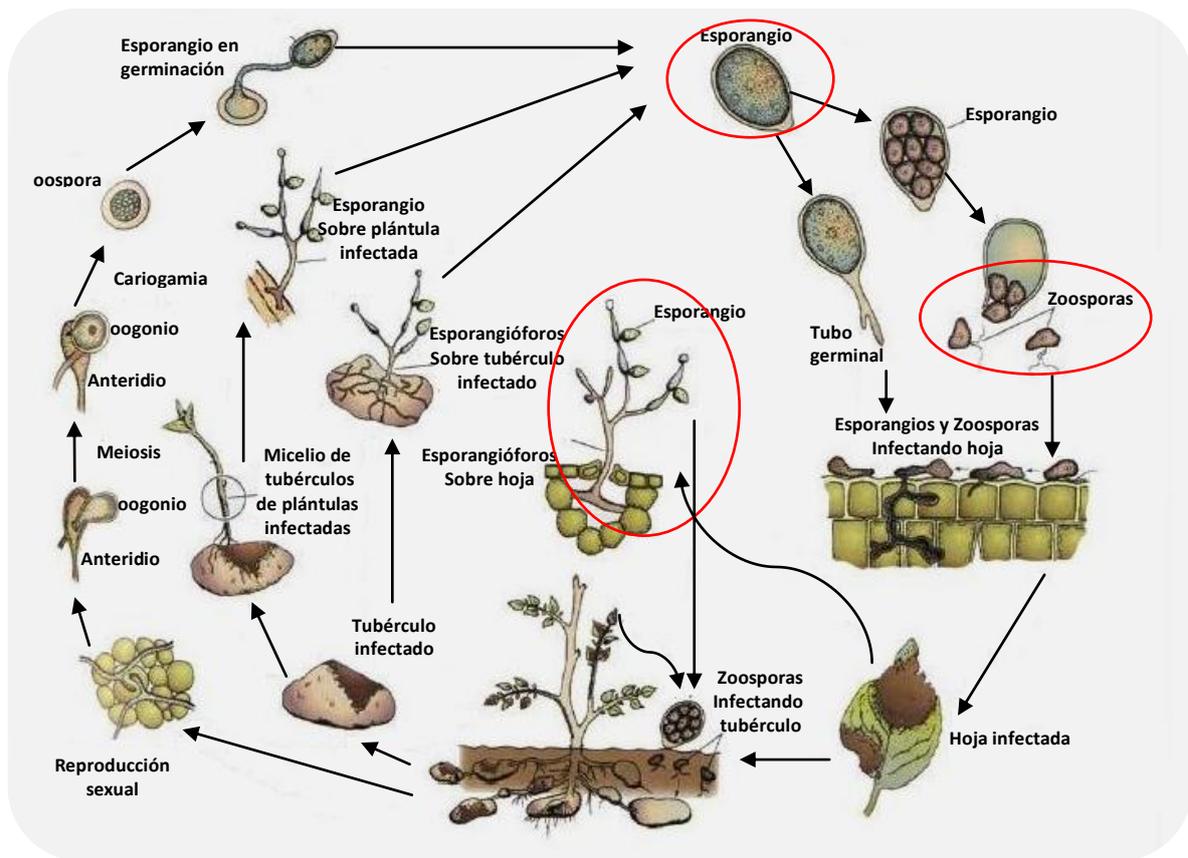


Figura 1.6. Ciclo biológico de *P. infestans* (www.agrofaena.blogspot.com.es).

Cuando las condiciones son favorables las oosporas forman un tubo germinativo sobre el cual se desarrolla un zoosporangio similar a los de la reproducción asexual, el cual germina, iniciando las zoosporas resultantes un nuevo ciclo de vida (Henflig, 1987).



Figura 1.7. Imagen de microscopía electrónica de una oospora de *P. infestans*. (www.agenciasinc.es)

1.6. LA ENFERMEDAD: MILDIU O TIZON TARDÍO

1.6.1. Epidemiología

Este patógeno puede mantenerse de una estación a otra como micelio o esporas (esporangios u oosporas). Las fuentes iniciales que contienen inóculo son normalmente residuos vegetales o tubérculos semilla. En el caso de haberse producido reproducción sexual, las esporas presentes en el suelo serían la fuente de infección. En condiciones asexuales, los esporangios que se encuentran en hojas y tallos de plantas infectadas pueden ser dispersados por lluvia y el viento, posibilitando la infección de tubérculos existentes en el suelo o de otros hospedadores próximos (Pérez y Forbes, 2008).

La enfermedad también se desarrolla en el período post-cosecha, a partir de tubérculos infectados, o durante el período vegetativo por lavado de esporangios hacia el suelo y en contacto con partes aéreas de plantas infectadas. Durante su almacenamiento, estos tubérculos enfermos pueden formar brotes que se convierten en fuentes primarias de infección de tubérculos sanos o de un nuevo cultivo si se utilizan como material de propagación vegetativa (Heinfling, 1987).

Tras la infección inicial, las condiciones climáticas son determinantes para el desarrollo y progreso de la enfermedad. Así, la temperatura óptima para el desarrollo del patógeno y formación de esporangios se sitúa entre 18 y 20 °C durante 8 a 10 h. Durante este período se produce la germinación directa, con formación del tubo germinativo que penetra en los tejidos de la planta. A temperaturas inferiores de 12-16 °C se estimula la producción y liberación de 8 a 10 zoosporas en el interior de los esporangios, los cuales se enquistan y pueden formar un tubo germinativo que ingresa a la hoja a través de los estomas o por la cutícula de la hoja. Bajo condiciones favorables y en variedades susceptibles, aproximadamente tres días después de la infección, aparecen los primeros síntomas en las hojas y tallos en forma de pequeñas manchas que luego se van extendiendo (Smart *et al.*, 2000). Además, el desarrollo se ve favorecido por la humedad relativa mayor del 95%, así como la aparición de lluvia, rocío o riego elevado (Andrade-Piedra *et al.*, 2005).

En base a estas condiciones, existen sistemas de pronóstico meteorológico que alertan del riesgo de extensión de la enfermedad. Se conoce como período Smith el intervalo de tiempo de al menos dos días consecutivos en los cuales la temperatura mínima es superior o igual a 10 °C, y cada día, durante al menos 11 h, la humedad relativa es superior al 90% (Cooke *et al.*, 2011). En resumen, la enfermedad se desarrolla y se propaga de forma más rápida a temperaturas

bajas y con un alto grado de humedad. De modo que, bajo tales condiciones ambientales, en tan sólo tres días puede completarse un ciclo causando importantes daños en los tejidos de la planta huésped (Henfling, 1987).

Después del desarrollo del patógeno en los tejidos, se produce una nueva generación de esporas si se mantienen las condiciones propicias de humedad elevada. Por esta razón, las lesiones en el follaje con producción de esporas son más evidentes después de lluvia o de una noche con humedad elevada. Los esporangióforos con las esporas se pueden observar al borde de las lesiones en forma de un moho blanquecino, principalmente en el envés de la hoja (Martínez, 2006).

Los esporangios presentes en las hojas enfermas son desprendidos o lavados por las gotas de lluvia o riego y transportados hacia el suelo, donde infectan a los tubérculos que se encuentran cerca de la superficie. Otros factores como la humedad y temperatura del suelo, el número de esporangios viables existentes y la susceptibilidad de la variedad favorecen la infección de los tubérculos. Por otra parte, la infección también ocurre cuando se realiza la recolección en días lluviosos. Los esporangios que se encuentran en el ambiente, con lluvia o agua de riego infectan los tubérculos cosechados mientras se encuentran en el campo, observándose posteriormente el desarrollo de la enfermedad tras el almacenaje de los mismos (Torres, 2002).

1.6.2. Sintomatología

El mildiu se comporta como una enfermedad policíclica, desarrollando varios ciclos de reproducción asexual durante una misma campaña de cultivo (Fry *et al.*, 2008). La cantidad de inóculo producido depende de múltiples factores como el huésped, el patógeno, el manejo y principalmente las condiciones climáticas (Harrison, 1995). El período de incubación desde la infección hasta la aparición de los primeros síntomas en tallos, hojas y tubérculos, oscila entre dos y tres días, pudiendo causar la destrucción total del cultivo entre siete y diez días si no se adoptan rápidamente medidas de control.

En campo, los primeros síntomas de infección de la planta suelen aparecer en las hojas inferiores, normalmente en las puntas y los bordes de los folíolos, donde una aureola verde clara o amarilla suele separar el tejido muerto del sano. Posteriormente, las lesiones progresan hacia el resto de la superficie del folíolo y pueden visualizarse en forma de manchas de color verde oscuro, pardas o negras (Pérez y Forbes, 2008). En el envés de las hojas se forman unas vellosidades blanquecinas que corresponden a las estructuras del patógeno como los esporangios y esporangióforos (Figura 1.8-A y B).

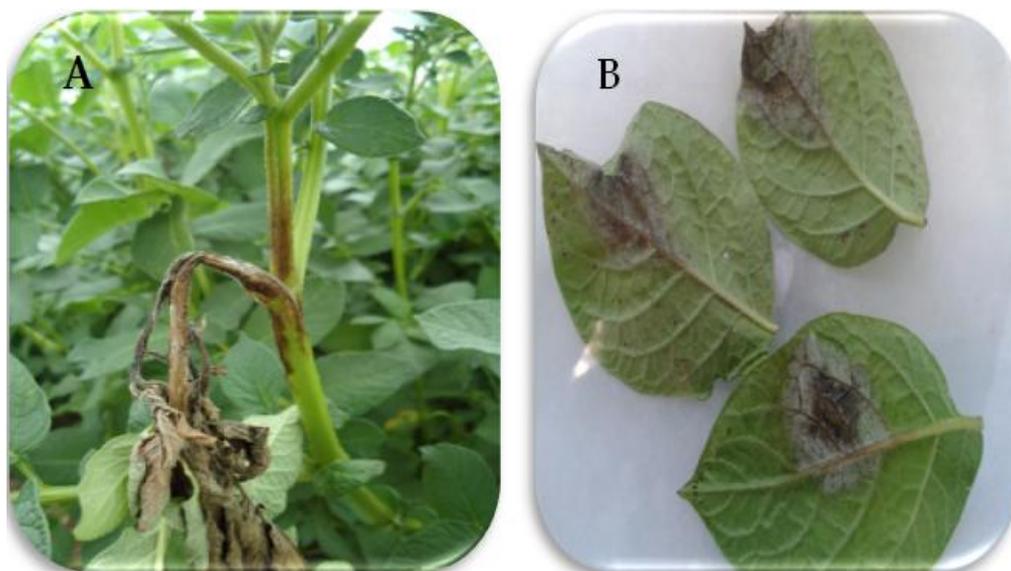


Figura 1.8. A: Muerte del foliolo por ataque de *P. infestans*. B: Lesiones necróticas en el envés, desarrollo de micelio y necrosis.

Esta fase de infección foliar da lugar a una disminución de la capacidad fotosintética, debido a la destrucción de los tejidos, lo que se traduce en una merma de la desarrollo del tubérculo. En los tallos se presentan en la parte media-superior de la planta, las lesiones necróticas con color marrón oscuro o negro y de forma alargada, las cuales pueden producirse por infección directa o por extensión a partir de las hojas, desde los peciolo hasta el tallo (Figura 1.9).

Cuando la enfermedad daña todo el diámetro del mismo, este se debilita y se vuelve quebradizo, lo que puede dar lugar a un colapso del mismo y al marchitamiento y muerte de la planta por encima del punto de infección.



Figura 1.9. Lesiones necróticas en tallo causadas por *P. infestans*.

En el caso de los tubérculos, cuando existe infección, presentan una decoloración superficial de aspecto pardo rojizo, con depresiones necróticas irregulares que se extienden en profundidad hacia la médula del mismo (Figura

1.10). Se produce así la pudrición granular seca del tejido interno, que en estados avanzados puede dar lugar a la entrada de otros patógenos secundarios, como bacterias y hongos (Heinfling, 1987).



Figura 1.10. Sección transversal de un tubérculo con presencia de necrosis. (www.agrofaena.blogspot.com.es).

Capítulo 2

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal la caracterización de aislados de *P. infestans* prospectados en España, así como la evaluación de fuentes de resistencia para su empleo en programas de mejora genética de patata.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Caracterización de aislados de *P. infestans* existentes en las principales zonas productoras de patata en España. Este objetivo tiene dos parciales:
 - 1.1. Identificación del tipo de apareamiento.
 - 1.2. Caracterización molecular mediante marcadores microsatélites y ADN mitocondrial.
2. Determinación de las razas fisiológicas existentes mediante el espectro de virulencia y evaluación de la resistencia de aislados de *P. infestans* a fungicidas sistémicos.
3. Identificación de fuentes de resistencia en el *G. Solanum* e híbridos somáticos mediante inoculaciones controladas.
4. Incorporación de la resistencia a *P. infestans* en un programa de mejora genética de patata mediante cruzamientos dirigidos y obtención de clones avanzados.

Capítulo 3

Caracterización de aislados de
P. infestans

3.1. INTRODUCCIÓN

Para mejorar la eficacia en las estrategias de control del patógeno es esencial conocer la dinámica adaptativa de las poblaciones, a través de su caracterización. En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios a nivel mundial para conocer la diversidad del oomiceto identificando fenotípica y genéticamente un gran número de aislados, incluyendo el tipo de apareamiento, espectro de virulencia, agresividad de las razas y sensibilidad al fungicida sistémico Metalaxyl. Para ello se utilizaron inicialmente marcadores morfológicos (Vaillant y Gómez, 2009) o bioquímicos (Benavides *et al.*, 2002).

Asimismo se han empleado técnicas moleculares mediante AFLPs (Van der Lee *et al.*, 1997), RAPDs (Mahuko *et al.*, 2000), RFLPs (Jaramillo, 2003), haplotipos mitocondriales (Griffith y Shaw, 1998) y huellas genéticas con la sonda RG57 (Fernández-Pavía *et al.*, 2005). También se ha aplicado la técnica PCR con marcadores específicos para detectar el tipo de apareamiento (Mazáková, 2006), análisis de regiones espaciadoras transcritas o ITS (Silva *et al.*, 2009) y microsatélites (Knopova *et al.*, 2002, Lees *et al.*, 2006).

3.1.1. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO

El tipo de apareamiento ha sido utilizado como marcador fenotípico de los aislamientos de *P. infestans*, por suponer un factor importante en la variación genética de las poblaciones. El descubrimiento del tipo de apareamiento A2 en el Oeste de Europa en 1984, significó el primer cambio cualitativo en la población de este patógeno, pues hasta la fecha sólo se había descrito el tipo A1 fuera de Méjico (Pérez y Forbes, 2008).

La determinación del tipo de apareamiento de un aislado se puede realizar mediante cruzamiento *in vitro* del aislado a identificar, junto con una cepa de referencia de apareamiento conocido (A1 o A2). Actualmente se han desarrollado también métodos moleculares más precisos mediante la aplicación de la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para ello, se emplean cebadores capaces de amplificar segmentos específicos de 1,35 Kb, correspondiente al locus S1 presente en el tipo A1 y ausente en el tipo A2 (Judelson *et al.*, 1996). En el caso del A2, el fragmento amplificado corresponde a 347 pb, ausente en el tipo A1 (Kim y Lee, 2002). Otro método que permite diferenciar simultáneamente ambos tipos, se basa en la identificación de segmentos de secuencias polimórficas CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) con cebadores específicos que amplifican un fragmento de 600 pb, el cual es digerido con el enzima de restricción *HaeIII*.

Estas técnicas se han utilizado con éxito por diversos autores en estudios de caracterización poblacional (Pérez *et al.*, 2001; Páez *et al.*, 2004; Jmour y Hamada, 2006; Mazáková *et al.*, 2006).

3.1.2. HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES

El análisis de fragmentos de restricción en el ADN mitocondrial (mtDNA) es una poderosa herramienta en la taxonomía y ha sido empleada para la clasificación de diferentes organismos, incluyendo animales y hongos. El mtDNA es un material genético circular de doble cadena, el cual muestra poca o ninguna recombinación, y es transmitido uniparentalmente, siendo independiente del genoma nuclear. Se ha secuenciado dicho ADN mitocondrial en *P. infestans*, resultando una molécula relativamente pequeña de 37.957 pb (Paquin *et al.*, 1997).

Esta técnica es muy útil para estudiar la genética de las poblaciones, definir líneas descendientes y eventos de migración del patógeno. Mediante su aplicación se puede reconstruir el pasado, ya que sólo existe una herencia materna para la determinación de haplotipos mitocondriales en este patógeno (Hernández y Gómez, 2005).

Mediante el método de identificación basado en RFLP-PCR el ADN mitocondrial es extraído y amplificado con cebadores específicos (P1, P2, P3 y P4) produciendo fragmentos en regiones polimórficas conocidas del genoma mitocondrial (Figura 3.1). Seguidamente, dichos fragmentos son digeridos con enzimas de restricción para obtener los patrones de bandas correspondientes a los diferentes haplotipos (Ia, IIa, Ib, IIb) los cuales son visualizados en un gel de agarosa al 2% (p/v). Estos cebadores fueron diseñados por diversos autores para identificar los cuatro haplotipos mitocondriales de *P. infestans* (Carter *et al.*, 1990; Maldonado y García, 2002, Griffith y Shaw, 1998). Posteriormente Ordóñez *et al.* (2000) han identificado un nuevo haplotipo denominado Ic en Ecuador.

3.1.3. MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)

Se definen como secuencias simples repetitivas de ADN o SSR que se repiten en el genoma, las cuales contienen de 1 a 4 nucleótidos repetidos en bloque, presentando loci polimórficos. Estos varían entre animales y vegetales, siendo en los mamíferos (GT) n y (CA) n los más comunes, donde “ n ” representa el número de veces que se repite. En plantas, las secuencias más frecuentes son (AA) n y (AT) n .

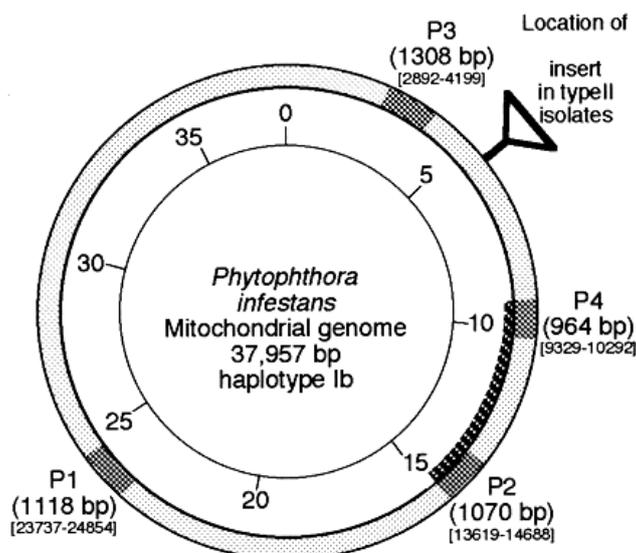


Figura 3.1. Genoma mitocondrial de *P. infestans* con la ubicación de los productos de amplificación (P1 a P4). Griffith y Shaw, (1998).

En el caso de *P. infestans* una de las secuencias más común es TC. Los microsatélites poseen un gran polimorfismo, son codominantes lo que permite diferenciar entre homocigotos y heterocigotos, y se encuentran dispersos en varias partes del genoma con un alto número de copias (Creste, 2001).

Pueden ser amplificados mediante PCR, utilizando un par de cebadores, especialmente diseñados, de unas 20-30 pb, los cuales son complementarios a las secuencias únicas que flanquean los microsatélites. Para ello se utiliza una biblioteca genómica de *P. infestans* enriquecida con la secuencia de repetición (CT)_n (Knapova *et al.*, 2001). Knapova *et al.* (2002) seleccionaron seis marcadores SSR para caracterizar aislados de *P. infestans*, concluyendo que estos constituyen un método rápido, específico y reproducible en su identificación.

Para realizar un genotipado preciso y rentable, un método ideal es la PCR multiplex empleando varios SSR conjuntamente. Cooke *et al.* (2006) aplicaron esta técnica, utilizando 12 microsatélites polimórficos descritos para *P. infestans*.

Un paso crítico para el uso del método multiplex fue la validación y estandarización del protocolo entre dos laboratorios de Holanda y Gran Bretaña. Las cepas de referencia fueron intercambiadas, así como también la nomenclatura de alelos y el sistema de puntuación. Como consecuencia de esta cooperación se facilitó el genotipado de las colecciones europeas de *P. infestans* y la formación de una red más amplia de laboratorios para la determinación de la variabilidad del patógeno en una base de datos común (Euroblight, 2013). Asimismo se han optimizado los cebadores marcadores fluorescentes y las

condiciones de PCR con un sistema de electroforesis capilar y cuatro marcadores (FAM, NED, PET y VIC), además de un estándar LIZ. De esta forma se han obtenido buenos resultados utilizando kits comerciales de PCR multiplex, con un gran número de cepas procedentes de poblaciones europeas (Cooke *et al.*, 2012a).

El objetivo del presente capítulo ha sido la identificación del tipo de apareamiento y la determinación de la estructura genética de los aislados de *P. infestans* prospectados en España.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1.1. Aislados de *P. infestans*

Entre los años 2011 a 2013 se realizaron varias prospecciones de muestras de foliolos de patata infectados con *P. infestans*. Asimismo se solicitó la colección existente en el Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía en Sevilla. De esta forma se obtuvieron un total de 52 aislados provenientes de diferentes regiones productoras de patata en España (Tabla 3.2). Tras su recolección, las hojas infectadas se trasladaron al laboratorio de Sanidad Vegetal de Neiker-Tecnalia, dónde se procedió al aislamiento del patógeno. Las muestras se colocaron en cámara húmeda con una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, humedad relativa aproximadamente del 90% y fotoperíodo de 16 h para potenciar el desarrollo de micelio (Figura 3.2-A).

Los aislados de *P. infestans* se obtuvieron siguiendo el protocolo de Alor *et al.* (2014a). Para ello en una cabina de flujo vertical se pasaron trozos de micelio sobre rodajas de patata de la variedad susceptible Bintje, con el fin de favorecer el crecimiento del patógeno (Figura 3.2-B). Después de 5 días el micelio creció y fue transferido a placa Petri, conteniendo medio nutritivo agar-centeno B (Caten y Jinks, 1968). Posteriormente, los aislados fueron cultivados en cámara de crecimiento a temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, y condiciones de total oscuridad. El medio se preparó calentando 800 ml de agua con 60 g de centeno molido durante 1 hora, filtrando la fase sólida de la líquida.

A esta solución se le añadió 15 g de agar y 20 g de sacarosa para luego enrasar con agua destilada hasta 1 litro. Seguidamente, se autoclavó a 121°C durante 30 min y se dispensó en placas Petri.

3.2.1.2. Cepas de referencia

Como controles positivos en las pruebas de caracterización, se emplearon dos cepas de referencia de *P. infestans* con tipo de apareamiento conocido (Tabla 3.1). La cepa MP-324 del tipo *A1* que fue proporcionada por el Potato Research Institute Jadwisin Center (Polonia). Como cepa de referencia *A2* se empleó la R1-A2, cedida por la Universidad Queen's de Belfast (Irlanda del Norte).

Tabla 3.1. Cepas de referencia utilizadas para cada tipo de apareamiento.

Procedencia	Tipo de apareamiento	Cepa
Polonia	<i>A1</i>	MP-324
Irlanda del Norte	<i>A2</i>	R1-A2

3.2.1.3. Cultivo y mantenimiento de los aislados

Los aislados y cepas de referencia, fueron cultivados en medio agar-centeno B y mantenidos en la cámara de crecimiento en condiciones óptimas para su desarrollo tal como lo describe Alor *et al.* (2014a). Cada 2-3 meses, dependiendo de la velocidad de crecimiento del aislado, se realizaron subcultivos de agar-centeno con micelio, transfiriéndolo a nuevas placas Petri. Para evitar la pérdida o disminución de la virulencia del patógeno durante su mantenimiento *in vitro*, los aislados fueron transferidos periódicamente a cámara húmeda sobre porciones de patata de la variedad Bintje desinfectada y pelada previamente. Después 10 días de incubación, parte del micelio aéreo fue transferido nuevamente al medio de agar-centeno para su mantenimiento.

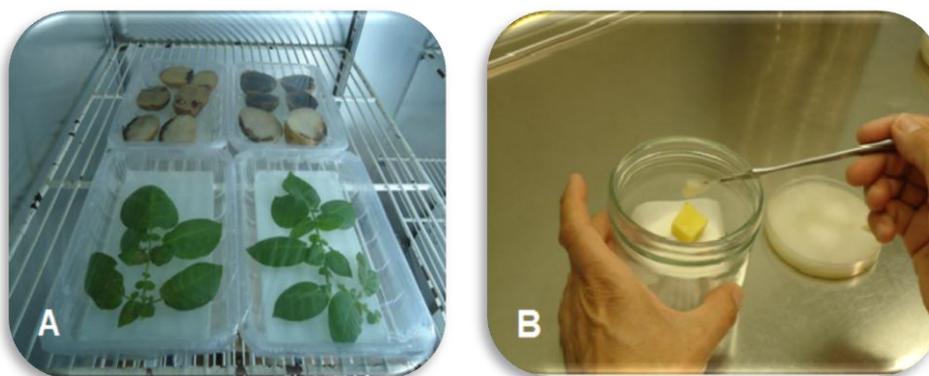


Figura 3.2. A: Muestras en cámara húmeda. B: Parte de micelio transferido a patata.

Tabla 3.2. Identificación y procedencia de los aislados.

Aislados	Localidad	Provincia
TEN-001-11	La Matanza	Tenerife
TEN-002-11	La Matanza	Tenerife
TEN-003-11	La Matanza	Tenerife
TEN-004-11	La Victoria	Tenerife
TEN-005-11	La Victoria	Tenerife
TEN-006-11	La Victoria	Tenerife
TEN-007-11	Cerro Gordo	Tenerife
ORE-001-11	Xinzo de Limia	Orense
ORE-002-11	Xinzo de Limia	Orense
ORE-003-11	Xinzo de Limia	Orense
ALA-001-11	Iturrieta	Álava
ALA-002-11	Arkaute	Álava
ALA-001-12	Iturrieta	Álava
ALA-001-13	Heredia	Álava
ALA-002-13	Zuazo de San Millán	Álava
ALA-003-13	Gauna	Álava
ALA-004-13	Iturrieta	Álava
CAD-001-13	Sanlúcar de Barrameda	Cádiz
CAD-002-13	Sanlúcar de Barrameda	Cádiz
CRE-001-04	Villamanrique	Ciudad Real
CRE-002-04	Villamanrique	Ciudad Real
CRE-003-04	Villamanrique	Ciudad Real
CRE-004-04	Villamanrique	Ciudad Real
SEV-001-05	La Rinconada	Sevilla
SEV-002-05	Guillena	Sevilla
CAD-001-05	Chipiona	Cádiz
CAD-002-05	Jerez	Cádiz
CAD-003-05	Jerez	Cádiz
JAE-001-04	Alcalá La Real	Jaén
CAD-001-04	Sanlúcar de Barrameda	Cádiz
CAD-002-04	La Barca	Cádiz
CAD-003-04	La Barca	Cádiz
SEV-001-04	Maribañez	Sevilla
SEV-002-04	Brenes	Sevilla
SEV-003-04	Sevilla	Sevilla
SEV-004-04	Sevilla	Sevilla
COR -001-04	Villarrubia	Córdoba
CAD-004-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-005-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-006-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-007-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-008-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-009-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-010-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-011-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-012-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-013-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-014-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-015-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-016-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
CAD-017-04	Oca-Sanlúcar	Cádiz
SEV-001-03	Lora del Rio	Sevilla

3.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO

Se realizó la caracterización de los aislados mediante la identificación del tipo de apareamiento por cruzamiento *in vitro* y análisis molecular.

3.2.2.1. Tipo apareamiento mediante cruzamiento *in vitro*

El tipo de apareamiento ha sido utilizado siempre como un marcador fenotípico de los aislamientos de *P. infestans*, por suponer un factor importante en la variación genética de las poblaciones. Para su determinación se siguió la metodología descrita por Grünwald *et al.* (2001), mediante el apareamiento *in vitro* de cepas de referencia del tipo *A1* (MP-324) y *A2* (R1-A2) con los diferentes aislados. Para ello, se cultivaron éstos con la cepa de referencia en placas Petri con medio nutritivo agar-centeno. Estas fueron incubadas durante 15 días a $18^{\circ}\text{C} \pm 2$, y en oscuridad. Para la visualización de los esporangios en la determinación del tipo de apareamiento mediante la identificación de las estructuras morfológicas características en cada caso, oosporas en la reproducción sexual o esporangios en la asexual, se utilizó un microscopio óptico a 40x, con cámara digital *Nikon DS-Ri1* y software *NIS-Elements* de captura de imágenes.

La evaluación se realizó tomando muestras de la interfase de contacto entre los dos aislados. De esta forma, aquéllos que generaban oosporas con la cepa de referencia del tipo *A2* se identificaron como aislados *A1*. Por el contrario los que indujeron oosporas con la cepa de referencia *A1*, se clasificaron como tipo *A2* (Tooley *et al.*, 1989).

3.2.2.2. Tipo de apareamiento mediante técnicas moleculares

La determinación del tipo de apareamiento mediante métodos moleculares se basó en la aplicación de la técnica PCR con diferentes tipos de cebadores para el tipo *A1*, *A2* o ambos conjuntamente.

3.2.2.2.1. Extracción y cuantificación del ADN

Se extrajo el ADN genómico de *P. infestans* siguiendo el protocolo propuesto por Le *et al.* (2008). Para ello se realizó un raspado en la superficie del micelio, previamente humedecido con 3 ml de agua estéril. A continuación se liofilizó durante 24 h para facilitar la posterior homogenización del tejido.

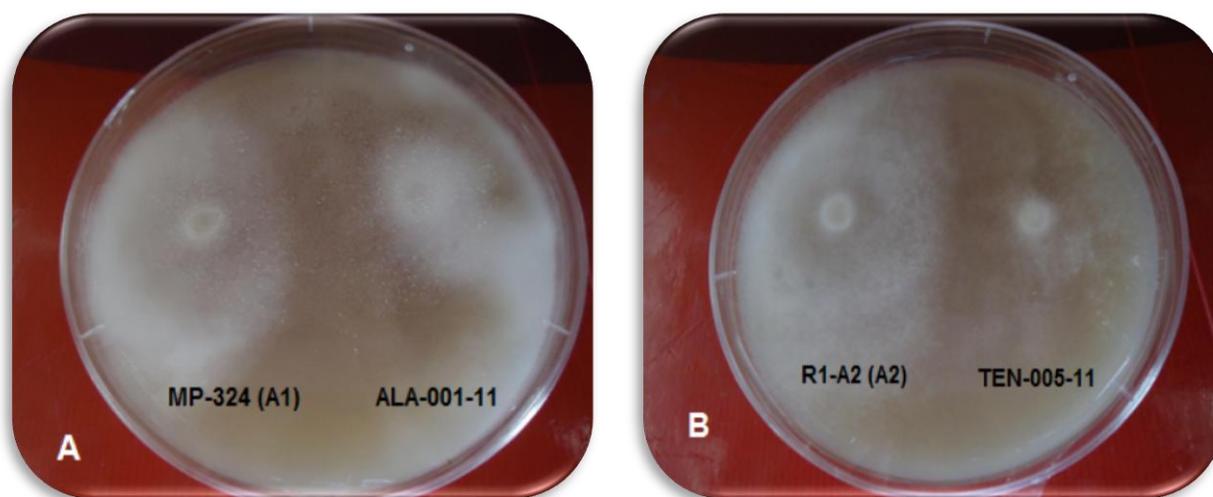


Figura 3.3. A y B: Apareamiento *in vitro* de los aislados con las cepas de referencia A1 (MP-324) y A2 (R1-A2).

Posteriormente, se realizó una disgregación mecánica del tejido liofilizado, empleando nitrógeno líquido. El producto resultante se recogió en un tubo Eppendorf, pesando 20 mg de cada muestra. Para la extracción del ADN se empleó el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo descrito por la propia casa comercial. Para optimizar el proceso de extracción se realizaron pequeñas modificaciones (pesando 20 mg de micelio liofilizado y homogeneizado previamente en nitrógeno líquido), no está estipulado en el protocolo.

El ADN se cuantificó empleando técnicas espectrofotométricas (NanoDrop 2000), mediante medida de la absorbancia a 260 nm. La calidad del mismo se estimó calculando el cociente 260/280 nm, siendo aceptables las muestras cuyo ratio están comprendidos entre 1,8 y 2,0. Después, se realizó una dilución de 10 ng/ μ l de cada muestra de ADN, conservándolas a -20 °C para su uso posterior.

3.2.2.2.2. Amplificación del ADN

El método para determinar el tipo sexual mediante el cruzamiento *in vitro* con cepas de referencia, se contrastó con los resultados obtenidos mediante el empleo de técnicas moleculares.

Para ello se aplicó la técnica PCR con diferentes cebadores que identificaban un tipo de apareamiento determinado o ambos conjuntamente:

- PCR con cebadores específicos para el tipo de apareamiento A1.
- PCR con cebadores específicos para el tipo de apareamiento A2.
- PCR con cebadores para marcadores tipo CAPS y ambos tipos de apareamiento.

En todas las reacciones se empleó un control negativo con agua estéril, tomando como controles positivos las cepas de referencia de apareamiento conocido. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Los productos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), con la siguiente composición: 0,5 g de agarosa (D1 low EEO-Conda), 3 µl GelRed™ (Biotium-10.000X) y 50 ml TAE 1X (40 mM Tris-Acetato pH 8,1 mM EDTA).

En el gel solidificado se cargó el producto de PCR más el tampón de carga (Ficoll 10X), reservando el primer pocillo para el marcador de peso molecular Hyperladder II (Bioline). La migración de los productos de amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis de agarosa a 100 v con tampón TAE 1X. Tras la migración del ADN, las bandas fueron visualizadas bajo luz UV del ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad.

➤ **PCR con cebadores específicos para el tipo de apareamiento A1.**

Para la detección de aislados de tipo A1 se utilizaron los cebadores S1A y S1B (Judelson *et al.*, 1995). Estos amplificaban fragmentos de 1400 pb, específicos del gen *S1*, que está presente en el tipo de apareamiento A1 pero ausente en el A2 (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR específica para el tipo sexual A1.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Tamaño del fragmento amplificado
S1A	5'- AGG ATT TCA ACA A - 3'	1400 pb
S1B	5'- TGC TTC CTA AGG - 3'	

Para el desarrollo de la PCR se emplearon los reactivos y condiciones descritas por Judelson (1996), con ligeras modificaciones en la concentración de algunos reactivos y en la temperatura de hibridación (Tabla 3.4).

La *Taq* polimerasa utilizada fue de la casa comercial Bioron.

Tabla.3.4. Reactivos y condiciones de amplificación para la PCR específica del tipo de apareamiento A1.

Reactivos	Concentración final	Condiciones de amplificación
ADN (2 ng/μl)	2 ng	
KCl (1 M)	10 mM	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1 M)	10 mM	
Tritón X-100 (1 %)	0,1 %	94 °C- 30 s
MgSO ₄ (10 mM)	2 mM	$\left[\begin{array}{l} 94\text{ °C- }30\text{ s} \\ 37\text{ °C- }30\text{ s} \\ 72\text{ °C- }1\text{ min} \end{array} \right] \times 35\text{ ciclos}$
Tris-HCl (1 M pH 8,5)	20 mM	
dNTPs (2,5 mM)	125 μM	
Cebador S1A (10 μM)	0,75 μM	
Cebador S1B (10 μM)	0,75 μM	72 °C- 3 min
Taq Polimerasa (5 U/μl)	1U	
H ₂ O	Hasta 25 μl	

➤ **PCR con cebadores específicos para el tipo de apareamiento A2.**

Para la detección de aislados de tipo A2 se utilizaron los cebadores PHYB-1 y PHYB-2 (Tabla 3.5). La PCR permitía amplificar un fragmento de 347 pb en los aislados del tipo de apareamiento A2 (Kim y Lee, 2002). Para la separación de las bandas se cargaron 7 μl del producto de PCR más 4 μl del tampón de carga, en gel de agarosa al 1% (p/v). Aproximadamente después de 20 min se procedió a la visualización.

Tabla 3.5. Secuencia de cebadores utilizados en la PCR específica para el tipo sexual A2.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Tamaño del fragmento amplificado
PHYB-1	5'- GAT CGG ATT AGT CAG ACG AG - 3'	347 pb
PHYB-2	5'- GCG TCT GCA AGG CGC ATT TT - 3'	

Tabla 3.6. Reactivos y condiciones de amplificación para la PCR específica del tipo del apareamiento A2.

Reactivos	Concentración final	Condiciones de amplificación
ADN (10 ng/μl)	20 ng	
Buffer de reacción 10x	1x	94 °C- 5 min
MgCl ₂ (100 mM)	2 mM	$\left[\begin{array}{l} 94\text{ °C}- 30\text{ s} \\ 59\text{ °C}- 30\text{ s} \\ 72\text{ °C}- 1\text{ min} \end{array} \right] \times 35\text{ ciclos}$
dNTPs (2,5 mM)	125 μM	
Cebador PHYB-1 (10 μM)	0,5 μM	
Cebador PHYB-2 (10 μM)	0,5 μM	72 °C- 10 min
<i>Taq</i> Polimerasa (5 U/μl)	1 U	
H ₂ O	Hasta 20 μl	

➤ **PCR con cebadores para marcadores CAPS**

Se amplificó el ADN de los aislados mediante PCR, utilizando los cebadores W16-1 y W16-2 (Tabla 3.7), que permiten identificar fragmentos de 600 pb en los dos tipos de apareamiento simultáneamente (Judelson *et al.*, 1995).

Tabla 3.7. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR para marcadores CAPS.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Tamaño del fragmento amplificado
W16-1	5'- AAC ACG CAC AAG GCA TAT AAA TCT A- 3'	600 pb
W16-2	5'- GCG TAA TGT AGC GTA ACA GCT CTC- 3'	

Del mismo modo, se utilizaron los componentes de la reacción de PCR y las condiciones de amplificación descritas por Kim y Lee (2002), modificando éstas últimas para optimizar el proceso (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Reactivos y condiciones de amplificación para la PCR para marcadores CAPS.

Reactivos	Concentración final	Condiciones de amplificación
ADN (10 ng/μl)	10 ng	
Buffer de reacción 10x	1x	
MgCl ₂ (100 mM)	2 mM	94 °C- 5 min
dNTPs (2,5 mM)	200 μM	$\left[\begin{array}{l} 94\text{ °C}- 30\text{ s} \\ 61\text{ °C}- 30\text{ s} \\ 72\text{ °C}- 30\text{ s} \end{array} \right] \times 30\text{ ciclos}$
Cebador W16-1 (10 μM)	0,5 μM	
Cebador W16-2 (10 μM)	0,5 μM	
<i>Taq</i> Polimerasa (5 U/μl)	1 U	72 °C- 10 min
H ₂ O	Hasta 50 μl	

Para detectar el polimorfismo entre los dos tipo de apareamiento, se realizó una digestión al producto de PCR con la enzima de restricción *HaeIII* (5'-GG↓CC-3' 3'-CC↑GG-5') a 37 °C durante 1 h, aplicando las condiciones descritas en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Reactivos y condiciones de la digestión del producto de PCR para marcadores CAPS.

Reactivos	Condiciones de digestión
10 μl Producto de PCR	
2 μl Buffer de reacción 10x	1 h, 37 °C
1 μl Enzima de restricción <i>HaeIII</i>	↓
H ₂ O (Hasta 20 μl)	Hielo

En aislados del tipo de apareamiento A2, esta enzima digirió el segmento de 600 pb en un fragmento de 550 pb. Sin embargo, para el tipo A1, se produjo dos fragmentos de 600, 550 pb.

Para la separación de las bandas se utilizó un gel de agarosa al 2% (p/v), cargando un total de 23 µl: 15 µl del master mix + 5 µl del producto de PCR + 3 µl del tampón de carga.

3.2.3. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS AISLADOS

Para determinar la estructura genética se realizó la identificación de haplotipos mitocondriales (mtDNA) y el genotipado con marcadores microsatélites (SSR).

3.2.3.1. Determinación de haplotipos mitocondriales (mtDNA)

Los haplotipos mitocondriales de los aislados se determinaron mediante la técnica PCR-RFLP utilizando cuatro pares de cebadores (P1, P2, P3 y P4), diseñados por Griffith y Shaw, (1998). Posteriormente, se realizó una digestión de los productos de amplificación, permitiendo identificar los cuatro haplotipos Ia, IIa, Ib y IIb, descritos para *P. infestans* (Carter *et al.*, 1990) mediante visualización en gel de agarosa al 2% (p/v).

Las secuencias de estos cebadores y el tamaño de los fragmentos generados aparecen en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR para la determinación de los haplotipos mitocondriales.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Tamaño del fragmento amplificado
P1-F	5'-GCA ATG GGT AAA TCG GCT CAA-3'	1118 pb
P1-R	5'-AAA CCA TAA GGA CCA CAC AT-3'	
P2-F	5'-TTC CCT TTG TCC TCT ACC GAT-3'	1070 pb
P2-R	5'-TTA CGG CGG TTT AGC ACA TAC A-3'	
P3-F	5'-ATG GTA GAG CGT GGG AAT CAT-3'	1308 pb
P3-R	5'-AAT ACC GCC TTT GGG TCC ATT-3'	
P4-F	5'-TGG TCA TCC AGA GGT TTA TGT T-3'	964 pb
P4-R	5'-CCG ATA CCG ATA CCA GCA CCA A-3'	

Se emplearon los reactivos de PCR y condiciones de amplificación descritas por Griffith y Shaw, (1998) con algunas modificaciones para optimizar el proceso (Tablas 3.11 y 3.12).

Tabla 3.11. Reactivos y condiciones de amplificación de la PCR para los cebadores P1, P2 y P4.

Reactivos	Concentración final	Condiciones de amplificación
ADN (10 ng/μl)	20 ng	
Buffer de reacción 10x	1x	94 °C- 2 min
dNTPs (2,5 mM)	200 μM	$\left[\begin{array}{l} 94\text{ °C- }40\text{ s} \\ 55\text{ °C- }1\text{ min} \\ 72\text{ °C- }90\text{ s} \end{array} \right] \times 40\text{ ciclos}$
Cebadores P1, P2, P4(F) (10 μM)	0,6 μM	
Cebadores P1, P2, P4 (R) (10 μM)	0,6 μM	
<i>Taq</i> Polimerasa (5 U/μl)	1 U	72 °C- 5 min
H ₂ O	Hasta 25 μl	

Tabla 3.12. Reactivos y condiciones de amplificación de la PCR para el cebador P3.

Reactivos	Concentración final	Condiciones de amplificación
ADN (10 ng/μl)	20 ng	
Buffer de reacción 10x	1x	94 °C- 2 min
dNTPs (2,5 mM)	200 μM	$\left[\begin{array}{l} 94\text{ °C- }40\text{ s} \\ 56\text{ °C- }1\text{ min} \\ 72\text{ °C- }90\text{ s} \end{array} \right] \times 40\text{ ciclos}$
Cebador P3(F) (10 μM)	0,4 μM	
Cebador P3 (R) (10 μM)	0,4 μM	
<i>Taq</i> Polimerasa (5 U/μl)	1 U	72 °C- 5 min
H ₂ O	Hasta 25 μl	

Los fragmentos obtenidos con los cebadores P1 fueron digeridos con la enzima *Cfo*I (5'-GCG/C-3'). Los generados con los cebadores P2 se empleó la enzima *Msp*I (5'-C/CGG-3'). Finalmente, para los productos P3 y P4 se aplicó la enzima *Eco*RI (5'-G/AATTC-3'). Las condiciones para la reacción de digestión aparecen descritas en la Tablas 3.13, 3.14 y 3.15.

Tabla 3.13. Reactivos y condiciones para la digestión del producto de PCR con *CfoI*.

Reactivos	Condiciones de digestión
5 µl Producto de PCR	
2 µl Buffer de reacción 10x	15 min, 37 °C
0,1 µl Enzima de restricción <i>CfoI</i>	↓
H ₂ O (hasta 20 µl)	Hielo

El número y tamaño de los fragmentos generados por las enzimas de restricción dependieron de la frecuencia de ocurrencia del sitio de reconocimiento del ADN digerido.

Tabla 3.14. Reactivos y condiciones para la digestión del producto de PCR con *MspI*.

Reactivos	Condiciones de digestión
5 µl Producto de PCR	
2 µl Buffer de reacción 10x	5 min, 37 °C
0,8 µl Enzima de restricción <i>MspI</i>	↓
H ₂ O (hasta 20 µl)	Hielo

Tabla 3.15. Reactivos y condiciones para la digestión del producto de PCR con *EcoRI*.

Reactivos	Condiciones de digestión
5 µl Producto de PCR	
2 µl Buffer de reacción 10x	20 min, 37 °C
0,7 µl Enzima de restricción <i>EcoRI</i>	↓
H ₂ O (hasta 20 µl)	Hielo

Los resultados fueron visualizados en gel de agarosa al 2% (p/v), con la siguiente composición: 2 g de agarosa (D1 low EEO-Conda), 3 µl GelRed™ (Biotium-10.000X) y 100 ml TAE 1X (40 mM Tris-Acetato pH 8; 1 mM EDTA). El tampón de carga utilizado fue Ficoll 10X, y el marcador de peso molecular Hyperladder II.

La migración de los productos de amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis de agarosa a 100 v, y la visualización bajo luz UV del ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad. El tamaño del fragmento de las bandas tras la digestión aparece descrito en la tabla 3.16.

Tabla 3.16. Tamaños de los fragmentos generados tras la digestión de los cuatro productos de PCR.

Cebador	Enzima de restricción	Tamaño del fragmento (pb)			
		Ia	IIa	Ib	IIb
P1-F/R	<i>CfoI</i>	907	1118	907	1118
		211		211	
P2-F/R	<i>MspI</i>	720	720	641	720
		350	203	350	350
P3-F/R	<i>EcoRI</i>	1078	1308	1078	1308
		230		230	
P4-F/R	<i>EcoRI</i>	394	603	394	603
		361	361	361	361
		209		209	

3.2.3.2. Genotipado con marcadores microsatélites (SSR)

Se utilizaron los 12 marcadores SSR polimórficos siguientes: *Pi4B* y *PiG11* (Knapova *et al.*, 2001), *Pi02*, *Pi04*, *Pi63*, *Pi70* y *D13* (Lees *et al.*, 2006); *PinfSSR2*, *PinfSSR4*, *PinfSSR6*, *PinfSSR8*, *PinfSSR11* (Li *et al.*, 2010).

3.2.3.3. Reacción de PCR multiplex

Las condiciones de reacción se optimizaron para asegurar una amplificación satisfactoria siguiendo el protocolo Li *et al.* (2013). Para ello, se determinó la concentración óptima de cada par de cebadores. Se ajustó una concentración final de los mismos en la mezcla de reacción que varió de 0,05 μ M a 0,3 μ M (Tabla 3.17). De todos los cebadores se preparó un stock de 10 mM, alicuotadas en 20 μ l y congeladas a -20 °C. La amplificación de los 12 marcadores SSR se realizó por PCR multiplex, con un volumen de 20 μ l: 10 η g de ADN, 200 μ M de cada dNTPs, 0,08 U Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics, Leiden), 50 mM KCl y 1,5 mM MgCl₂. Se utilizó el kit Qiagen

múltiple PCR (Qiagen, Cat. No. 206145), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC200 (MJ Research, Waltham), con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 min, seguida de 30 ciclos de 95 °C - 20 s, 58 °C - 90 s y 72 °C - 60 s, con una extensión final de 72 °C durante 20 min. Los 12 loci SSR en la PCR multiplex se amplificaron en un secuenciador automatizado de intensidad de fluorescencia ABI-3730 (Applied Biosystems) con un rango de 500 a 5000 unidades de fluorescencia relativa. Para determinar el locus de cada genotipo se utilizaron cuatro marcadores fluorescentes (FAM, NED, CIV, y PET de Applied Biosystems) y un estándar LIZ marcado para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

Tabla 3.17. Cebadores SSR y concentración final empleada en la PCR multiplex.

SSR Locus	Secuencia de los cebadores	Tamaño del fragmento pb	Fluorescencia	Concentración final (µM)
<i>Pi02</i>	F: 5'-CAG CCT CCG TGC AAG A-3' R: 5'-AAG GTG CGC GAA GAC C-3'	142-166	NED	0,05 0,05
<i>Pi04</i>	F: 5'-AGC GGC TTA CCG ATG G-3' R: 5'-CAG CGG CTG TTT CGA C-3'	162-170	VIC	0,05 0,05
<i>Pi63</i>	F: 5'-ATG ACG AAG ATG AAA GTG AGG-3' R: 5'-ATT CAT TAT TGG CAA TGT TGG-3'	265-280	VIC	0,05 0,05
<i>Pi70</i>	F: 5'-ATG AAA ATA CGT CAA TGC TCG-3' R: 5'-CGT TGG ATA TTT CTA TTT CTT CG-3'	189-195	VIC	0,16 0,05
<i>Pi4B</i>	F: 5'-AAA ATA AAG CCT TTG GTT CA-3' R: 5'-GCA AGC GAG GTT TGT AGA TT-3'	200-295	PET	0,3 0,3
<i>PiG11</i>	F: 5'-TGC TAT TTA TCA AGC GTG GG-3' R: 5'-TTT CAA TCT GCA GCC GTA AGA-3'	130-180	NED	0,05 0,05
<i>D13</i>	F: 5'-TGC CCC CTG CTC ACT C-3' R: 5'-GCT CGA ATT CAT TTT ACA GAC TTG-3'	100-185	FAM	0,05 0,05
<i>PinfSSR2</i>	F: 5'-CGA CTT CTA CAT CAA CCG GC-3' R: 5'-GTT TGC TTG GAC TGC GTC TTT AGC-3'	165-180	PET	0,05 0,05
<i>PinfSSR4</i>	F: 5'-TCT TGT TCG AGT ATG CGA CG-3' R: 5'-GTT TCA CTT CGG GAG AAA GGC TTC-3'	280-305	FAM	0,05 0,05
<i>PinfSSR6</i>	F: 5'-GTT TTG GTG GGG CTG AAG TTT T-3' R: 5'-TCG CCA CAA GAT TTA TTC CG-3'	230-250	VIC	0,05 0,05
<i>PinfSSR8</i>	F: 5'-AAT CTG ATC GCA ACT GAG GG-3' R: 5'-GTT TAC AAG ATA CAC ACG TCG CTC C-3'	250-275	FAM	0,05 0,05
<i>PinfSSR11</i>	F: 5'-TTA AGC CAC GAC ATG AGC TG-3' R: 5'-GTT TAG ACA ATT GTT TTG TGG TCG C-3'	325-360	NED	0,3 0,3

3.2.3.4. Análisis de datos

Se determinó el valor del Contenido de Información Polimórfica (PIC) como indicador del polimorfismo de cada marcador. Se aplicó la siguiente ecuación con valores con rango entre 0 y 1 (Anderson *et al.*, 1993):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

donde:

k = es el número total de alelos detectados para un marcador de SSR

P_i = es la frecuencia del i -ésimo alelo

Los alelos identificados se puntuaron como presencia (1) y ausencia (0) para todos los genotipos. Se calculó el coeficiente de similitud de Dice (Barandalla *et al.*, 2006).

El análisis de grupos se realizó aplicando el método jerarquizado de promedios aritméticos no ponderados entre grupos por pares UPGMA (Ruíz de Galarreta *et al.*, 2011) con el software NTSYS-PC (Rohlf, 2001).

Se calculó el coeficiente de correlación cofenética entre la matriz del dendograma y la matriz original de similitud con el fin de medir la bondad del ajuste aplicando el test de Mantel (Mantel, 1967).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS

3.3.1.1. Tipo de apareamiento mediante cruzamiento *in vitro*.

El apareamiento realizado entre las dos cepas de referencia con los diferentes aislados evidenció la existencia de los tipos *A1* y *A2*, con unos valores del 44,2 % y el 55,8 %, respectivamente.

En el apareamiento de los aislados con la cepa control *A1* se observó la aparición de oosporas, confirmando que éstos pertenecían al tipo *A2* (Figuras 3.4 -A y B). Sin embargo, cuando se cruzaron estos aislados con la cepa control *A2*, formaron muy poca o ninguna estructura sexual reproductiva.

Se observó muy poca formación de oosporas, el cual no mostró pared definida ni presentó desarrollo completo, por lo que no eran viables. Por otro lado, los aislados evaluados con la cepa control *A2* desarrollaron oosporas evidenciando que éstos pertenecían al tipo de apareamiento *A1*.

Cabe resaltar que las oosporas se formaron cuando aislados de diferente tipo *A1* y *A2*, crecían juntos formando uno de ellos células masculinas o anteridios y la otra, células femeninas u oogonios. Estos últimos se desarrollaron a través del anteridio para producir la fertilización. Después de esto, el oogonio se convirtió en una oospora diploide uninucleada.

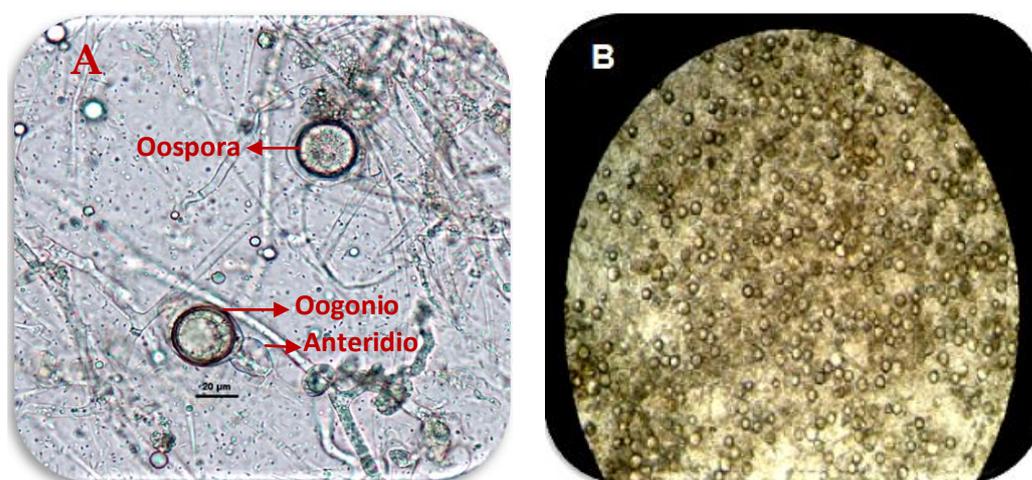


Figura 3.4. A: Reacción de compatibilidad entre los dos tipos de apareamiento complementarios. B: Formación de oosporas.

3.3.1.2. Tipo de apareamiento mediante técnicas moleculares

➤ PCR con cebadores específicos para el tipo de apareamiento *A1*

La Figura 3.5 muestra los fragmentos amplificados a 1400 pb con los cebadores S1A y S1B para la detección de aislados de tipo de apareamiento *A1*.

En el caso de la cepa de referencia *A2* no se observó ninguna banda, debido a que el gen *S1*, solo está presente en el tipo de apareamiento *A1*.

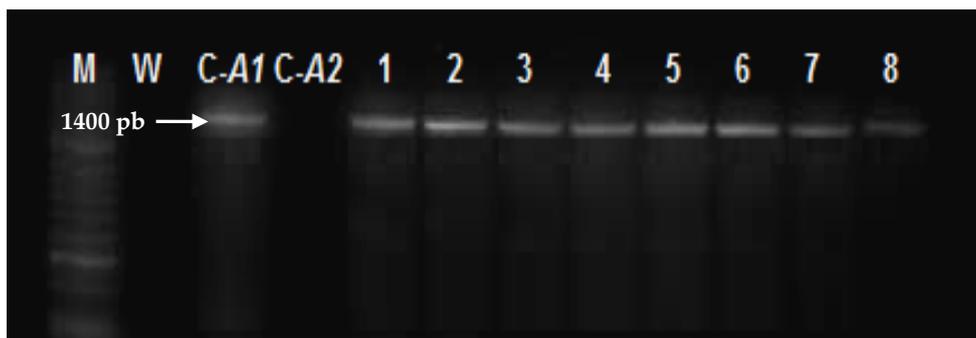


Figura 3.5. Patrones moleculares identificados con el tipo de apareamiento A1. Fragmentos obtenidos mediante la técnica PCR. **M:** Marcador de peso molecular. **W:** Control negativo (agua). **C-A1** y **C-A2:** Cepas de referencia. **Muestras del 1 al 8:** Aislados A1 de *P. infestans* caracterizados.

➤ **PCR con cebadores específicos para el tipo de apareamiento A2**

Los aislados de tipo de apareamiento A2 con los cebadores PHYB-1 y PHYB-2, amplificaron fragmentos a 347 pb, y mostraron un claro polimorfismo entre las cepas de referencia A1 y A2 (Figura 3.6). Se puede observar en el control (C-A1) y los aislados A1 la ausencia de bandas, confirmando la especificidad de los cebadores empleados para la identificación del tipo A2.

Todos los aislados procedentes de las provincias de Tenerife y Orense correspondieron a este tipo de apareamiento.

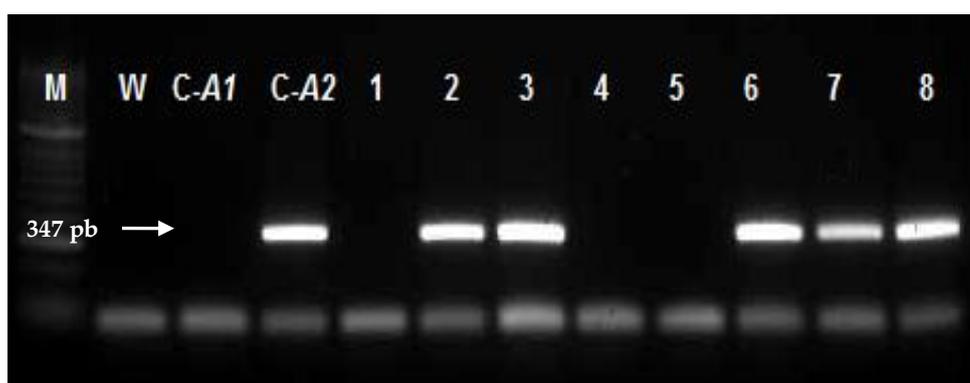


Figura 3.6. Patrones moleculares identificados con el tipo de apareamiento A2. Fragmentos obtenidos mediante la técnica PCR. **M:** Marcador de peso molecular. **W:** Control negativo (agua). **C-A1** y **C-A2:** Cepas de referencia. **Muestras 1, 4 y 5:** Aislados del tipo A1. **Muestras 2, 3, 6, 7 y 8:** Aislados del tipo A2 de *P. infestans* caracterizados.

➤ PCR con cebadores para marcadores CAPS

Se probaron los marcadores CAPS para detectar ambos tipos de apareamiento simultáneamente. Las cepas de referencia mostraron un polimorfismo evidente, visualizando para el control *A1* dos fragmentos de 600, 550 pb, frente al *A2*, con una única banda de 550 pb (Figura 3.7). De esta forma, se confirmó la presencia de ambos tipos de apareamiento en los aislados caracterizados con una única reacción.

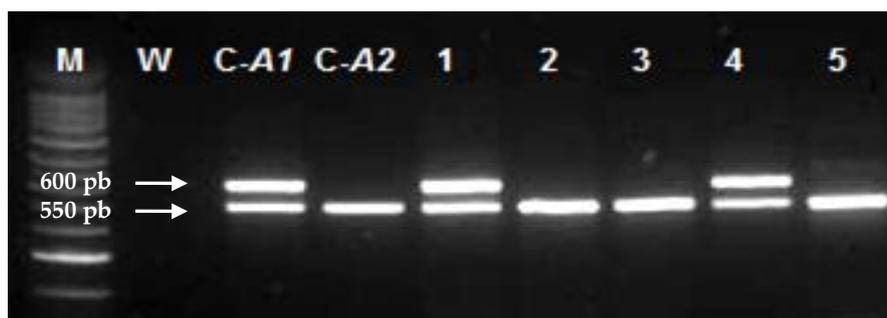


Figura 3.7. Patrones moleculares identificados con los tipos de apareamiento. *A1* y *A2*. Fragmentos obtenidos mediante la técnica CAPS. **M:** Marcador de peso molecular. **W:** Control negativo (agua). **C-A1** y **C-A2:** Cepas de referencia. **Muestras 1 y 4:** Aislados del tipo *A1*. **Muestras 2, 3 y 5:** Aislados del tipo *A2* de *P. infestans* tras la digestión.

Las técnicas moleculares empleadas determinaron igualmente unos porcentajes del 44,2% para el tipo de apareamiento *A1* y el 55,8% para el tipo *A2*. (Tabla 3.18).

3.3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS AISLADOS

3.3.2.1. Determinación de haplotipos mitocondriales (mtDNA)

Los productos amplificados correspondieron con tamaños de 1118 pb para P1, 1070 pb para P2, 1308 pb para P3 y 964 pb para P4.

Al realizarse la digestión de cada amplicón con las enzimas *CfoI*, *MspI* y *EcoRI*, se encontró que 51 aislados mostraron un patrón correspondiente al haplotipo mitocondrial Ia, mientras que sólo el aislado CAD-001-05 presentó el haplotipo IIa.

Tabla 3.18. Identificación del tipo de apareamiento del conjunto de los aislados.

Aislados	Tipo de apareamiento	Provincia
TEN-001-11	A2	Tenerife
TEN-002-11	A2	Tenerife
TEN-003-11	A2	Tenerife
TEN-004-11	A2	Tenerife
TEN-005-11	A2	Tenerife
TEN-006-11	A2	Tenerife
TEN-007-11	A2	Tenerife
ORE-001-11	A2	Orense
ORE-002-11	A2	Orense
ORE-003-11	A2	Orense
ALA-001-11	A2	Álava
ALA-002-11	A2	Álava
ALA-001-12	A2	Álava
ALA-001-13	A1	Álava
ALA-002-13	A1	Álava
ALA-003-13	A1	Álava
ALA-004-13	A2	Álava
CAD-001-13	A2	Cádiz
CAD-002-13	A2	Cádiz
CRE-001-04	A1	Ciudad Real
CRE-002-04	A1	Ciudad Real
CRE-003-04	A1	Ciudad Real
CRE-004-04	A1	Ciudad Real
SEV-001-05	A1	Sevilla
SEV-002-05	A1	Sevilla
CAD-001-05	A2	Cádiz
CAD-002-05	A1	Cádiz
CAD-003-05	A1	Cádiz
JAE-001-04	A1	Jaén
CAD-001-04	A1	Cádiz
CAD-002-04	A1	Cádiz
CAD-003-04	A1	Cádiz
SEV-001-04	A1	Sevilla
SEV-002-04	A2	Sevilla
SEV-003-04	A2	Sevilla
SEV-004-04	A1	Sevilla
COR -001-04	A1	Córdoba
CAD-004-04	A2	Cádiz
CAD-005-04	A2	Cádiz
CAD-006-04	A1	Cádiz
CAD-007-04	A2	Cádiz
CAD-008-04	A2	Cádiz
CAD-009-04	A1	Cádiz
CAD-010-04	A2	Cádiz
CAD-011-04	A2	Cádiz
CAD-012-04	A1	Cádiz
CAD-013-04	A2	Cádiz
CAD-014-04	A2	Cádiz
CAD-015-04	A1	Cádiz
CAD-016-04	A2	Cádiz
CAD-017-04	A1	Cádiz
SEV-001-03	A2	Sevilla

De esta forma los fragmentos de restricción del haplotipo Ia fueron: 907-211 pb; 720-350 pb; 1078-230 pb y 394-361-209 pb, para los amplicones P1, P2, P3 y P4 respectivamente (Figura 3.8)

Por otro lado para el haplotipo IIa los patrones obtenidos fueron de 1118 pb; 720-203-147 pb; 1308 pb; 603-361 pb para los amplicones P1, P2, P3 y P4, respectivamente. Estos resultados confirman que el 98,1% de los aislados fueron del tipo Ia mientras que el 1,9% correspondió al tipo IIa.

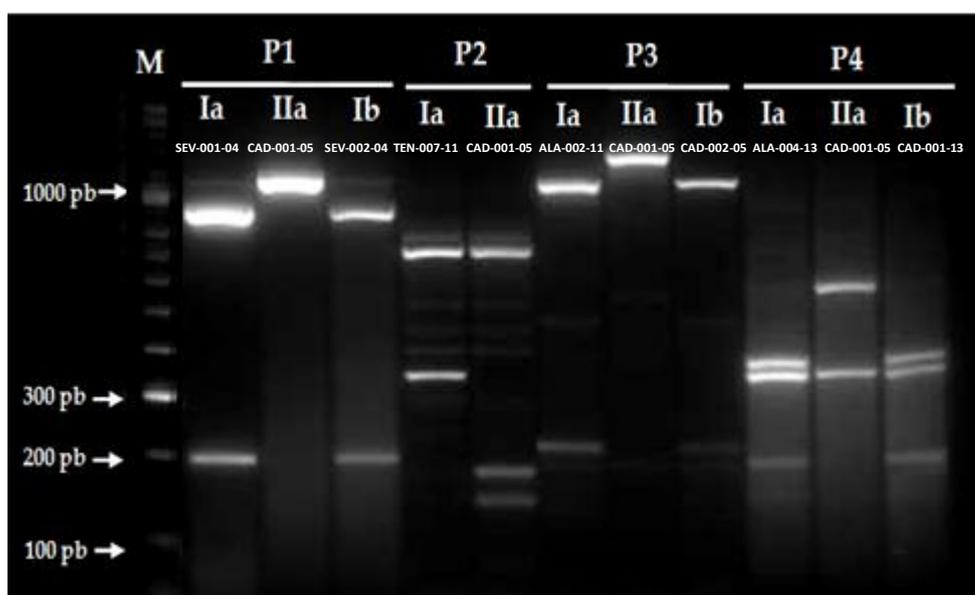


Figura 3.8. Fragmentos obtenidos mediante la técnica PCR-RFLP. M: Marcador de peso molecular. P1, P2, P3 y P4: cebadores específicos para cada región mitocondrial. Ia, Ib y IIa: Haplotipos mitocondriales identificados con cada cebador tras la digestión.

Con la enzima de restricción *CfoI* y el primer P1, fue posible discriminar entre IIa y IIb (fragmento no digerido de 1118 pb); Ia y Ib (fragmentos de 907 y 211 pb).

Respecto a la enzima *MspI* y el primer P2, se puede identificar entre los haplotipos Ia y IIb (fragmentos de 720 y 350 pb) y IIa (fragmentos de 720, 203 y 147 pb).

Por su parte, con la enzima *EcoRI* y el primer P3, era posible discriminar entre Ia y Ib (fragmentos de 1078 y 230 pb), IIa y IIb (fragmento de 1308 pb).

Por último con *EcoRI* el primer P4, se puede identificar entre los haplotipos Ia y Ib (fragmentos de 394, 361 y 209 pb) además de IIa y IIb (fragmentos de 603 y 361 pb).

3.3.2.2. Genotipado con marcadores microsatélites (SSR)

Los resultados del análisis mostraron un total de 52 alelos para los 12 loci microsatélites utilizados. Como aparece en la Tabla 3.19, todos los SSR analizados presentaron polimorfismos, variando el número de alelos por locus entre 2 para *Pi70* y *PinfSSR2* hasta 9 para *PiG11*. Las frecuencias alélicas se calcularon por conteo simple, mediante la división entre el número de alelos obtenidos y la sumatoria de éstos.

Los valores obtenidos del Contenido de Información Polimórfica (PIC) indicaron que el microsatélite menos polimórfico fue *PinfSSR2* con un PIC de 0,04, frente al más polimórfico *PinfSSR4* con un valor de 0,80.

La Tabla 3.20, muestra el número de alelos por aislado y el genotipo identificado de cada uno de ellos. Se observa que el aislado ALA-002-13 presentó 26 alelos, siendo la cifra más elevada frente a ALA-003-13, con el menor número, correspondiendo un total de 17 alelos.

Tabla 3.19. Polimorfismos detectados con marcadores microsatélites (SSR).

SSR	Fragmentos	Alelos detectados (en pb) y su frecuencia absoluta (entre paréntesis)	PIC
<i>Pi02</i>	5	258 (23) 264 (1) 266 (18) 268 (51) 272 (1)	0,61
<i>Pi04</i>	4	160 (1) 166 (49) 168 (1) 170 (50)	0,52
<i>Pi63</i>	3	270 (34) 273 (39) 279 (52)	0,66
<i>Pi70</i>	2	192 (52) 195 (29)	0,46
<i>Pi4B</i>	3	205 (16) 213 (29) 217 (33)	0,64
<i>PiG11</i>	9	142 (1) 150 (1) 154 (45) 156 (12) 160 (26) 164 (2) 166 (1) 206 (22) 208 (1)	0,73
<i>D13</i>	8	118 (12) 134 (2) 136 (47) 140 (6) 152 (1) 154 (12) 156 (1) 158 (3)	0,64
<i>PinfSSR2</i>	2	173 (52) 175 (1)	0,04
<i>PinfSSR4</i>	7	284 (29) 288 (33) 290 (22) 292 (22) 294 (29) 296 (1) 298 (1)	0,80
<i>PinfSSR6</i>	3	240 (16) 242 (35) 244 (50)	0,61
<i>PinfSSR8</i>	3	260 (48) 264 (21) 266 (51)	0,63
<i>PinfSSR11</i>	3	331 (13) 341 (50) 355 (22)	0,56
TOTAL	52		

La Figura 3.9 muestra la evolución de los genotipos, identificados por Cooke y Andersson (2013), donde se observa que la estructura genética predominante en los últimos 10 años en Europa, corresponde al genotipo Blue 13 (13_A2) con un 70%, muy agresivo y resistente al Metalaxyl.

En dicho gráfico se ha encuadrado el conjunto de aislados caracterizados en el presente estudio. Tres de ellos, ALA-001-12, ORE-003-11 y TEN-002-11 con tipo de apareamiento A2 y procedentes de Álava, Orense y Tenerife mostraron el genotipo 13_A2 o Blue 13. Dicho genotipo es actualmente el más agresivo en Europa y fue descrito por primera vez en el año 2005, desplazando a otras poblaciones que existían hasta esa fecha.

Se han identificado también 12 aislados de Álava, Cádiz Orense y Tenerife como variantes de Blue 13 (13_A2). Ésta es una variación menor en el clon, como ocurre en otros países europeos como Reino Unido que cuenta con más de 100 variaciones de este genotipo.

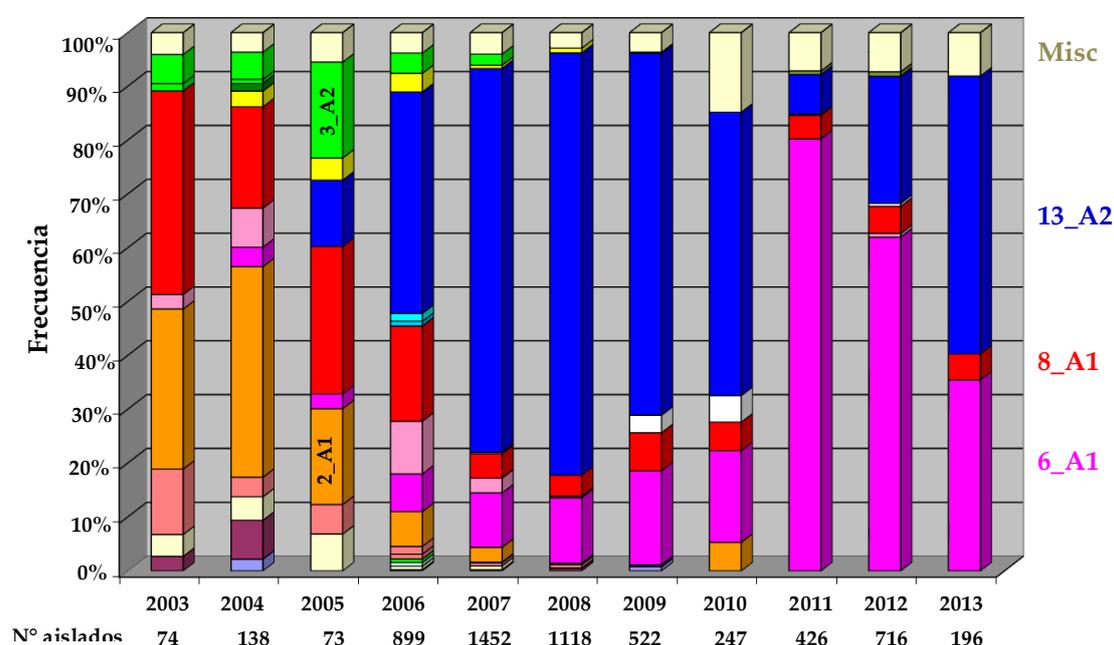


Figura 3.9. Evolución de los genotipos dominantes en Europa identificados mediante marcadores SSR durante el período 2003-2013. (Cooke y Andersson, 2013).

La Figura 3.10 muestra la distribución de los genotipos identificados en las zonas prospectadas en España. Destacamos la presencia de Blue 13 y variantes en las provincias de Álava, Cádiz, Orense y Tenerife. Así como también los Misc (A1 y A2) para las provincias de Álava y Cádiz.

La Figura 3.11 muestra el porcentaje de cada genotipo identificado en las localidades prospectadas. Se observa en un 100% los Misc (A1 y A2), esto debido a que se encontró un aislado en cada provincia (Álava y Cádiz) respectivamente, por otro lado el genotipo 3_A2 está presente en un 75% en Cádiz y un 25% en Sevilla, sin embargo Blue 13 (13_A2 y variantes) se observa en un 25% en Álava, 12,5% en Cádiz, 18,8% en Orense y un 43,8% en Tenerife.

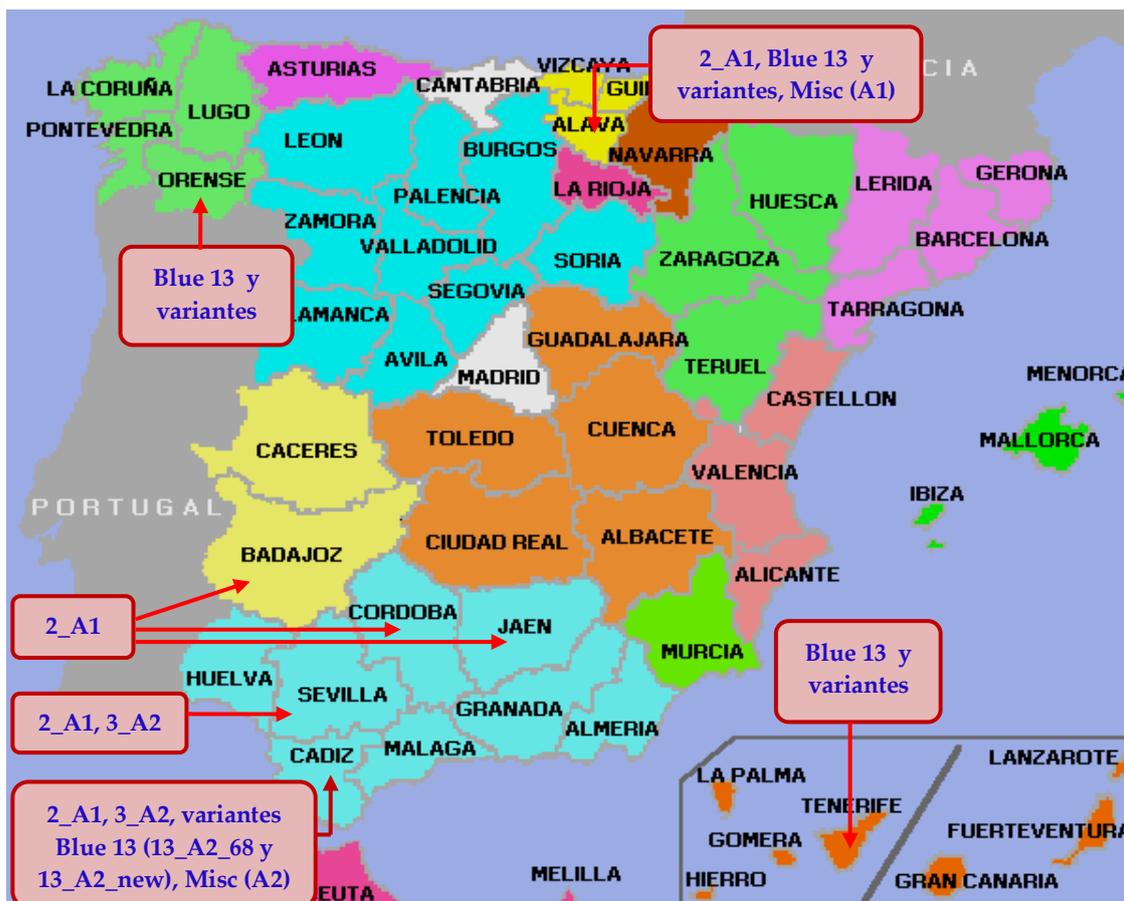


Figura 3.10. Ubicación geográfica de los genotipos de *P. infestans* presentes en España.

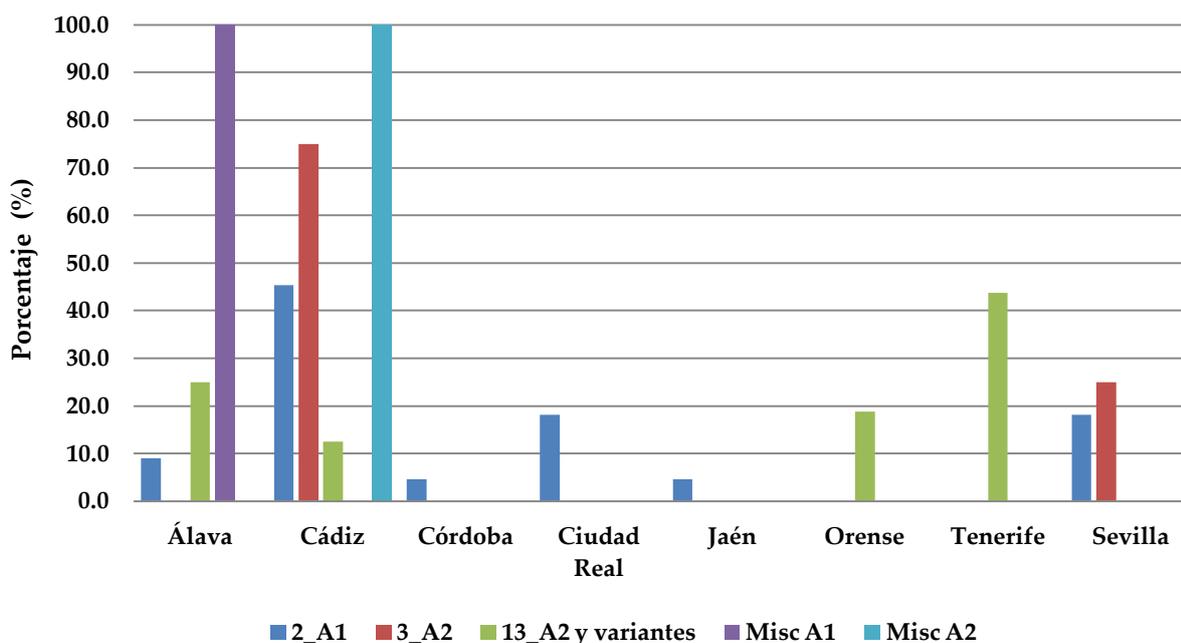


Figura 3.11. Porcentajes de los genotipos de *P. infestans* por localidades.

La Figura 3.12 presenta el porcentaje del genotipo identificado por marcadores microsatélites en el conjunto de los 52 aislados caracterizados. Se puede observar que el genotipo 2_A1 se encontró en mayor proporción en España con un 42,3%, seguido del genotipo Blue 13 (13_A2 y variantes) con un 30,8%.

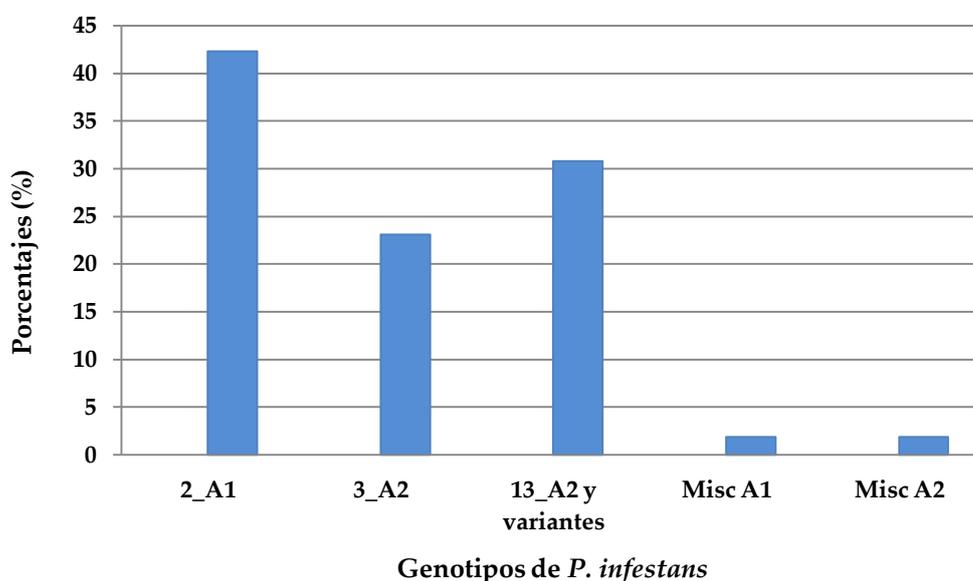


Figura 3.12. Proporción de los genotipos presentes en los 52 aislados de *P. infestans*.

Los resultados obtenidos también muestran que 22 aislados de Álava, Cádiz, Ciudad Real, Córdoba, Jaén y Sevilla correspondieron al genotipo 2_A1, pertenecientes al tipo de apareamiento A1 y que ha estado presente en Europa durante mucho tiempo, no mostrando cambios significativos en su estructura genética.

Asimismo, se ha identificado una nueva variante denominado 13_A2_new correspondiente al aislado CAD-002-13 procedente de Cádiz y con tipo de apareamiento A2. Otros 12 aislados A2 originarios de las localidades de Cádiz y Sevilla han mostrado el genotipo 3_A2. Estos coinciden en su estructura genética con el tipo A2 que ha estado presente en Reino Unido en los años 2005 y 2006.

Por último se pueden observar dos aislados ALA-003-13 y CAD-001-05, denominados Misc, los cuales no coinciden con lo existente actualmente en Europa, lo que podría significar que se hayan originado mediante recombinación sexual.

La Figura 3.13 muestra el dendograma obtenido del análisis de grupos realizado con el conjunto de los aislados. El coeficiente de correlación cofenética

Tabla 3.20. Número de alelos y genotipos identificados mediante el análisis con SSRs.

Código	Tipo de apareamiento	Localidad	Número de alelos detectados	Genotipo
ALA-001-13	A1	Álava	25	2_A1
ALA-002-13	A1	Álava	26	2_A1
CAD-002-05	A1	Cádiz	23	2_A1
CAD-003-05	A1	Cádiz	25	2_A1
CAD-006-04	A1	Cádiz	24	2_A1
CAD-009-04	A1	Cádiz	24	2_A1
CAD-012-04	A1	Cádiz	24	2_A1
CAD-015-04	A1	Cádiz	23	2_A1
CAD-017-04	A1	Cádiz	24	2_A1
CAD-001-04	A1	Cádiz	24	2_A1
CAD-002-04	A1	Cádiz	24	2_A1
CAD-003-04	A1	Cádiz	25	2_A1
COR-001-04	A1	Córdoba	22	2_A1
CRE-001-04	A1	Ciudad Real	23	2_A1
CRE-002-04	A1	Ciudad Real	24	2_A1
CRE-003-04	A1	Ciudad Real	24	2_A1
CRE-004-04	A1	Ciudad Real	24	2_A1
JAE-001-04	A1	Jaén	24	2_A1
SEV-001-05	A1	Sevilla	24	2_A1
SEV-001-04	A1	Sevilla	25	2_A1
SEV-002-05	A1	Sevilla	22	2_A1
SEV-004-04	A1	Sevilla	25	2_A1
CAD-004-04	A2	Cádiz	20	3_A2
CAD-005-04	A2	Cádiz	23	3_A2
CAD-007-04	A2	Cádiz	22	3_A2
CAD-008-04	A2	Cádiz	23	3_A2
CAD-010-04	A2	Cádiz	20	3_A2
CAD-011-04	A2	Cádiz	23	3_A2
CAD-013-04	A2	Cádiz	22	3_A2
CAD-014-04	A2	Cádiz	23	3_A2
CAD-016-04	A2	Cádiz	23	3_A2
SEV-001-03	A2	Sevilla	23	3_A2
SEV-002-04	A2	Sevilla	21	3_A2
SEV-003-04	A2	Sevilla	20	3_A2
ALA-001-12	A2	Álava	22	13_A2
ORE-003-11	A2	Orense	23	13_A2
TEN-002-11	A2	Tenerife	20	13_A2
ALA-002-11	A2	Álava	21	13_A2_1
TEN-003-11	A2	Tenerife	21	13_A2_1
TEN-004-11	A2	Tenerife	21	13_A2_1
TEN-005-11	A2	Tenerife	22	13_A2_1
TEN-006-11	A2	Tenerife	21	13_A2_1
ORE-001-11	A2	Orense	23	13_A2_2
ORE-002-11	A2	Orense	22	13_A2_2
TEN-001-11	A2	Tenerife	21	13_A2_3
TEN-007-11	A2	Tenerife	20	13_A2_3
ALA-001-11	A2	Álava	21	13_A2_4
ALA-004-13	A2	Álava	21	13_A2_15
CAD-001-13	A2	Cádiz	23	13_A2_68
CAD-002-13	A2	Cádiz	21	13_A2_new
ALA-003-13	A1	Álava	17	Misc
CAD-001-05	A2	Cádiz	19	Misc

fue de 0,89 lo que indicó una elevada bondad del ajuste entre la matriz de distancias y el dendograma obtenido.

Observando los coeficientes de fusión se han generado 5 grupos. El grupo I corresponde al genotipo Blue 13 y sus variantes clonales mostrando mucha similitud entre ellas.

El grupo II engloba al genotipo Misc A2 que se separa totalmente del resto y se encuentra entre los que forman parte del grupo I y los genotipos 3_A2, que conforman el grupo III.

El grupo IV está formado por el conjunto perteneciente al genotipo 2_A1 y con el mayor número de aislados. El último grupo V está formado únicamente por un aislado del genotipo Misc A1 el cual se separa claramente del resto de los aislados caracterizados y muy distantes del Misc A2.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS

La aplicación de los marcadores moleculares en la determinación del tipo de apareamiento supone un avance en la caracterización de *P. infestans* por su menor tiempo y mayor precisión frente a la identificación *in vitro*. En el presente estudio se han empleado tres tipos de cebadores: los específicos para el tipo A1, tipo A2 y CAPS. Éstos últimos han sido capaces de distinguir simultáneamente los dos tipos de apareamiento, en un mismo gel de agarosa, lo que facilita el análisis e identificación de los mismos. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la identificación molecular por primera vez en España de ambos tipos de apareamiento A1 y A2. Segura *et al.* (2007) identificaron por cruzamiento *in vitro* ambos tipos en aislados de tomate y patata procedentes de Andalucía. Hasta 1980 sólo el tipo A1 fue reconocido en todo el mundo. Posteriormente, se han descrito poblaciones de *P. infestans* con los dos tipos de apareamiento en varios países europeos como Suiza (Hohl y Iselin, 1984), Inglaterra y País de Gales (Gunn, 1990), Polonia (Sujkowski *et al.*, 1994), Países Bajos (Mazáková *et al.*, 2006), Francia (Lebreton y Andrivon, 1998), Hungría (Bakonyi y Érsek, 1997), Finlandia (Kankila *et al.*, 1995) y Noruega (Hermansen y Amundsen, 1995). De igual manera, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estos autores al haber identificado en España ambos tipos A1 y A2.

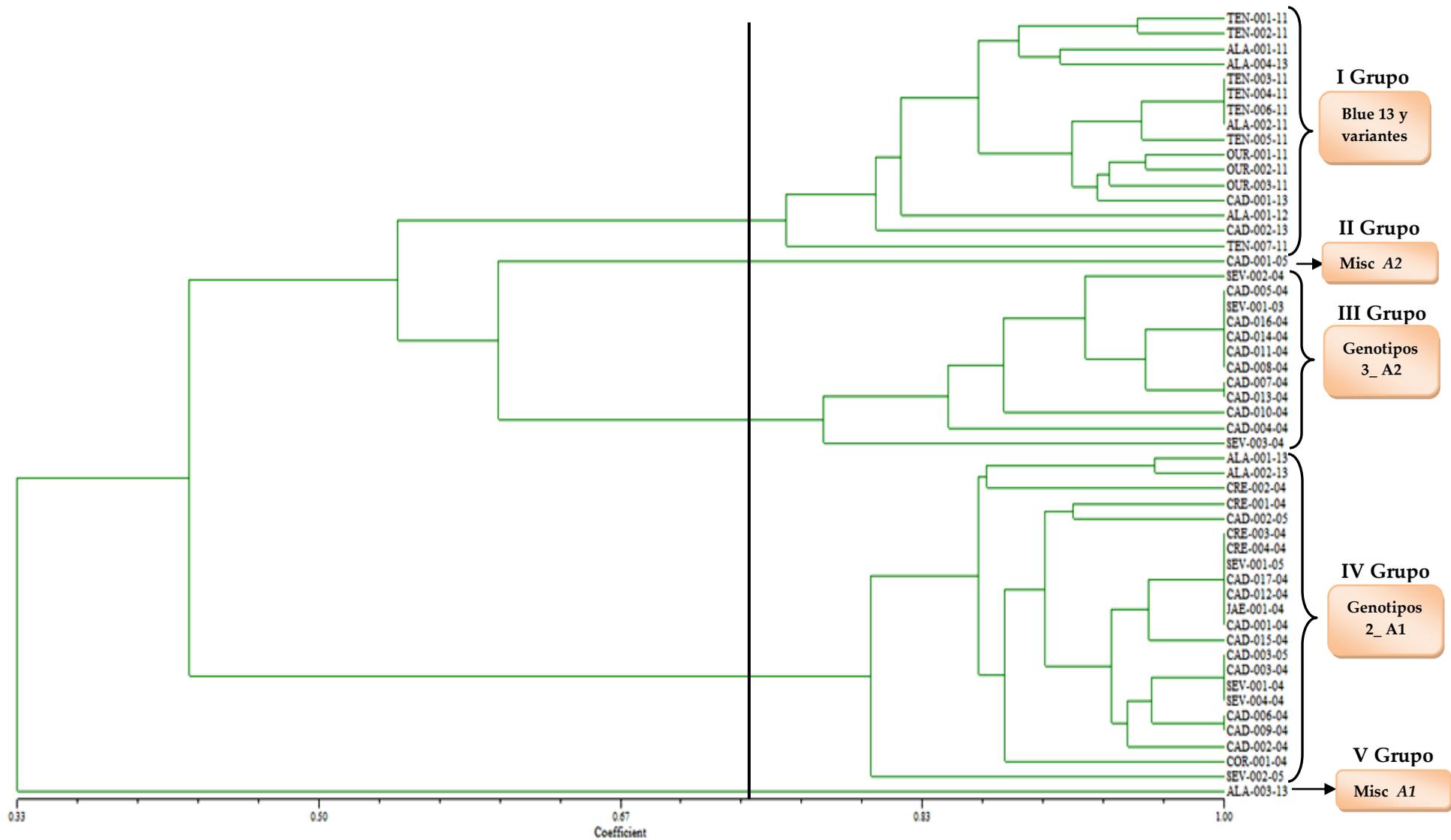


Figura 3.13. Dendrograma obtenido con los 52 aislados de *P. infestans* recolectados en España utilizando el método de agrupación UPGMA.

La ocurrencia en Europa de ambos tipos posibilita el desarrollo de nuevas líneas recombinantes a través de reproducción sexual. Una evidencia de dicha recombinación se registró en Polonia, que tras identificar el tipo *A2* se presentó una gran diversidad de patotipos de *P. infestans*, con un 69% genéticamente únicos, según los marcadores *Gpi*, *Pep* y *RG57* (Sujkowski *et al.*, 1994). Algo similar sucedió en Países Bajos (Van den Bosch *et al.*, 2011) con una tasa del 49%, lo que corrobora la idea del incremento de la diversidad genética debido a la reproducción sexual del patógeno. Otros investigadores sostienen que esta recombinación puede ser baja debido a la germinación mínima de las oosporas (Fry y Goodwin, 1995) y a la capacidad de autofecundación del tipo *A2* (Judelson, 1996).

Estudios realizados por Goodwin *et al.* (1995) atribuyen el incremento de la variabilidad a eventos de migración, mutaciones y/o parasexualidad. Por otra parte, Koh (1994) describió la existencia de ambos tipos de apareamiento en Japón desde 1937, antes de la difusión del tipo *A2*. Sugiere, además, que la aparición pudo deberse a una autoreversión del *A1* a la forma *A2*, inducida por el envejecimiento, exposición a fungicidas o diferentes tipos de estreses existentes.

La introducción del apareamiento *A2* significó cambios genético-estructurales en poblaciones del patógeno en Australia (Irwin *et al.*, 1995), Asia (Gou *et al.*, 2009) y África (Sedegui *et al.*, 2000). Estos cambios se han observado por el incremento de la frecuencia de un tipo respecto al otro. A pesar de las limitaciones por el número de aislados del presente trabajo, los resultados muestran una ligera tendencia hacia la predominancia del tipo *A2* con un 55,8% frente al *A1* del 44,2%. Forbes *et al.* (1998) encontraron que los aislados *A1* duplicaban al tipo *A2* en Méjico, Holanda, Polonia y Ruanda. Sin embargo, en prospecciones posteriores, el tipo *A1* parece haber retrocedido frente al *A2*.

En Francia, el estudio del patógeno desde 2003 permitió observar un progresivo incremento de la frecuencia de aislados *A2* hasta superar el 76% en el 2007 (Corbière *et al.*, 2008). En Gran Bretaña pasó del 10% en 2004 a más del 70% en 2006 (Cooke *et al.*, 2008). Este rápido desplazamiento en el Norte de Europa, fue asociado con la aparición del nuevo linaje clonal *A2* identificado en 2005 como Blue 13 (Cooke *et al.*, 2009), el cual es altamente agresivo y domina gran parte de las poblaciones de *P. infestans* en Europa. Recientemente, se han encontrado variantes del Blue 13 en China con comportamiento similar a sus homólogos de Europa (Li *et al.*, 2013).

Los resultados de este trabajo es el primer paso que demuestra la presencia de ambos tipos de apareamiento en 8 localidades españolas muestreadas, donde posiblemente, las viejas poblaciones *A1* estarían siendo

reemplazadas por la migración de nuevas poblaciones A2 y, quizás, por la recombinación sexual en menor grado.

Por otra parte, el incremento de la severidad en la enfermedad coincide, a menudo, con cambios genéticos en la población de *P. infestans* (Goodwin *et al.*, 1998) los cuales se han asociado a la aparición del tipo A2 (Reis *et al.*, 2003). Esta tesis también la apoya Calderón *et al.*, (2002) quienes sostienen que el incremento de la frecuencia del tipo A2 podría ser debido a una mayor tolerancia a fungicidas como el Metalaxyl y a una mejor adaptación a estreses provocados por condiciones climáticas adversas. Según Fry (2008), Runno-Paurson *et al.* (2009) el cultivo continuo de variedades de patata con genes mayores ha podido contribuir a la selección de razas más agresivas del patógeno. Esto ya fue demostrado por Flier y Turkensteen, (1999) y Gavino *et al.* (2000), quienes identificaron en el continente europeo, nuevos aislados más complejos y resistentes a fungicidas que poseían un período de latencia más reducido.

3.4.2. ESTRUCTURA GENÉTICA

3.4.2.1. Haplotipos mitocondriales

En *P. infestans* se reconocen cuatro haplotipos mitocondriales: Ia, Ib, IIa y IIb. El haplotipo Ib fue encontrado con una amplia distribución, considerado como el tipo ancestral y el posible causante de la epidemia irlandesa. Dicha hipótesis fue confirmada por Gómez-Alpizar *et al.* (2007), con estudios posteriores realizados con ADN mitocondrial procedentes de muestras de herbario de la época de la hambruna. El haplotipo Ia se encuentra tanto en el Valle del Toluca (Méjico) como en el Sur de América. Esto ha reavivado el debate sobre el origen y las posibles rutas migratorias del patógeno (Gómez-Alpizar, *et al.*, 2007).

Tradicionalmente la estructura poblacional del oomiceto se ha considerado que está conformada por linajes clonales, es decir por subpoblaciones originadas por mecanismos de reproducción asexual y que por tanto presentan gran similitud genética entre sus individuos (Goodwin, 1997).

Los resultados del presente trabajo muestra la dominancia del haplotipo mitocondrial Ia con el 98,1% frente a tan sólo el (1,9%) del tipo IIa. Resultados similares han sido encontrados por Harbaoui *et al.* (2013), los cuales identificaron el haplotipo Ia en aislados de Túnez en un 97,58%, frente al 2,42% de tipo IIa. Del mismo modo, Alarcón (2011) evaluó 88 aislados procedentes del

valle de Chapingo (Méjico), identificando el haplotipo mitocondrial Ia en todos ellos.

Flier *et al.* (2003) señala que 170 genotipos, aislados y prospectados en variedades comerciales, especies silvestres nativas, *S. demissum* y *S. xedinense*, del valle de Toluca (Méjico), presentaron el haplotipo mitocondrial Ia. Por otro lado Knapova *et al.* (2002), determinó los haplotipos mitocondriales en aislados de patata y tomate, en Suiza, Francia y Alemania. En dicha evaluación utilizaron como referencia cepas cuyo genotipo nuclear correspondía a los linajes US-1, US-7, US-8 así como a los europeos EU-49 y EU-414, juntos con la progenie de dos aislados compatibles de origen suizo. Encontraron que el 93% de las poblaciones europeas presentaban el tipo Ia de un total de 168 aislados prospectados en 4 años. El haplotipo clonal antiguo Ib, solo se encontró en el 2% y el Iia, en el 5% del conjunto de los aislados evaluados.

En otros aislados recolectados en Antioquía y norte de Santander en Colombia, Jaramillo *et al.* (2002a), encontraron que la mayoría de los aislados presentaban haplotipo Iia, junto con alguno Ib, lo que indica una posible transición de una población antigua a otra más reciente, asociada a una mayor resistencia al Metalaxyl. García *et al.* (2000) y Calderón *et al.* (2002) encontraron que todos los aislados procedentes de Cundinamarca y Boyacá (Colombia) presentaron el tipo Iia.

El haplotipo Ia, ya ha sido descrito en Méjico por autores como Flier *et al.* (2003). Según Gavino y Fry (2002) el haplotipo Ia está asociado a los linajes clonales US-7 y US-8, y varios linajes de Perú, Argentina, Brasil, Ruanda, Israel y Méjico. Mientras que el haplotipo Iia se ha identificado en Japón y Corea, asociados al linaje JP-1, así como en Sudamérica y Europa. Por otro lado, el haplotipo Iia no se encontró en Norte América. Los haplotipos Ia y Iia estuvieron presentes en Europa entre diversos genotipos del DNA nuclear que contenían los tipos de apareamiento A1 y A2 (Gavino y Fry, 2002).

Fry *et al.* (1993) indicaron que en Japón, Corea, Egipto, Israel, Ruanda, Alemania, Irlanda, Holanda, Polonia, Suiza, Gran Bretaña, Bolivia, Brasil Colombia y Ecuador, se presentaron nuevos genotipos de *P. infestans* que no habían sido descrito en colecciones anteriores a los años 80, dando origen a nuevas poblaciones. En 1987 se describió el US-8 en patatas del Oeste de Estados Unidos y Canadá, y el US-7 en patata y tomate. Ambos eran muy patogénicos y resistentes al Metalaxyl. El genotipo correspondiente a US-7 fue encontrado en el Nor-Oeste de Méjico, un semestre antes de ser encontrado en Estados Unidos, lo que indica que dicho genotipo probablemente se originó en México y emigró a Norteamérica.

Lebecka *et al.* (2007) mencionan que la relación entre los haplotipos Ia y IIa varía en función del país. En algunos el Ia domina sobre IIa (Polonia, Inglaterra, Escocia, País de Gales, Países Bajos y Francia), pero en otros es el IIa el predominante (Irlanda del Norte, Irlanda, Finlandia, Hungría y Austria). Estos resultados son de gran interés para poder diseñar estrategias de manejo y control de la enfermedad.

3.4.2.2. Genotipado con marcadores microsatélites

El desarrollo de marcadores SSR proporciona una poderosa herramienta para estudiar la diversidad de las poblaciones de *P. infestans*. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran cambios importantes en la estructura genética del patógeno en España, con la aparición de nuevos genotipos como Blue 13 (13_A2), el cual es resistente al Metalaxyl y tolerante a cambios climáticos adversos. Estos resultados coinciden con Cooke *et al.* (2012a) los cuales identificaron un 70% de 196 aislados, como genotipos Blue 13. Dichos estudios han mostrado la aparición de este nuevo linaje, desplazando rápidamente a otros como Pink_6 (6_A1) y Red_8 (8_A1). Además el genotipo Blue 13 (13_A2), está en constante evolución formando variantes mucho más virulentas y agresivas (13_A2_1, 13_A2_2, 13_A2_3, 13_A_4, 13_A_15, 13_A_68, 13_A_new). Sin embargo los resultados encontrados también muestran la coexistencia de genotipos antiguos que siguen manteniendo su estabilidad genética como el 2_A1 presente en Europa desde hace mucho tiempo. Otro también como el 3_A2 el cual muestra una estructura genética coincidente con lo encontrado en el Reino Unido durante los años 2005 y 2006.

El genotipo Blue 13 identificado en España coincide con lo descrito por Li *et al.* (2013), quienes analizaron la estructura de *P. infestans* en China con 12 marcadores SSR altamente polimórficos, identificando 68 genotipos diferentes, que se agruparon en función a su origen geográfico. No ocurre este tipo de agrupación en nuestro estudio, donde no parece haber relación con la procedencia del aislado. Uno de los linajes clonales dominantes era similar a Blue_13, dominante en Europa desde 2005, constituyendo el estudio anterior en la primera descripción de Blue 13 fuera de Europa.

Resultados similares obtuvieron Mariette *et al.* (2014) los cuales evaluando 1274 aislados recolectados durante 2001 al 2008 en Francia, y genotipados con 10 microsatélites, encontraron que el genotipo 2_A1 presentaba una dominancia del 60% en el 2001 frente a un 40% en el 2006. Sin embargo en el año 2005 se produce un cambio en la estructura genética del patógeno, apareciendo por primera vez el genotipo Blue 13 (13_A2), presentando una dominancia del 80% los años 2007 y 2008.

Por otro lado, Cooke *et al.* (2014), mencionan que en estudios llevados a cabo en Irlanda durante 2008 a 2011, se han observado cambios dramáticos en la aparición de nuevos genotipos agresivos como Blue 13 (13_A2). Identificado por primera vez en Irlanda del Norte en 2007, pasó a dominar en 2009 y 2010.

Gisi *et al.* (2011) menciona que estudios recientes han relacionado los cambios drásticos y frecuentes de la estructura de las poblaciones de *P. infestans* en los países europeos durante la última década. Pero los procesos involucrados en dichos cambios todavía no están claramente establecidos, sugiriendo algunos autores la existencia de una mayor agresividad (Fry *et al.*, 1993).

Para el genotipado de los 52 aislados recolectados en las 8 localidades españolas se han utilizado 12 marcadores microsatélites SSR. Esta información también fue descrita por Li *et al.* (2013) al emplear la técnica de multiplex SSR para el genotipado también con 12 microsatélites. Por otro lado, Lebecka *et al.* (2007) con 125 aislados de 2005 y 2006 recolectados en Polonia, igualmente realizó la caracterización con los mismos marcadores, resultando polimórficos para un total de los 88 aislados evaluados.

Igualmente Brurberg *et al.* (2007) en una prospección en Finlandia, Dinamarca, Suecia y Noruega durante 2003 utilizaron 9 marcadores polimórficos SSR para analizar la estructura genética de 190 aislados de un gran número de procedencias.

Capítulo 4

Razas fisiológicas y resistencia a fungicidas sistémicos

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS EN *P. infestans*

La virulencia es la habilidad genética de una raza del oomiceto para vencer la resistencia del hospedante y provocar la enfermedad. El patosistema *P. infestans/planta hospedante*, puede explicarse mediante el modelo *gen-a-gen*, es decir para cada gen que condiciona la resistencia del hospedante existe un gen específico que condiciona su patogenicidad o virulencia. El gen de resistencia de la planta sólo es efectivo si existe el correspondiente gen de avirulencia en el patógeno. El espectro de virulencia es la gama de genes *avr* que expresa el aislado al ser inoculado en una serie diferencial con genes de resistencia *R*. Los aislados que muestran el mismo espectro se denominan razas fisiológicas, considerándose muy compleja si presenta un amplio espectro de virulencia.

La caracterización de los aislados de *P. infestans* en patotipos o razas fisiológicas se realiza en base a su virulencia sobre los genes *R* de un grupo de genotipos diferenciales. De esta forma la raza (1.3) es virulenta en los cultivares con genes *R₁* y *R₃*. Dichos genotipos portan 11 genes *R* de resistencia vertical derivados de la especie silvestre *S. demissum* identificados por Black *et al.* (1953) y Malcosom y Black (1965).

Del conjunto de dichos genes, cuatro de ellos han sido clonados, *R₁*, *R₂*, *R_{3a}*, y *R_{3b}* (Hein *et al.*, 2009). *R₁* fue el primer gen caracterizado, el cual confiere resistencia en hoja y tubérculo (Ballvora, 2002). Posee dominio sobre proteínas *R* con estructuras tipo CC, NBS y LRR que regulan la expresión de genes de resistencia. El mapeo genético determinó, asimismo, que *R₃* está formado de dos genes estrechamente ligados, *R_{3a}* y *R_{3b}* con 82% de similitud y localizados en el cromosoma XI (Huang *et al.*, 2004). *R_{3a}* codifica las proteínas CC-NBS-LRR que confieren resistencia en hoja. El gen *R_{3b}* se relaciona con proteínas específicas de resistencia tanto en hoja como en tubérculo, pero no reconoce el factor de avirulencia *Avr3a*. Esto indica que a pesar de su alta similitud ambos genes no comparten la misma especificidad para un factor de avirulencia (Li *et al.*, 2011).

4.1.2. CAMBIOS GENÉTICOS EN POBLACIONES DE *P. infestans*

La gravedad de la enfermedad producida por este oomiceto, en gran parte es debido, a la complejidad y agresividad de las razas existentes que le convierte en unos de los patógenos vegetales más difíciles de combatir (Agris, 2005). Los continuos cambios en las poblaciones a nivel mundial han hecho que el control del mildiu sea cada vez más complicado, debido a la reducción

gradual de la efectividad de los fungicidas, consecuencia de la alta presión de selección ejercida por el uso continuo de los mismos (Jaramillo, 2003).

En España, durante los últimos años, se ha observado una mayor agresividad de la enfermedad tanto en patata como en tomate, debido probablemente, a cambios genéticos recientemente descritos relacionados con la presencia de los dos tipos de apareamiento A1 y A2 (Alor *et al.*, 2014b). Esto conlleva un incremento de la variabilidad del patógeno y en consecuencia la aparición de nuevas razas más virulentas. También hay que destacar que la introducción y posterior migración de nuevos patotipos, hacen que se incremente la agresividad y resistencia a los fungicidas actualmente existentes (Hannukkala *et al.*, 2007; Fry, 2008).

4.1.3. MÉTODOS DE CONTROL

El uso de fungicidas es la medida de control más empleada para este patógeno. Los productos químicos con acción de contacto y/o sistémico son capaces de prevenir la infección o detener posteriormente. Entre ellos, los fungicidas sistémicos son absorbidos a través de las hojas y raíces, realizando la translocación en forma ascendente o descendente a través del xilema y floema.

Dichos fungicidas son más efectivos al tener un efecto curativo, pudiendo eliminar al patógeno aún después de que este haya infectado a la planta. La principal desventaja de este grupo es que la población del oomiceto desarrolla rápidamente resistencias.

Hasta 1970, los fungicidas más utilizados incluían el caldo bordelés y otros productos cúpricos, además de las Ftalimidias y los Ditiocarbamatos (Rich, 1983). En las últimas décadas las aplicaciones están basadas en fungicidas de tipo sistémico, principalmente del grupo de las Fenilamidias como el Metalaxyl y el Benalaxil. Ambas materias activas poseen efecto curativo, a bajas dosis, en condiciones de alta presión infectiva. También tenemos al Cimoxanilo que pertenece al grupo de la Cianoacetamida-oxinas así como al Ciazofamida que integra el grupo Cyano-imidaziles. Se ha demostrado que el Cimoxanilo afecta la inhibición de la síntesis de ADN, ARN, aminoácidos y lípidos, además de inhibir la respiración celular y la permeabilidad de la membrana (Leroux *et al.*, 1993). Asimismo, se ha encontrado que esta molécula también actúa como inductor de las defensas naturales de la planta. Éstas reaccionan mediante respuestas de hipersensibilidad y aumento en el espesor de las paredes celulares, deteniendo el crecimiento miceliar del oomiceto (Howard *et al.*, 2000).

Dentro de los métodos de control se menciona el termino *Escape* (Myint, 2002). Esta práctica va encaminada a evitar los cultivos en ciertas zonas y/o durante los períodos que favorecen las condiciones ambientales para el desarrollo del patógeno, mediante la anticipación o retraso de las fechas de siembra. Otra forma de control es mediante la fertilización adecuada, que puede ser una práctica que contribuye de manera importante a la reducción de los daños causados por el mildiu, por incidir en la relación *resistencia/susceptibilidad* del cultivo. Sin embargo, existe poca información, un así un estudio realizado por Santos *et al.* (2002), en donde identificaron que el potasio tiene un efecto sobre la enfermedad a través de funciones metabólicas específicas, que alteran las relaciones de compatibilidad del ambiente, en torno al *huésped-parásito*.

4.1.4. RESISTENCIA DE *P. infestans* A FUNGICIDAS

La resistencia a fungicidas se manifiesta como una variación genética en el patógeno que produciendo una disminución de su sensibilidad a una molécula química determinada. Esto es debido a que disminuye la tasa de ingreso de la materia activa a las células del patógeno, falta de afinidad química con su molécula o detoxificación del compuesto por parte del organismo. Estos cambios en la resistencia, generalmente, se encuentran asociados con la presencia de mutaciones genéticas que ocurren de forma natural o inducida, resultado de una alta presión de selección ejercida por la molécula química (Koller, 2000). Dichos cambios pueden aparecer en uno o varios genes, dependiendo del modo de acción del agente. La resistencia a los fungicidas que actúan sobre un único lugar específico, tienen más probabilidad de éxito debido a que sólo es necesaria la generación de mutaciones puntuales sobre un único gen (Damicone, 2004).

Un ejemplo de ello es el Metalaxyl que inicialmente fue aplicado en solitario, este fungicida, al igual que otras Acilalaninas, actúa sobre lugares muy específicos del patógeno. Esta situación facilitó un rápido desarrollo de la resistencia en poblaciones de *P. infestans*. El fenómeno fue detectado a principios de los años 80 en diferentes países europeos y, posteriormente, a comienzos de los 90 en USA, Canadá, Ecuador y Méjico (Davidse *et al.*, 1981; Drenth *et al.*, 1993; Matuszak *et al.*, 1994; Manríquez, 1995; Power *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1997).

El nivel de resistencia puede medirse en el laboratorio, exponiendo un conjunto de aislados al fungicida en cuestión y midiendo su respuesta a diferentes dosis del compuesto. Los niveles de toxicidad se miden

generalmente por la inhibición del crecimiento del hongo, la germinación de las esporas o de la infección de la planta (Damicone, 2004).

El objetivo del presente capítulo ha sido la caracterización de las razas fisiológicas mediante su espectro de virulencia y determinar el nivel de sensibilidad de cuatro aislados a fungicidas sistémicos comúnmente empleados.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. AISLADOS Y CEPA DE REFERENCIA

La caracterización de las razas fisiológicas se realizó de los 52 aislados de *P. infestans*, la relación de aislados se presenta en el capítulo 3 (Ver Tabla 3.2).

En la evaluación del estudio de la resistencia a fungicidas se eligieron 4 aislados representativos de las zonas productoras de patata en España (Tabla 4.1), el cual previamente se ha identificado el tipo de apareamiento y a la vez se ha genotipado con marcadores SSR, identificando el genotipo Blue 13 (13_A2) y variantes de este genotipo (Ver capítulo 3, tablas 3.18 y 3.20).

Para el aislamiento del patógeno se colocaron foliolos con esporulación en cámara humedad a $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, hasta lograr el crecimiento del micelio, tal y como se ha descrito en los apartados 3.2.1.1 y 3.2.1.3 del capítulo 3.

Tabla 4.1. Aislados de *P. infestans* utilizados en la evaluación de resistencia a fungicidas.

Aislamientos	Tipo de apareamiento	Genotipo	Procedencia
ALA-004-13	A2	13_A2_15	Álava
CAD-001-13	A2	13_A2_68	Cádiz
ORE-003-11	A2	13_A2	Orense
TEN-001-11	A2	13_A2_3	Tenerife

Como control positivo, se empleó la cepa de referencia con tipo de apareamiento A1 proveniente del Potato Research Institute Jadwisin Center de Polonia (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Características de la cepa MP-324.

Cepa	Recolección		Hospedante					Tejido		País	
MP-324	03/08/1997		<i>S. tuberosum</i> Var. Gloria					Tallo		Polonia	
Test de virulencia	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
Hoja desprendida	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

4.2.2. MICROPROPAGACIÓN DE LAS PLÁNTULAS

El material vegetal estuvo constituido por plántulas micropropagadas de los clones diferenciales para la determinación de las razas fisiológicas y la variedad Bintje como control susceptible en la sensibilidad a los fungicidas. El medio nutritivo empleado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) con un pH comprendido entre 5,65 – 5,75 (Tabla 4.3). El material propagado fue dispuesto en tubos con MS e incubado en una cámara de cultivo durante 21 días, a 22 °C ± 2, y de 16 h de fotoperíodo.

Transcurrido este tiempo, las plántulas alcanzaron un tamaño aproximado de 10 cm de longitud procediendo entonces a seccionar entre 8-10 nudos por plántula para su repicado. Este se realizó en magentas con medio MS durante 21 días hasta obtener plántulas con un buen desarrollo de raíces y hojas. Seguidamente, fueron aclimatadas en bandejas con perlita y solución nutritiva durante 12 días. Finalmente, se trasplantaron a macetas con sustrato estéril en invernadero a temperatura entre 20-24 °C, y 16 h de luz.

Tabla 4.3. Composición del medio MS utilizado en la micropropagación.

Reactivo	Volumen (1 l)
Sales MS	4,41 g
Sacarosa	30,0 g
Agar	8,0 g

4.2.3. FUNGICIDAS

Los fungicidas utilizados en este estudio se eligieron por ser los más empleados en España para el control de la enfermedad. Estos fueron los siguientes:

- Ridomil Gold MZ (Metalaxyl- M 4% y Mancozeb 64%, [WP] P/P polvo mojable)
- Curzate 60 WG (Cimoxanilo 60% [WG] P/P, granulado dispensable en agua)
- Galben M (Benalaxil 8% + Mancozeb 65% [WP] P/P, polvo mojable)
- Ranman (Ciazofamida 40% [SC] P/V suspensión concentrada).

Ridomil y Galben poseen una acción protectante, curativa y erradicante, utilizados exclusivamente para el control de oomicetos. Sus acciones se traducen en la inhibición de la esporulación y desarrollo de los esporangios, lo

que no sucede con los productos únicamente protectantes, los cuales actúan sobre las zoosporas hasta su germinación, antes de penetrar en el tejido.

Además, el Metalaxyl es menos susceptible de ser lavado por las lluvias, inhibiendo la síntesis del ARN ribosomal a nivel de la incorporación de uridina por parte de la ARN polimerasa I (Davidse, 1995). Como consecuencia actúa en la síntesis de las proteínas, reduciendo crecimiento del micelio sobre las zoosporas, las cuales pueden ser controladas por un fungicida protectante como Mancozeb, antes de penetrar al tejido.

Por su parte, el Cimoxanilo es una molécula fungicida perteneciente a la familia de las Cianoacetamida-Oxinas. Penetra localmente sin movimiento acropétalo, ni translocación de hoja a hoja, ni del tallo al follaje. Es curativo y preventivo, y efectivo en los tres primeros días tras la infección, antes que aparezcan los síntomas. Su acción se caracteriza por metabolizarse rápidamente en los tejidos de la planta y con pocos días de actividad, aunque alguno más que los protectantes. Asimismo, posee un efecto sinérgico cuando se aplica en mezcla con Mancozeb y Oxadixyl.

La Ciazofamida del grupo de los Cyano-Imidaziles, es un principio activo más reciente actuando en todas las etapas de desarrollo del patógeno. Posee actividad translaminar actuando dentro del complejo *bc1*, en el sitio Qi, bloqueando los centros de energía del hongo e impidiendo así su desarrollo.

4.2.4. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS

Para la identificación de las razas fisiológicas de los aislados, se siguió el protocolo de inoculación sobre hoja desprendida propuesto por Barquero *et al.* (2005). Se evaluaron un total de 52 aislados, empleando la cepa control MP-324 con factores de virulencia ya conocidos. Asimismo, se incluyó como testigo susceptible la variedad Bintje (R_0 , o sin genes R) (Tooley *et al.*, 1989).

El ensayo se realizó con 3 repeticiones y 5 folíolos para cada uno de los 11 clones diferenciales y para cada aislado empleado.

La evaluación del espectro de virulencia consistió en la determinación de la reacción de compatibilidad o crecimiento micelial y esporulación, frente a la de incompatibilidad o presencia de necrosis o hipersensibilidad. Para ello se realizó una evaluación visual, confirmando posteriormente mediante observación del patógeno al microscopio. El aislamiento se consideró virulento si al menos 3 de los 5 folíolos presentaban reacción de compatibilidad, en caso contrario se consideró negativa tal y como describe Barquero *et al.* (2005).

La metodología a seguir para la preparación de los folíolos, inóculo e infección de los cultivares diferenciales se detalla a continuación.

4.2.4.1. Preparación de los folíolos e inóculo.

Se recolectaron los folíolos del tercio superior de la planta a primeras horas de la mañana y se colocaron en posición abaxial sobre el papel de filtro humedecido con agua estéril y una rejilla como soporte. Las bandejas de plástico donde se dispusieron poseían unas dimensiones de 40x30x5 cm, previamente identificadas, y conteniendo 80 ml de agua estéril para crear una cámara húmeda.

Para la preparación del inóculo se procedió a la extracción y concentración de los esporangios según el protocolo de Barquero *et al.* (2005). La suspensión se obtuvo mediante lavado de las placas de agar centeno con agua estéril, conteniendo los aislados crecidos durante 4 semanas. El volumen total de agua empleada no excedió de 3 ml. Se recogió la fase líquida en tubo de ensayo estéril para estimar la concentración de esporangios, utilizando una cámara Neubauer (Figura 4.1-A).

Con ella se realizó el conteo, teniendo en cuenta las dos zonas deprimidas y las cuadrículas dividida en cuadros primarios, secundarios y terciarios (Figura 4.1-B). En cada zona deprimida se depositaron 9 μ l de la solución estimando un promedio de esporangios con zoosporas, contados en 5 cuadros terciarios de cada una de las zonas. La concentración de esporangios por ml se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{esporangios}}{16 \text{cuadros}} \times \frac{400 \text{cuadros}}{0.1 \text{mm}^3} \times \frac{1000 \text{mm}^3}{1 \text{ml}} = N^{\circ} \text{esporangios} / \text{ml}$$

Seguidamente, se ajustaron las concentraciones de todos los aislados a 40000 esporangios/ml. La germinación de éstos se indujo mediante shock térmico a 4°C durante 2 h para estimular la liberación de zoosporas, y seguidamente, durante 30 min a temperatura ambiente para reactivar las zoosporas liberadas.

4.2.4.2. Inoculación e índices de diversidad

La infección de los cultivares diferenciales se realizó en la cara abaxial de los folíolos, depositando 40 μ l del inóculo (Figura 4.2-A). Las bandejas fueron colocadas en la cámara de crecimiento a 18 °C \pm 2, y un fotoperíodo 18 h

(Figura 4.2-B), hasta que el testigo susceptible Bintje (R_0) mostrara un 100% de la superficie afectada.

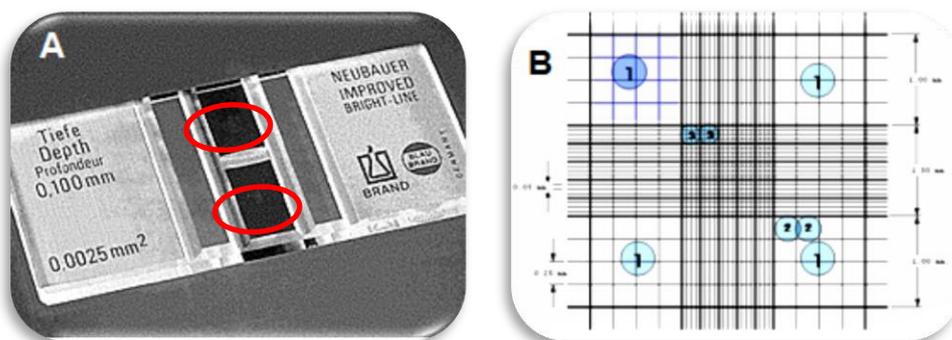


Figura 4.1. A: Cámara Neubauer con las zonas deprimidas. B: Divisiones del cuadro primario (1), secundario (2) y terciario (3).

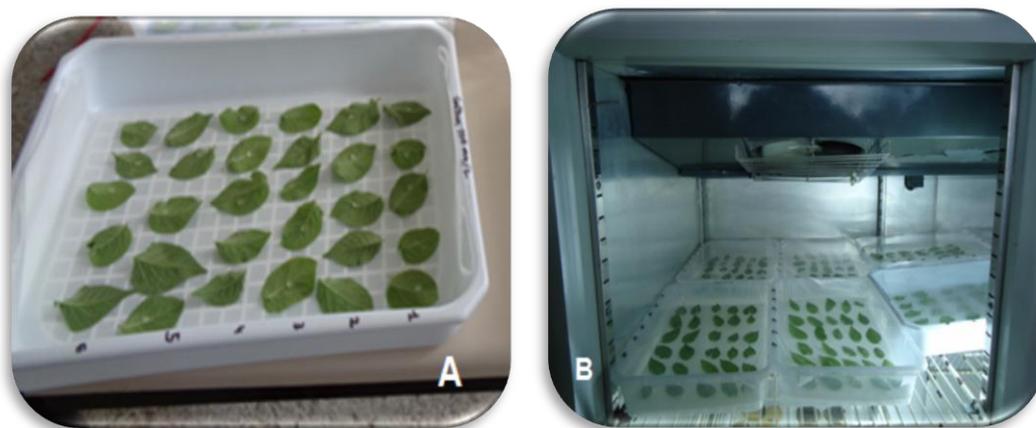


Figura 4.2. A: Foliolos inoculados B: Incubación en cámara de crecimiento.

La diversidad del conjunto de los aislados se estimó a través de los índices de Shannon y de Gleason (Goodwin *et al.*, 1995). El índice de Shannon se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$H_s = -\sum_j (p_j \ln p_j); \quad j = 1 \dots N_p$$

donde:

p_j = es la frecuencia de la j -ésima raza en la población

N_p = es el número de razas identificadas

El rango de los valores está comprendido entre 0 y $\ln Np$, donde 0 indica que no hay diversidad, perteneciendo todos los aislados a la misma raza, y $\ln Np$ muestra el nivel más alto de diversidad, indicando que cada aislado es una raza diferente.

Por otro lado el índice de Gleason se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$H_G = (Np - 1) / \ln(ni)$$

donde:

Np = es el número de razas identificadas;

ni = es el número de aislamientos evaluados.

El índice refleja la riqueza de la diversidad, es decir, el número de fenotipos diferentes presentes en la población.

Para comparar las localidades y reducir el efecto por la diferencia en el tamaño de las muestras, se utilizó un factor de corrección. Este se aplicó al ser el tamaño inferior a 100 individuos calculando de esta forma los índices relativos de Shannon (H_{SR}) y de Gleason (H_{GR}) propuesto por Andrivon (1994):

Índice relativo de Shannon

$$H_{SR} = H_s / H_{S_{MAX}}$$

$$H_{S_{MAX}} = (H_s) / \ln(ni)$$

Índice relativo de Gleason

$$H_{GR} = H_G / H_{G_{MAX}}$$

$$H_{G_{MAX}} = (Np - 1) / (ni - 1)$$

donde:

$H_{G_{MAX}}$ y $H_{S_{MAX}}$ son los mayores valores posibles de H_G y H_s en una muestra de individuos de ni .

ni = es el número de aislamientos evaluados.

Np = es el número de razas identificadas

4.2.5. EVALUACIÓN DE LOS FUNGICIDAS

El ensayo se realizó con 2 repeticiones y 5 foliolos por cada aislado. El método utilizado fue la inmersión de la hoja durante 1 min, en una solución con la dosis determinada para cada fungicida, tal y como describe García (2008). Los foliolos tenían un diámetro de 14 mm, obtenidos de plantas de 30 días después de la siembra. Las dosis utilizadas de cada fungicida fueron seleccionadas en base a trabajos previos de Sujkowski *et al.* (1993), Power *et al.* (1995), Ochoa (2004) y Ebersold (2001), según se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Dosis de fungicidas utilizados en el estudio.

Fungicida	Materia activa	Dosis	Modo de acción
Ridomil Gold MZ	Metalaxyl- M 4% y Mancozeb 64%	6,3 mg l ⁻¹	Acción protectante y curativo, inhibe la esporulación y el desarrollo de los esporangios.
		16 mg l ⁻¹	
		40 mg l ⁻¹	
		100 mg l ⁻¹	
Galben M	Benalaxil 8% + Mancozeb 65%	6,3 mg l ⁻¹	Acción protectante y curativo, inhibe la esporulación y el desarrollo de los esporangios.
		16 mg l ⁻¹	
		40 mg l ⁻¹	
		100 mg l ⁻¹	
Curzate 60 WG	Cimoxanilo 60%	1,8 mg l ⁻¹	Curativo y preventivo, afecta la inhibición de la síntesis de ADN, ARN, aminoácidos y lípidos, además de afectar la respiración celular.
		4,6 mg l ⁻¹	
		12 mg l ⁻¹	
Ranman	Ciazofamida 40%	80 μ l ⁻¹	Actividad translaminar, bloquea la cadena de transporte de electrones del mitocondria en la región <i>Qi</i> , actúa en todas las etapas de desarrollo del patógeno.
		160 μ l ⁻¹	
		250 μ l ⁻¹	
		500 μ l ⁻¹	

Para la evaluación del tratamiento control se empleó la dosis de 0 mg l⁻¹ sumergiendo las hojas en agua destilada estéril e inoculando el patógeno de igual forma que los demás tratamientos.

El inóculo se preparó siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.4.1. Cada suspensión fue ajustada con agua destilada estéril a 40000 esporangios/ml (Barquero *et al.*, 2005b). Las hojas fueron tratadas con las diferentes dosis de fungicidas, colocándose en cámara húmeda, e incubando durante 24 h a 18 °C y 12 h de luz. Transcurrido este tiempo, se inocularon los

foliolo por la cara abaxial aplicando 40 µl del inóculo, incubando bajo las condiciones antes descritas. Las observaciones se realizaron al 5°, 7° y 9° día tras la inoculación.

Se evaluó la severidad del patógeno en la superficie del foliolo con la presencia de necrosis o esporulación. Se estimó el AUDPC (Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad) siguiendo la metodología de Pérez y Forbes (2008), realizando tres valoraciones visuales del porcentaje de infección en cada foliolo, cada dos días, empezando el 5° día después de la inoculación. La fórmula aplicada fue la siguiente:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(x_{i+1} + x_i)/2] [t_{i+1} - t_i]$$

donde:

- x_i : es la proporción de tejido afectado en la i -ésima observación,
- t : son los días después de la inoculación de la i -ésima observación y,
- n : es el número de observaciones.

Obteniendo los porcentajes de la infección del AUDPC, se consideró al aislado como:

- Resistente: si la infección es superior al 20%.
- Parcialmente resistente: si la infección se situaba entre el 10 y 20%.
- Susceptible: si el foliolo esta sin infección o menor al 10% (Fry, 1978).

Para estandarizar los resultados se estimó el AUDPC relativo (AUDPCrel) según la fórmula siguiente:

$$AUDPCrel = \frac{AUDPC}{(día_{ultima.evaluación} - día_{1^o evaluacion}) \times 100}$$

Este dato se calculó dividiendo el AUDPC de un aislado determinado entre la diferencia del número total de días de la primera y última evaluación, multiplicado por 100.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS

El control susceptible Bintje (R_0) validó la patogenicidad de los 52 aislados al no presentar ningún tipo de resistencia tras las inoculaciones. Asimismo, el espectro de virulencia conocido de la cepa MP-324 ($A1$) validó igualmente la utilización de los diferenciales, ya que se mostró incompatible con los clones R_5 , R_8 y R_9 (Ver Tabla 4.2). Las reacciones de compatibilidad e incompatibilidad de los genes R con su respectivo gen de virulencia recesivo avr , para el conjunto de los aislados se muestran en la Tabla 4.5.

La complejidad de los aislados se muestra en la Tabla 4.6. Hay que destacar la identificación de razas simples y complejas. De los 52 aislados inoculados sobre los 11 clones diferenciales, se encontraron un total de 17 razas fisiológicas, encontrando dos razas más simples procedentes de Álava (1.3.4.7.8) y de Orense (2.3.7). Por otro lado, se ha detectado la raza más compleja con los 11 factores de virulencia y con la mayor frecuencia (25%) en aislados de Cádiz. Es preciso mencionar que el tipo de apareamiento presente en dicha raza era del tipo $A2$. Las localidades de Álava, Cádiz y Sevilla mostraron 3 razas fisiológicas cada una con diferencias entre ellas.

Las frecuencias de los factores de virulencia avr que expresaron los aislados se muestran en la Figura 4.3. Se observa a los menos frecuentes $avr5$, $avr8$, ambos con 73% y $avr9$ con un 63%. Sin embargo, el factor $avr7$ estuvo presente en 50 aislados, es decir un 96%, seguido de los factores $avr1$ y $avr11$ observándose en un total de 48 y 47 aislados, representando un 92 y 90% respectivamente.

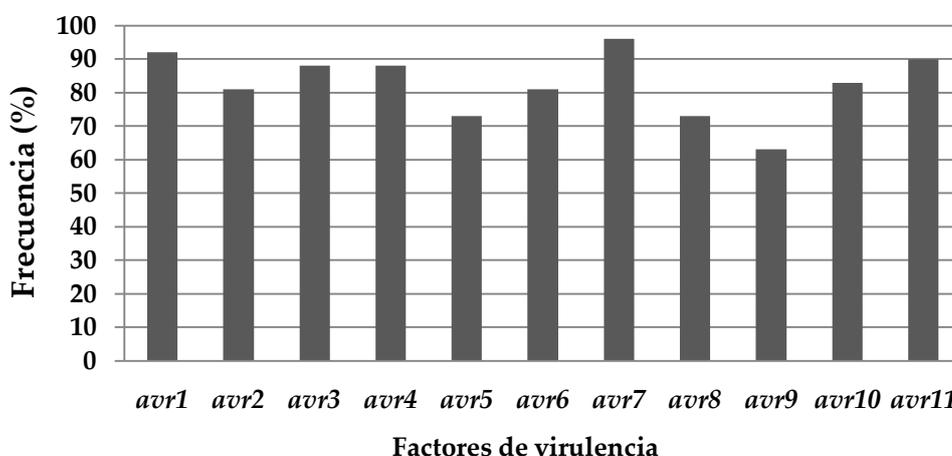


Figura 4.3. Frecuencia de los factores de virulencia en el conjunto de los aislados.

Tabla 4.5. Compatibilidad e incompatibilidad de los aislados con los genes R

Aislados	Clones diferenciales											
	*R ₀	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
MP-324**	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
ALA-001-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ALA-001-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ALA-004-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ALA-002-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ALA-003-13	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
ALA-001-13	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
ALA-002-13	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
CAD-001-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-002-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-001-05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-004-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-005-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-006-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-007-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-008-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-010-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-011-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-013-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-014-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-016-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAD-002-05	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
CAD-003-05	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
CAD-001-04	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
CAD-002-04	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
CAD-003-04	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
CAD-009-04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
CAD-012-04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
CAD-015-04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
CAD-017-04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
CRE-001-04	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
CRE-002-04	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
CRE-003-04	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
CRE-004-04	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
COR-001-04	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
JAE-001-04	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ORE-001-11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ORE-003-11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ORE-002-11	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TEN-001-11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
TEN-007-11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
TEN-002-11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
TEN-003-11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
TEN-004-11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
TEN-005-11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
TEN-006-11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
SEV-001-05	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SEV-002-05	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SEV-001-04	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SEV-002-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SEV-003-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SEV-001-03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SEV-004-04	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

(*): Control susceptible Bintje.

(**): Aislado control con espectro de virulencia conocido.

Tabla 4.6. Razas fisiológicas de los aislados de *P. infestans* evaluados.

Provincias	Aislados	Razas	Número de aislados por raza	Frecuencia ² (%)
Álava	7	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	4 (57,1%) ¹	7,7
		1.3.4.7.8	1 (14,3%)	1,9
		1.3.4.7.8.10.11	2 (28,6%)	3,8
Cádiz	22	1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11	13 (59,1%)	25,0
		1.2.4.6.7.8.10.11	5 (22,7%)	9,7
		1.2.3.4.5.6.7.9.11	4 (18,2%)	7,7
Ciudad Real	4	1.2.3.5.7.8.9.10	3 (75%)	5,8
		1.3.4.6.9.10.11	1 (25%)	1,9
Córdoba	1	1.2.3.4.6.7.8.10.11	1 (100%)	1,9
Jaén	1	1.2.4.5.6.8.9.10.11	1 (100%)	1,9
Orense	3	1.2.3.5.6.7.8.9.10.11	2 (66,7%)	3,8
		2.3.7	1 (33,3%)	1,9
Tenerife	7	1.2.3.4.5.6.7.9.10.11	2 (28,6%)	3,8
		1.3.4.5.6.7.10.11	5 (71,4%)	9,7
Sevilla	7	2.3.4.7.8.9.10.11	3 (42,9%)	5,8
		1.2.3.4.5.6.7.8.9.11	3 (42,9%)	5,8
		1.3.4.5.6.7.9.10.11	1 (14,2%)	1,9

¹Frecuencia absoluta de cada raza por provincia

²Frecuencia absoluta de la raza para el conjunto de los aislados

La Tabla 4.6. Muestra el número de aislados de cada raza fisiológica, se observa que la raza (1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11) con 11 factores de virulencia lo integran 13 aislados de Cádiz, también observamos las frecuencias absolutas para cada raza por provincia para el conjunto total de los 52 aislados.

Tabla 4.7. Frecuencia de los factores de virulencia en las zonas geográficas prospectadas.

Zonas	Frecuencia										
	<i>avr1</i>	<i>avr2</i>	<i>avr3</i>	<i>avr4</i>	<i>avr5</i>	<i>avr6</i>	<i>avr7</i>	<i>avr8</i>	<i>avr9</i>	<i>avr10</i>	<i>avr11</i>
Álava	1,00	0,57	1,00	1,00	0,57	0,57	1,00	1,00	0,00	0,86	0,86
Cádiz	1,00	1,00	0,77	1,00	0,77	1,00	1,00	0,82	0,77	0,82	1,00
Ciudad Real	1,00	0,75	1,00	0,25	0,75	0,25	0,75	0,75	1,00	1,00	0,25
Córdoba	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
Jaén	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Orense	0,67	1,00	1,00	0,00	0,67	0,67	1,00	0,67	0,67	0,67	0,67
Tenerife	1,00	0,29	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,29	1,00	1,00
Sevilla	0,57	0,86	1,00	1,00	0,57	0,57	1,00	0,86	1,00	0,57	1,00
Total	7,24	6,46	6,77	6,25	5,33	6,06	6,75	6,09	4,73	6,91	6,77

La Tabla 4.7. Muestra las frecuencias de cada factor de virulencia por provincias, encontrándose con mayor frecuencia al factor *avr1* (7,24) y en menor frecuencia el factor *avr9* (4,73) para todas las provincias muestreadas, por otro lado la provincia de Cádiz, presenta la mayor frecuencia de todos los factores de virulencia (*avr1-avr11*), mientras que Orense lo hace en menor frecuencia.

La complejidad de un aislado viene dada por el espectro de virulencia, el cual puede ser determinado por el número de factores que expresa. La Figura 4.4 muestra la frecuencia de los factores con los diferentes aislados. El patotipo ORE-003-11 fue quien mostró el menor espectro de virulencia con sólo 3 factores frente a los aislados de Cádiz con 11 factores, seguido de aislados de Álava, Orense, Tenerife y Sevilla quienes presentaron un total de 10.

Los resultados obtenidos confirman que los 52 aislados evaluados de las diferentes provincias representan 17 razas fisiológicas diferentes entre sí, basados en los patrones de virulencia que muestra cada uno de ellos.

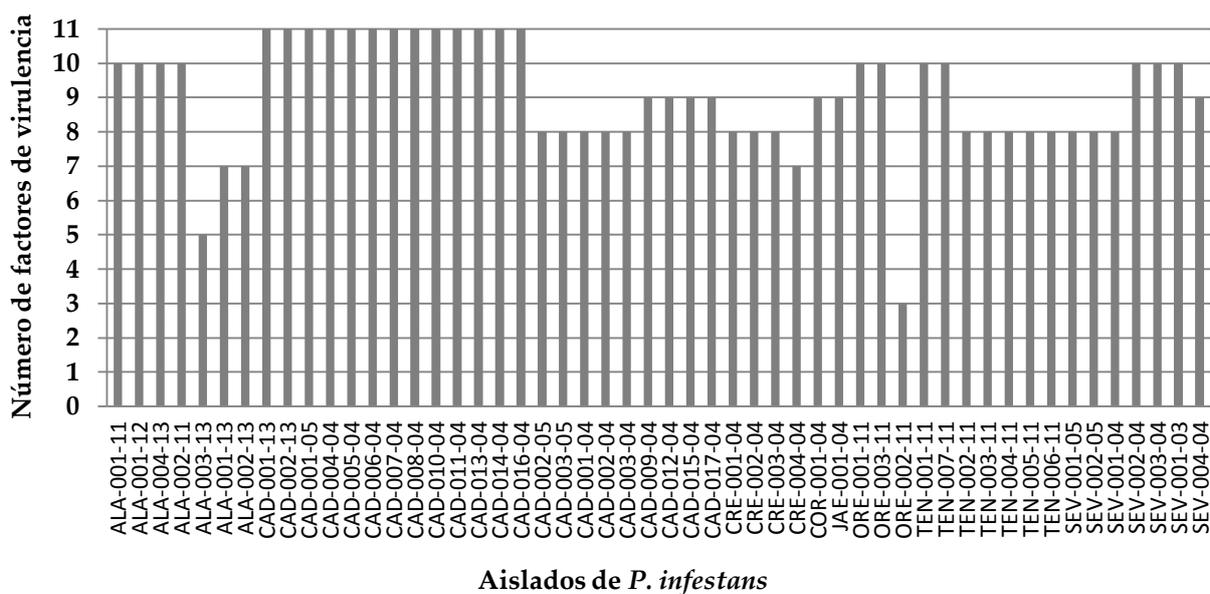


Figura 4.4. Espectro de virulencia de los aislados evaluados.

La Tabla 4.8 presenta los índices de diversidad para cada una de las provincias, se puede observar que Cádiz presenta una mayor riqueza y uniformidad en sus aislados con un valor de 3,09 para el índice relativo de Shannon, es decir mostró una mayor similitud entre las frecuencias de los diferentes fenotipos.

Por otro lado el índice relativo de Gleason reflejó un gran número de fenotipos diferentes, los aislados de Cádiz alcanzaron valores de 6,79, frente a lo encontrado en Córdoba y Jaén que presentó valores de 0,00 indicando la poca

diversidad en estas provincias, esto debido a que sólo contenían un aislado por provincia.

Tabla 4.8. Razas identificadas e índices de diversidad.

Provincia	Aislados	Razas identificadas	H_s	H_{SR}	H_G	H_{GR}
Álava	7	3	0,40	1,95	1,03	3,08
Cádiz	22	3	0,77	3,09	0,65	6,79
Ciudad Real	4	2	0,24	1,39	0,72	2,16
Córdoba	1	1	0,08	0,00	0,00	0,00
Jaén	1	1	0,08	0,00	0,00	0,00
Orense	3	2	0,20	1,10	0,91	1,82
Tenerife	7	2	0,35	1,95	0,51	3,08
Sevilla	7	3	0,41	1,95	1,03	3,08
Total	52	17				

H_s : índice de Shannon; H_{SR} : índice relativo de Shannon.

H_G : índice de Gleason; H_{GR} : índice relativo de Gleason.

4.3.2. EVALUACIÓN A FUNGICIDAS MEDIANTE AUDPCrel

La virulencia de los 4 aislados de *P. infestans* empleados en este estudio quedó demostrada por los factores de virulencia que presentaron los aislados: ALA-004-13 (1.2.3.4.5.6.7.8.10.11), ORE-003-11 y TEN-001-11(1.2.3.4.5.6.7.9.10.11) con un total de 10. Por otro lado el aislado CAD-001-13 presentó los 11 factores de virulencia (1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11). Esto demuestra los altos niveles de la enfermedad que causaron necrosis y esporulación sobre el tratamiento control, con valores elevados del AUDPCrel. En los experimentos se evidenció variaciones entre las respuestas de los diferentes aislados, situación que era de esperar debido a que poseían diferentes grados de virulencia.

La inoculación con las materias activas Metalaxyl+Mancozeb, no controlaron el ataque de los 4 aislados que se mostraron resistentes a su aplicación. Se observó una gran capacidad de esporulación y necrosis en los folíolos con todas las dosis aplicadas. Con la más baja de 6,3 mg l⁻¹ alcanzó valores medios de AUPCrel de 0,95%, mostrando un 0,73% (Figura 4.5) para la dosis más elevada (100 mg l⁻¹).

Esto evidencia que el Metalaxyl, que presentaba una acción protectante, curativa y erradicante de uso exclusivo para los oomicetos, no tuvo mayor efecto en estos aislados.

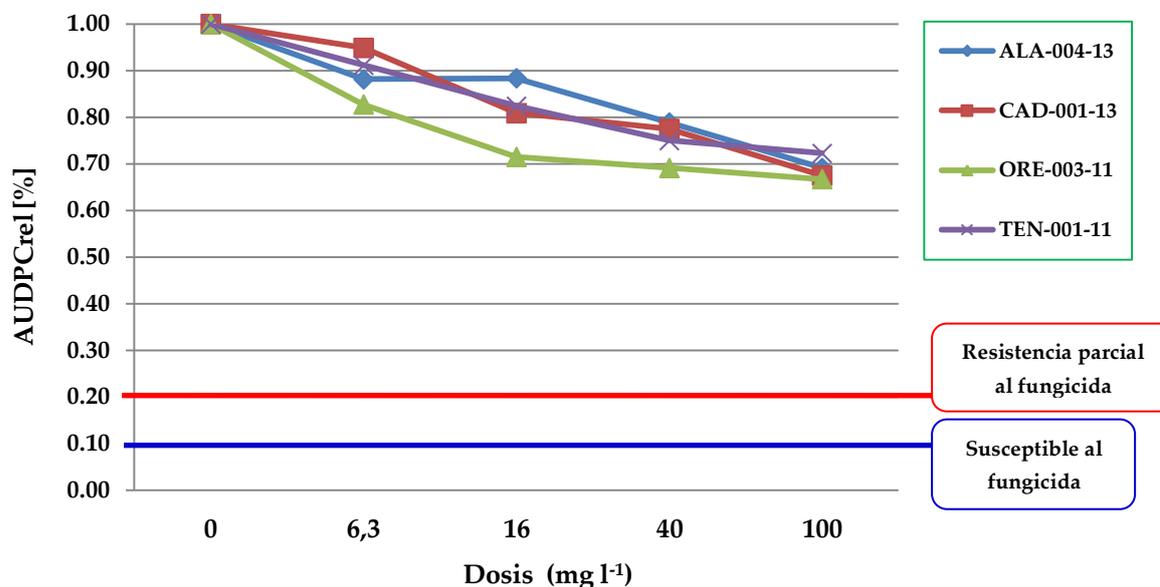


Figura 4.5. Evaluación de la sensibilidad del fungicida Ridomil Gold MZ (Metalaxyl+Mancozeb) a cuatro aislados de *P. infestans*.

Con relación a la materia activa Cimoxanilo ninguna de las dosis aplicadas presentó un control sobre los 4 aislados, siendo así que con la dosis más baja (1,8 mg l⁻¹) alcanzó valores de 0,98% en promedio, mientras que con la más elevada (12 mg l⁻¹) mostró cifras semejantes (0,94%).

Esto indicó que todos los aislados mostraron una elevada resistencia a esta materia activa en sus diferentes dosis (Figura 4.6.)

Tras la inoculación con la materia activa Benalaxil los aislados presentaron resistencia parcial con la dosis más alta (100 mg l⁻¹), con un valor medio de 0,20%.

Las dosis 6,3, 16 y 40 mg l⁻¹ mostraron altos niveles de esporulación y necrosis en los folíolos, con valores elevados de 0,91, 0,79 y 0,54%, respectivamente (Figura 4.7).

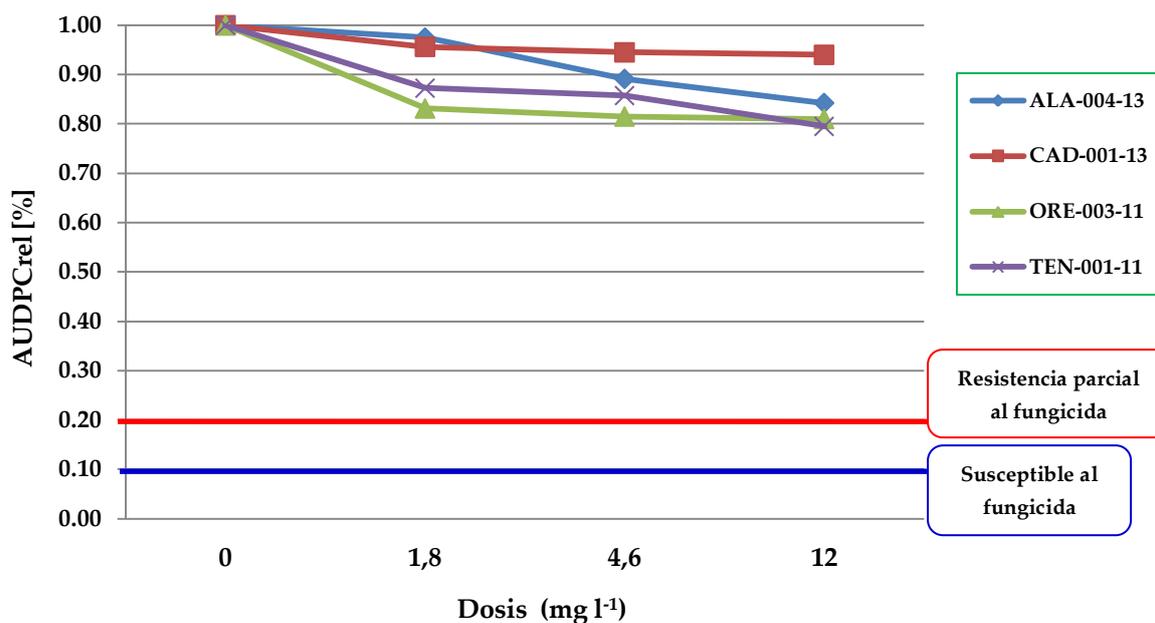


Figura 4.6. Evaluación de la sensibilidad del fungicida Curzate 60 WG (Cimoxanilo) a cuatro aislados de *P. infestans*.

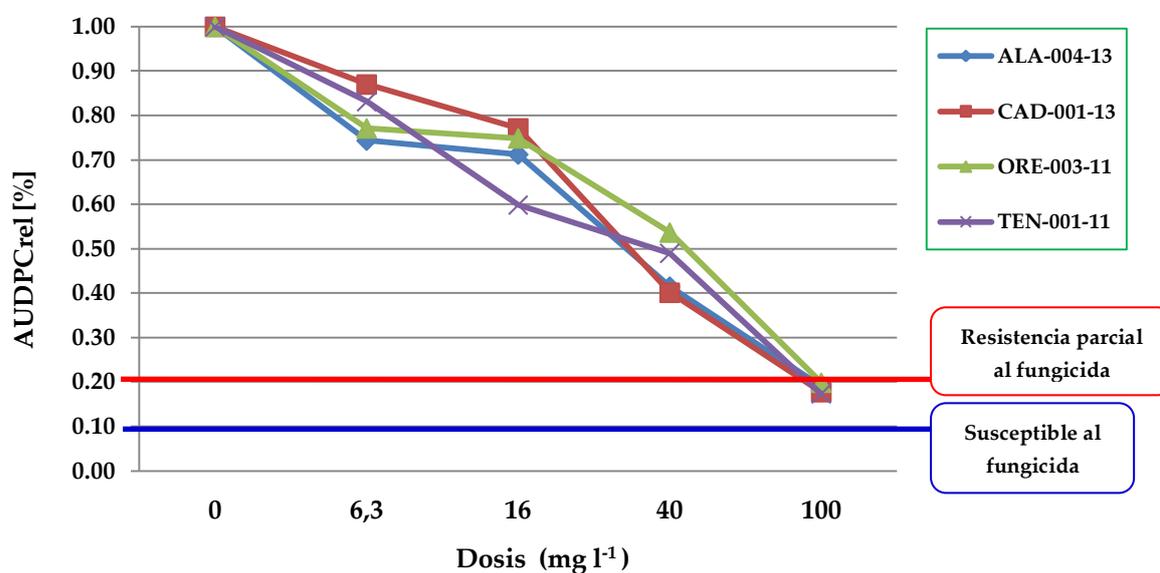


Figura 4.7. Evaluación de la sensibilidad del fungicida Galben M (Benalaxil) a cuatro aislados de *P. infestans*.

Tras la inoculación con la materia activa Ciazofamida controló a los cuatro aislados siendo éstos susceptibles para todas las dosis aplicadas con valores inferiores al 0,1%. Su acción fue antiesporulante y con cierta inhibición en la necrosis de los folíolos, alcanzando valores medios de 0,076 y 0,1% para la dosis más baja (80 μl^{-1}). Con la más elevada (500 μl^{-1}) alcanzaron valores de 0,00 y 0,011%.

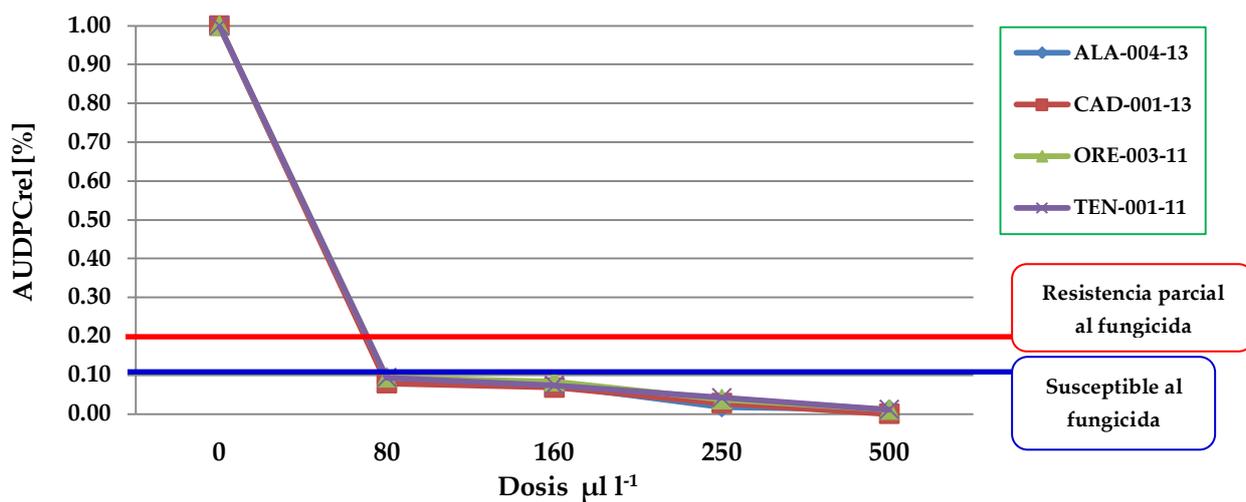


Figura 4.8. Evaluación de la sensibilidad del fungicida Ranman (Ciazofamida) a cuatro aislados de *P. infestans*.

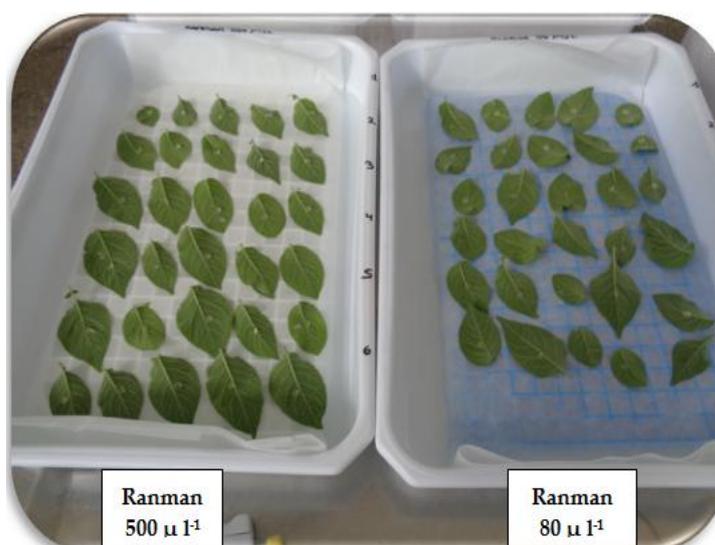


Figura 4.9. Aislados inoculados en folíolos y tratados con fungicida Ranman.

La acción de los cuatro fungicidas no tuvo el mismo efecto para todos los aislados. Con Ridomil (Metalaxyl) y Curzate (Cimoxanilo) los aislados presentaron altos niveles de esporulación y necrosis para todas las dosis, evidenciando así la resistencia de los aislados para ambos fungicidas.

En el caso del Galben (Benalaxil) se encontró resistencia parcial a los aislados con la dosis máxima de 100 mg l⁻¹, alcanzando valores de AUDPCrel entre 0,17 y 0,20%.

El fungicida Ranman (Ciazofamida) tuvo el mejor control de la enfermedad, evidenciando la susceptibilidad de los aislados a la materia activa, inhibiendo la esporulación y necrosis con todas sus dosis, mostrando valores entre 0,08 y 0,0%.

La Figura 4.10. Muestra la acción de los fungicidas sobre el control de los cuatro aislados de *P. infestans*, donde se observa a cada fungicida y su correspondiente dosis. Cada línea representa la respuesta de resistencia, resistencia parcial o susceptibilidad del aislado al fungicida aplicado, evidenciando que los cuatro aislados mostraron susceptibilidad al fungicida Ranman desde la dosis más baja (80 µ l⁻¹) hasta la dosis más alta (500 µ l⁻¹).

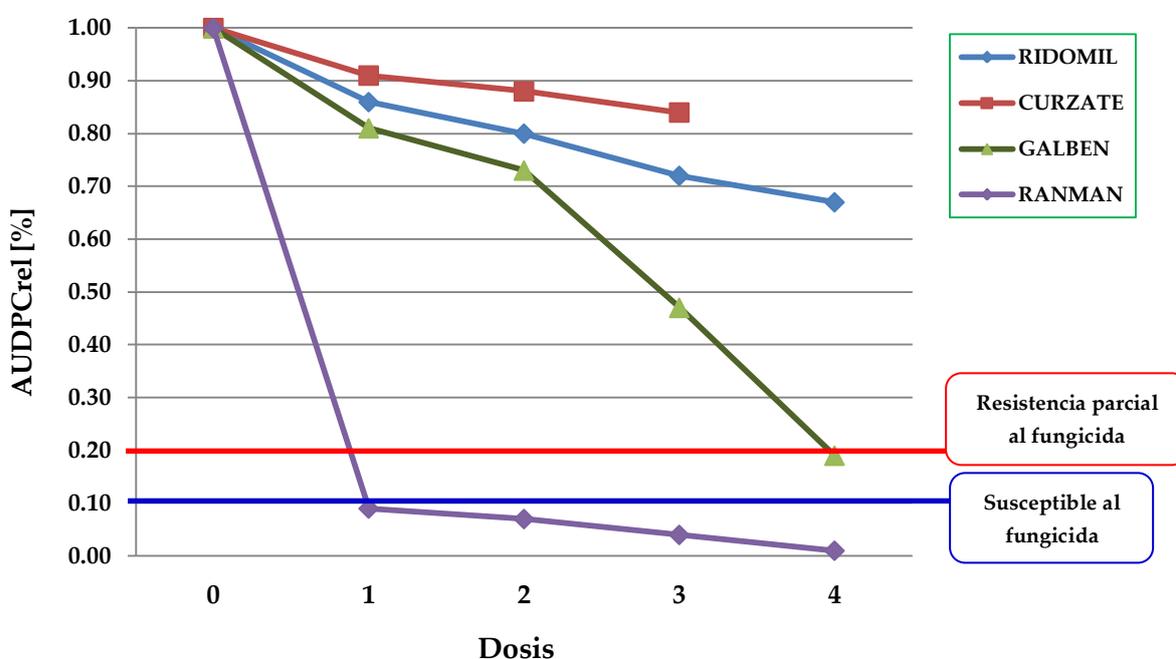


Figura 4.10. Representación gráfica de la acción de los fungicidas a cuatro aislados de *P. infestans*.

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS

No existe ningún trabajo previo sobre la agresividad y complejidad de aislados de *P. infestans* en España, por lo que este es el primer estudio que constituye un paso previo en la epidemiología del patógeno con el fin de poder iniciar un programa de mejora genética para la resistencia.

De los 11 genes de virulencia identificados en los aislados, tres de ellos mostraron la menor frecuencia (*avr5*, *avr8*, y *avr9*), lo cual concuerda con Hannukkala *et al.* (2008). Estos autores, identificaron patotipos complejos (1.3.4.5.7.10.11) observando un incremento de estos genes de virulencia entre el 5,6% al 7,5% en Finlandia y Rusia. Asimismo, Andrivon *et al.* (2004) y González *et al.* (2006) mencionan que la virulencia *avr2*, *avr5*, *avr8* y *avr9* es poco frecuente en ciertas partes de Europa.

En el presente trabajo se han identificado 17 razas de 8 provincias prospectadas, donde la más compleja fueron un grupo de aislados de Cádiz con 11 factores de virulencia (*avr1*, *avr2*, *avr3*, *avr4*, *avr5*, *avr7*, *avr8* y *avr9*, *avr10*, *avr11*). En Polonia, Lebecka *et al.* (2007) describieron razas con un promedio de 8 factores. Sin embargo en otros países como Argelia, Beninal *et al.* (2009) han descrito patotipos con todos los factores de virulencia, al igual que en este estudio. Otras explicaciones de la mayor complejidad de las nuevas razas, además de la recombinación sexual, han sido propuestas por Goodwin (1997). El autor menciona que existe una tasa moderada de mutación, produciendo billones de esporangios, con una fuerte presión de selección impuesta por genes de resistencia y fungicidas. Esto sería suficiente para generar toda la variabilidad observada en virulencia y sensibilidad a las materias activas existentes. El mismo autor menciona que US-1 fue probablemente el único patotipo de *P. infestans* en Europa antes de 1970, antes de la llegada del tipo de apareamiento A2, pero la gran variación de virulencia hacia los 11 genes *R* de la serie diferencial, fue posiblemente el resultado de mutaciones dentro del linaje clonal de dicho patotipo. La hibridación del patógeno con otras especies sería otra fuente potencial de variabilidad genética, ya que se han obtenido en laboratorio, híbridos interespecíficos entre *P. infestans* y *P. mirabilis* (Goodwin y Fry, 1994).

Otra posible explicación sería el efecto del cambio de ploidía en el patógeno. Tooley *et al.* (1989) encontraron aislados A2 en Polonia con un alto contenido de ADN, los cuales serían pentaploides o hexaploides. Asimismo, Grünwald y Flier (2005) ya describió la existencia de aislados británicos tetraploides. Dichos aislados podrían ser portadores tanto del locus *A1* como

del A2 en un mismo aislado, debido a la duplicación de su genoma, lo cual les da capacidad para producir oosporas con ambos tipos de apareamiento.

Otra hipótesis está relacionada con las migraciones como la fuente principal de incremento en los factores de virulencia y diversidad de razas. En Canadá, Estados Unidos y Reino Unido se han detectado cambios drásticos en la estructura genética y fisiológica de la población de este patógeno, describiendo la aparición de nuevos linajes y una mayor complejidad (Peters *et al.*, 1998).

Swiezynski *et al.* (2000), analizaron aislados recolectados antes y después de las migraciones descritas por Fry *et al.* (1991), Goodwin (1997) y Forbes *et al.* (1997) hacia Norteamérica y Europa. Los resultados confirmaron la presencia de 11 factores de virulencia en ambas poblaciones, sugiriendo que su incremento no proviene de la introducción de nuevos patotipos. Esto podría ser causado, por la presencia de recombinación sexual debido a la existencia de los tipos de apareamiento A1 y A2 del patógeno (Grünwald y Flier, 2005).

Todos estos estudios indicarían que la alta complejidad de las nuevas razas de *P. infestans* no sólo se deben a la recombinación sexual *per se* (Oliva *et al.*, 2002), sino además a recombinaciones de tipo no sexuales como mutaciones, hibridaciones somáticas interespecíficas, parasexualidad o migraciones, lo que otorgan al patógeno unas condiciones adaptativas a situaciones extremas.

El índice relativo de Gleason (H_{GR}) fue superior al índice de Shannon (H_{SR}) para las localidades de Álava, Cádiz, Tenerife y Sevilla lo que indica que la riqueza de la diversidad de los aislados es relativamente alta. Estos datos concuerdan con lo encontrado por Dowley *et al.* (2000), los cuales describen un índice de Gleason superior al de Shannon con valores de 3,02 y 1,67, respectivamente.

Por su parte Lebreton *et al.* (1998) mencionaron que las variaciones en la diversidad y la complejidad eran evidentes entre poblaciones de diferentes años, así como entre las del mismo año de diferentes procedencias. En Bretaña, la complejidad encontrada fue mayor en 1994 que el año anterior. La diversidad de razas en las poblaciones francesas fue, no obstante, moderada, en comparación con otras europeas, como en Holanda, donde se encontraron 25 razas entre los 77 aislamientos evaluados (Schöber y Turkensteen, 1992).

La diversidad genética observada en el presente estudio confirma lo descrito para la región central de Méjico, donde predominó la reproducción sexual del patógeno. Las poblaciones mostraron una gran heterogeneidad,

detectando más de 20 genotipos en un campo experimental de Chapingo. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Matuszak *et al.* (1994) quien identificó 15 genotipos en 33 aislados procedentes de un solo campo de cultivo.

4.4.2. RESISTENCIA DE LOS AISLADOS A FUNGICIDAS

Una pequeña población de aislados puede sobrevivir a la aplicación de fungicidas por diferentes razones, según Gisi *et al.* (1997):

- a. Escape por deficiencias en las aplicaciones, las cuales no cubren completamente las plantas.
- b. Algunos individuos de la población son menos sensibles que otros, de tal forma que no son controlados y continúan los ciclos de multiplicación.
- c. Pueden llegar los inóculos de campos próximos, no tratados o en los que el fungicida redujo su acción por degradación.

Existen varias materias activas desarrolladas específicamente para combatir a los oomicetos, como las Fenilamidas, y dentro de éstas el Metalaxyl, Benalaxil y el Oxadixil.

Al fungicida comercial Galben M cuyo principio activo es el Benalaxil, los aislados evaluados presentaron resistencia parcial con la dosis más elevada (100 mg l⁻¹). Sin embargo, a dosis bajas mostraron resistencia. Resultados similares encontraron Davidse *et al.* (1995) en contraste con otras Fenilamidas, donde demostraron que el Benalaxil a concentraciones superiores a 100 mg l⁻¹ afectaba la inhibición de absorción de la uridina en la captación de micelio del patógeno, así como también la actividad de la polimerasa de ARN nuclear. Oyarzun *et al.* (2001) encontraron también resistencia de los aislados a las Fenilamidas como Metalaxyl, Ofurace, Benalaxil y Oxadicyl.

Estos resultados pueden estar relacionados con la efectividad de algunas materias activas en diversas regiones del mundo, donde se ha venido reduciendo gradualmente. Esto puede ser resultado de la aparición de poblaciones del patógeno más resistentes, debido posiblemente, a la alta presión de selección ejercida por el uso continuo de dichas moléculas.

Con respecto al desarrollo del Metalaxyl fue un éxito en el control del patógeno, por su efectividad a bajas dosis en condiciones de alta presión de la enfermedad. Esto hizo que fuera tan atractivo para los agricultores quienes explotaron sus potencialidades al máximo, presionando así la resistencia (Nuninger *et al.*, 1995). Estudios posteriores demostraron que el Metalaxyl tiene

poco efecto en la germinación del esporangio o de las zoosporas así como en su movilidad. La penetración y la formación de haustorios en la planta no le afecta, ejerciendo su efecto fungitóxico sólo en el interior de la misma (Riveros *et al.*, 2003).

Sin embargo, la rápida generación de resistencia del patógeno al Metalaxyl, obligó a su retirada del mercado por algún tiempo. Transcurrido un tiempo fue nuevamente reintroducido en varios países como Suiza, Irlanda y Holanda, en forma de mezclas con protectantes (Mancozeb) y otros sistémicos. Con ello se pretendía evitar, que en un corto plazo las poblaciones de *P. infestans* se volvieran nuevamente resistentes.

El tipo de apareamiento de los aislados ha coincidido en este ensayo como el tipo A2 el cual ha ido desplazando progresivamente al tipo A1. Esto puede ser debido a las nuevas variantes del A2 que presentan una mayor agresividad y virulencia. Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que los cuatro aislados seleccionados por su agresividad y de diferentes zonas productoras de patata mostraron resistencia al Metalaxyl. Esto explicaría las dificultades de los agricultores para combatir la enfermedad en los últimos años con este principio activo.

Beninal *et al.* (2009) trabajaron con aislados de Argelia, y encontraron que ninguno mostró sensibilidad completa. Esto puede suponer la existencia de una posible adaptación progresiva del patógeno, favorecida quizás por el empleo tradicional de Metalaxyl para el control de la enfermedad.

Los patotipos resistentes pueden estar presentes en las poblaciones de campo en altas proporciones, pero en un equilibrio dinámico con los patotipos sensibles. Las dinámicas de la evolución de la resistencia están influenciadas no sólo por la resistencia a las Fenilamidas, sino por la herencia genética, los antecedentes de resistencia, la eficacia biológica y la migración de las poblaciones (FRAC, 2002).

Otros estudios indican que la agresividad y sensibilidad a los fungicidas no parecen estar ligadas al tipo de apareamiento (Corbière *et al.*, 2008; Möller *et al.*, 2009). El reciente aumento de la resistencia al Metalaxyl en el Reino Unido se asocia más bien a la invasión de un genotipo en particular. En 2008, la proporción de aislados pertenecientes al denominado "Blue 13" del tipo A2 superaba el 80% (Lees *et al.*, 2008), y hasta la fecha, todos los aislados con este genotipo han mostrado resistencia a las Fenilamidas. Igualmente, desde 2005, se ha venido observando un incremento de las cepas resistentes al Metalaxyl en el Norte de Irlanda (Cooke *et al.*, 2008). Por ello, en los últimos años se ha recomendado limitar el número de aplicaciones de esta materia activa, y

desde 2008, incluso se ha llegado a sugerir el uso de otro tipo de materia activa en los programas de lucha química contra la enfermedad (Cooke *et al.*, 2011).

Erwin y Ribeiro (1996), argumentan que no están claros los mecanismos por los cuales surge la resistencia al Metalaxyl, pero dado que es una especie diploide, la progenie de oosporas aisladas de cruces entre un aislado sensible y uno resistente, es consistente con la explicación de que la resistencia fuera gobernada por un locus simple, con dominancia incompleta.

El FRAC (Fungicide Resistance Action Commite) en 2002 menciona que el modo de resistencia puede involucrar uno o dos genes mayores y potencialmente varios genes menores. Sin embargo, no se conoce si el cambio en el mismo locus es siempre el responsable de la insensibilidad. Por analogía con otros sistemas, aquélla puede resultar de una gran variedad de mecanismos incluyendo desactivación, transporte o metabolismo alterado del fungicida, así como un cambio en el blanco de las Fenilamidas. Además varios loci pueden contribuir a la insensibilidad, siendo claro que afecta a la síntesis del ARN (Judelson y Roberts, 1999).

Por otro lado el patógeno mostró resistencia a la materia activa Cimoxanilo en todas las dosis aplicadas. Los resultados coinciden con los obtenidos por Jaramillo *et al.* (2002) y Ochoa (2004). Esta situación ha conducido a la necesidad de emplear otros fungicidas sistémicos como alternativas, los cuales requieren evaluación constante para controlar la evolución del patógeno.

Geddens *et al.* (2002) observaron que el Cimoxanilo (60%) fue efectivo para el control de *P. infestans* en Francia, sólo cuando las temperaturas, densidad del inóculo y daño de la enfermedad en los tallos fueron bajas. Kessel *et al.* (2002) lo señala, sin embargo, como poco efectivo para la inhibición de las oosporas, en las zonas donde potencialmente se puedan presentar los dos tipos de apareamiento del patógeno. García *et al.* (2008) observaron en dos aislados cierta tolerancia a esta materia, produciendo entre 1500 y 2500 esporangios/ml y unos niveles de enfermedad del 24% y 13%, respectivamente, aún bajo la dosis máxima evaluada de 12 mg·l⁻¹.

La resistencia al Cimoxanilo puede estar asociada a las variaciones en las poblaciones presentes en determinadas áreas, caracterizadas por la ocurrencia de ambos tipos de apareamiento. Esto constituye un factor de riesgo en la dispersión del gen dominante de resistencia vía reproducción sexual (Ochoa, 2004).

Todos estos resultados alertan sobre la posibilidad real de ocurrencia de poblaciones resistentes de oomicetos al Cimoxanilo, a pesar de que dicha molécula es calificada por la FRAC (2006) con un nivel de riesgo bajo. Los cuatro aislados evaluados en este trabajo han mostrado resistencia a esta materia, alcanzando valores relativos de 0,98% de infección en promedio. Esto es un indicativo de la necesidad de continuar con la prospección y del establecimiento de medidas que eviten la aparición de patotipos con mayor resistencia, reduciendo la utilización del Curzate y alternando su aplicación con otros fungicidas sistémicos (Gullino *et al.*, 1997).

Por su parte la Ciazofamida 40% (Ranman), controló la enfermedad en todas las dosis aplicadas con valores de AUDPCr inferiores al 0,10%. Estos resultados concuerdan en parte con Esparza *et al.* (2009), el cual realizaron un ensayo en tomate obtuvieron valores de 0,44%, con el menor porcentaje de frutos afectados.

Del mismo modo, Barraza *et al.* (2002) encontró buenos resultados en evaluaciones de campo en patata realizadas en Chile. Según su experimentación el mejor control se obtuvo con Dimetomorfo+Mancozeb, seguidos de Pyraclostrobin y la Ciazofamida. Hasta el momento no se ha descrito resistencia cruzada con fungicidas existentes en estos grupos de materias activas. Por ello y este principio convierte actualmente a Ranman en una herramienta clave para el control de la enfermedad.

La acción de la Ciazofamida se produce, bloqueando los centros de energía del patógeno al romper la cadena de transporte de electrones en el complejo *bc1* del sitio Qi a nivel mitocondrial, lo que impide su desarrollo. Se recomienda, para evitar daños sobre el cultivo, comenzar el tratamiento nada más observar los primeros síntomas, manteniendo aplicaciones cada 10-12 días.

La presente investigación contribuye a la implantación de los sistemas de seguimiento de los niveles de sensibilidad de las poblaciones de *P. infestans* frente a las principales materias activas fungicidas existentes actualmente. La metodología empleada ha sido probada en diferentes patosistemas (FRAC, 2007) y, aunque los resultados pueden diferir con la ocurrencia de la resistencia en campo, son un indicativo del comportamiento que presentan las poblaciones de oomicetos ante un fungicida en particular.

Capítulo 5

**Evaluación de fuentes de
resistencia a *P. infestans***

5.1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de resistencia genética en especies silvestres o variedades nativas cultivados puede además contribuir a la adquisición de caracteres deseables relacionados con el valor nutricional y adaptación a condiciones climáticas extremas (FAO, 2013). Es por ello que la introgresión de nuevos genes *R* desde especies emparentadas al entorno genético de la patata tetraploide, es una de las vías más adecuadas para obtener variedades resistentes más duraderas (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2010).

Se han realizado búsquedas fuentes de resistencia a mildiu en diferentes especies del *G. Solanum*. En 1994, Hawkes identificó genes de interés en entradas de *S. berthaultii*, *S. bulbocastanum*, *S. circaeifolium*, *S. demissum*, *S. microdontum*, *S. phureja*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium*, *S. stoloniferum*, *S. tarijense*, *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. vernei* y *S. verrucosum*.

Posteriormente, se identificaron 11 genes mayores (R_1 a R_{11}) de resistencia específica o hipersensibilidad en la especie silvestre *S. demissum*, incorporándolos en nuevos cultivares (Umaerus y Umaerus, 1994) y siendo mapeados parte de ellos (Bradshaw *et al.*, 2006). Alrededor del 83% de las variedades alemanas portan genes de esta especie en su pedigrí, al igual que un 26% del Reino Unido, Escocia y EE.UU. (Estrada, 2000). Muchos de estos cultivares que poseen uno o varios genes *R*, han mostrado además un buen nivel de resistencia en campo (Gebhardt y Valkonen, 2001).

Asimismo se han identificado genes en otras especies como *S. chacoense* y *S. phureja*, los cuales han sido transferidos al entorno *Tuberosum* mediante hibridación sexual (Hermanova *et al.*, 2007). Asimismo, se han mapeado tres genes *R* en *S. bulbocastanum* tales como *Rpi-blb1* (Van der Vossen *et al.*, 2003), *Rpi-blb2* (Van der Vossen *et al.*, 2005) y *Rpi-blb3* (Park *et al.*, 2005) situados en los cromosomas VIII, VI y IV, respectivamente, aunque no puede ser cruzada con *S. tuberosum*. Posteriormente, se descubrieron genes homólogos a *RB/Rpi-blb1* en *S. stoloniferum* y *S. verrucosum*, especies que pueden ser hibridadas directamente con la patata cultivada (Wang *et al.*, 2008). Se han identificado otros genes de resistencia en varias especies silvestres como *S. berthaultii* (Ewing *et al.*, 2000), *S. mochiquense* (Smilde *et al.*, 2005), *S. pinnatisectum* (Kuhl *et al.*, 2001), *S. phureja*, *S. ruiz-ceballosii* y *S. kurtzianum* (Śliwka *et al.*, 2010).

Además se han identificado genes de resistencia tanto a nivel foliar como en tubérculo en especies silvestres como *S. nigrum* (Lebercka, 2009), *S. verrucosum* (Liu y Halterman, 2009), *S. berthaultii* y *S. bulbocastanum* (Gebhardt y Valkonen, 2001). Otros genes de interés se han descrito en *S. circaeifolium*, *S.*

microdontum, *S. phureja*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium*, *S. stoloniferum*, *S. tarijense*, *S. tuberosum* subsp. *andigena* y *S. vernei* (Hawkes, 1994).

En la actualidad, diversos factores pueden incrementar la virulencia del patógeno. Entre ellos están la migración a nivel mundial de los dos tipos de apareamiento de *P. infestans*, lo cual implica una reproducción sexual que posiblemente incrementa la variabilidad genética, que da como consecuencia un amplio espectro de virulencia, haciendo más difícil el control químico y cultural de la enfermedad (Henfling, 1987). López *et al.*, 1997 encontró 3 aislados que presentaba una raza compleja con 8 factores de virulencia (1.2.3.4.6.7.10.11) de los 19 recolectados del departamento de Antioquia (Colombia).

De igual manera Díaz *et al.*, 2003, evaluó 4 aislados colectados en el altiplano cundiboyacense y Antioquia en Colombia, encontrando una raza compleja con 9 factores de virulencia (1.2.3.4.6.7.8.10.11). Ante este incremento de la virulencia se hace necesario buscar nuevas fuentes de resistencia en otras especies silvestres o híbridos somáticos, en el apartado 4.3.1, la Tabla 4.6 del capítulo 4, se identificó una raza compleja con 11 factores de virulencia de la provincia de Cádiz, esta raza es ideal para el testaje y evaluar la resistencia a *P. infestans*.

El objetivo del presente capítulo ha sido la identificación de nuevas fuentes de resistencia en 41 genotipos incluyendo especies silvestres del *G. Solanum* e híbridos somáticos a dos patotipos de *P. infestans* con diferentes factores de virulencia y tipos de apareamiento.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Estuvo constituido por los aislados ALA-001-13 de la provincia de Álava con tipo de apareamiento *A1*, y el aislado CAD-001-13 originario de Cádiz del tipo *A2*. Ambos aislados provienen de la evaluación según el espectro de virulencia del Capítulo 4. Tal es así que el aislado ALA-001-13 posee 7 factores de virulencia (1.3.4.7.8.10.11) y pertenece al genotipo 2_*A1*, por otro lado el aislado CAD-001-13 tiene 11 factores de virulencia (1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11) y corresponde al genotipo 13_*A2*_68 (variante de Blue 13) y cuyas reacciones de compatibilidad con los genes *R* se han presentado en la Tabla 4.5 del Capítulo 4.

5.2.2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal evaluado estuvo compuesto por 24 especies silvestres del G. *Solanum* y 17 híbridos somáticos, conservados en el Banco de Germoplasma de Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario – Neiker Tecnalia. (Tabla 5.1 y 5.2).

Dentro del citado banco (www.germoplasma.net) se mantienen más de 400 variedades comerciales y alrededor de 70 especies silvestres del G. *Solanum*. Estudios previos (Ruíz de Galarreta *et al.*, 1998) han indicado que más del 70% de las entradas evaluadas mostraron una o más resistencias frente a diferentes patógenos.

La micropropagación de las especies silvestres e híbridos somáticos se realizó siguiendo la misma metodología que para los clones diferenciales tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.2 del Capítulo 4.

Posteriormente, las plántulas se aclimataron en bandejas con perlita y solución nutritiva líquida (micro y macronutrientes) durante 12 días. Seguidamente, se trasladaron a macetas con sustrato estéril en invernadero a una temperatura entre 20-24 °C, y 12 h de fotoperíodo (Figura 5.1.)



Figura 5.1. A: Aclimatación de las especies silvestres e híbridos somáticos. B: Trasplante a macetas en invernadero.

5.2.3. FUENTES DE RESISTENCIA

5.2.3.1. Búsqueda de fuentes de resistencia

La búsqueda de fuentes de resistencia a *P. infestans* se realizó en las 24 especies silvestres y los 17 híbridos somáticos elegidos, utilizando los aislados más complejos o con mayor número de factores de virulencia previamente seleccionados.

La metodología en la preparación del inóculo y la infección de los folíolos fue la misma que la descrita en el apartado 4.2.4.1 del Capítulo 4, sobre la determinación del espectro de virulencia.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado con dos repeticiones, inoculando cinco folíolos por genotipo, empleando como control susceptible la variedad Bintje.

Tabla 5.1. Especies silvestres evaluados a *P. infestans*.

Nº	Código	Especie	Ploidía	Procedencia
1	NKS-007	<i>S. boliviense</i>	24	Bolivia
2	NKS-008	<i>S. brachistotrichum</i>	24	Méjico
3	NKS-009	<i>S. brachycarpum</i>	72	Méjico
4	NKS-014	<i>S. bulbocastanum</i>	24	Méjico
5	NKS-019	<i>S. commersonii</i>	24	Argentina
6	NKS-021	<i>S. doddsii</i>	24	Bolivia
7	NKS-042	<i>S. neorossii</i>	24	Argentina
8	NKS-047	<i>S. pinmatisectum</i>	24	Méjico
9	NKS-048	<i>S. pinmatisectum</i>	24	Méjico
10	NKS-050	<i>S. polyadenium</i>	24	Méjico
11	NKS-051	<i>S. polytrichon</i>	48	Méjico
12	NKS-052	<i>S. raphanifolium</i>	24	Perú
13	NKS-054	<i>S. sparsipilum</i>	24	Bolivia
14	NKS-055	<i>S. stoloniferum</i>	48	Méjico
15	NKS-056	<i>S. stoloniferum</i>	48	Méjico
16	NKS-070	<i>S. demissum</i>	72	Méjico
17	NKS-080	<i>S. trifidum</i>	24	Méjico
18	NKS-084	<i>S. circaeifolium ssp. quimense</i>	24	Bolivia
19	NKS-097	<i>S. caripense</i>	24	Costa Rica
20	NKS-098	<i>S. caripense</i>	24	Costa Rica
21	NKS-099	<i>S. caripense</i>	24	Costa Rica
22	NKS-100	<i>S. fraxinifolium</i>	24	Costa Rica
23	NKS-106	<i>S. taenotrichum</i>	24	Costa Rica
24	NKS-107	<i>S. woodsonii</i>	24	Costa Rica

Tabla 5.2. Híbridos somáticos evaluados a *P. infestans*.

N°	Código	Pedigrí
1	NKH-021	Fusiones al azar
2	NKH-039	Fusiones al azar
3	NKH-044	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>
4	NKH-045	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>
5	NKH-053	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>
6	NKH-054	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>
7	NKH-055	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>
8	NKH-056	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>
9	NKH-058	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>
10	NKH-059	<i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i>
11	NKH-072	<i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i>
12	NKH-077	<i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i>
13	NKH-084	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>
14	NKH-087	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>
15	NKH-095	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>
16	NKH-096	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>
17	NKH-097	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>

5.2.3.2. Evaluación de la resistencia

El grado de resistencia de las especies silvestres e híbridos somáticos se determinó en base a dos parámetros: Índice de la Enfermedad (IE) y el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad relativa (AUDPCrel), este último tal y como aparece en el apartado 4.2.5 del Capítulo 4. Los genotipos se clasificaron según la escala de Gabriel *et al.* (2007), como resistentes con valores inferiores a 0,21; moderadamente resistentes entre 0,21 y 0,35 y susceptibles, mayores de 0,35.

5.2.3.3. Determinación del Índice de la Enfermedad (IE)

Se calculó siguiendo el método de Brenes (2000) y Pérez *et al.* (2001) como el resultado del producto entre el área foliar necrosada y el grado de esporulación.

El primero se midió en una escala de 1 al 9, y el segundo con unos valores entre 0 y 3 tal y como se refleja en la Tabla 5.3

El genotipo se considero *resistente* con un Índice de Enfermedad entre 0-9, *medianamente resistente* entre 10-18 y *susceptible* con valores situados entre 19-27.

Tabla 5.3. Criterios utilizados para la evaluación del área foliar necrosada y el grado de esporulación.

Área necrosada		Grado de esporulación	
<i>Valor</i>	<i>Criterio</i>	<i>Valor</i>	<i>Criterio</i>
1	Sin síntomas	0	Sin esporulación
2	Puntos necróticos menores a 2 mm	1	Algunos esporangios en el área necrosada
3	Puntos necróticos mayores a 2 mm	2	50% del área necrosada con esporangios
4	Aprox. 1 cm ² del área del foliolo necrosada	3	100% del área necrosada con esporangios
5	50% del área del foliolo necrosada		
6	51-65% del área del foliolo necrosada		
7	66-75% del área del foliolo necrosada		
8	76-85% del área del foliolo necrosada		
9	> 85% del área del foliolo necrosada		

5.2.3.4. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza para AUDPCrel y el Índice de la Enfermedad (IE), del área foliar necrosada y grado de esporulación, con el PROC GLM y el Completely Randomized Design del programa estadístico GenStat (www.genstat.co.uk, Edición 12).

Asimismo, se calculó la separación de medias mediante el LSD (Mínima Diferencia Significativa) al nivel de 0,05 de probabilidad.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA

La inoculación de los 41 genotipos con los patotipos ALA-001-13 (A1) y CAD-001-13 (A2), mostró diferencias en cuanto al grado de infección.

De esta forma se han identificado diferentes grados de resistencia, basados en los valores del AUDPCrel e Índice de Enfermedad (IE).

5.3.1.1. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad Relativa

El análisis de varianza del AUDPCrel, mostró diferencias altamente significativas (nivel 0,001) entre los genotipos evaluados para este parámetro. Asimismo, se encontró alta significación entre tipos de apareamiento y la interacción de este con el genotipo (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. ANOVA para el AUDPCrel en 24 especies silvestres y 17 híbridos somáticos.

Fuentes de Variación	gdl	Cuadrados medios
Genotipos	41	0,46***
Aislados	1	1,43***
Genotipos x Aislados	41	0,037***
Rep.	1	0,003
Error	83	0,002
Total	167	

CV=11,6%; *** significativo al nivel de probabilidad del 0,001

El control susceptible Bintje junto con los genotipos NKS-042, NKS-050, NKS-052, NKS-054, NKS-084 y NKH-021 alcanzaron los valores de AUDPCrel más elevados, con intervalos de 0,84 y 0,99 para el aislado A1 y con un intervalo entre 0,91 y 0,98 para el tipo A2 (Figura 5.2.)

Por otra parte, las especies silvestres que mostraron la mayor resistencia para el patotipo ALA-001-13 (A1) fueron NKS-009, NKS-014, NKS-056, NKS-097, NKS-098, NKS-099, NKS-100 y NKS-106, con valores entre 0,0 a 0,19. En cuanto a los híbridos somáticos, todos mostraron alta resistencia excepto NKH-039 y NKH-021 con resistencia parcial y susceptibilidad, respectivamente (Figura 5.2)

Respecto al patotipo CAD-001-13 (A2), las especies que mostraron una mayor resistencia fueron NKS-014, NKS-097, NKS-098, NKS-099, NKS-100, con valores entre 0,0 y 0,08.

Por otro lado, los híbridos somáticos NKH-053, NKH-058, NKH-059 y NKH-087 resultaron ser los más resistentes con valores medios entre 0,00 y 0,04. Todos estos genotipos mostraron valores de AUDPCrel inferiores a 0,21 sin infección visible del patógeno.

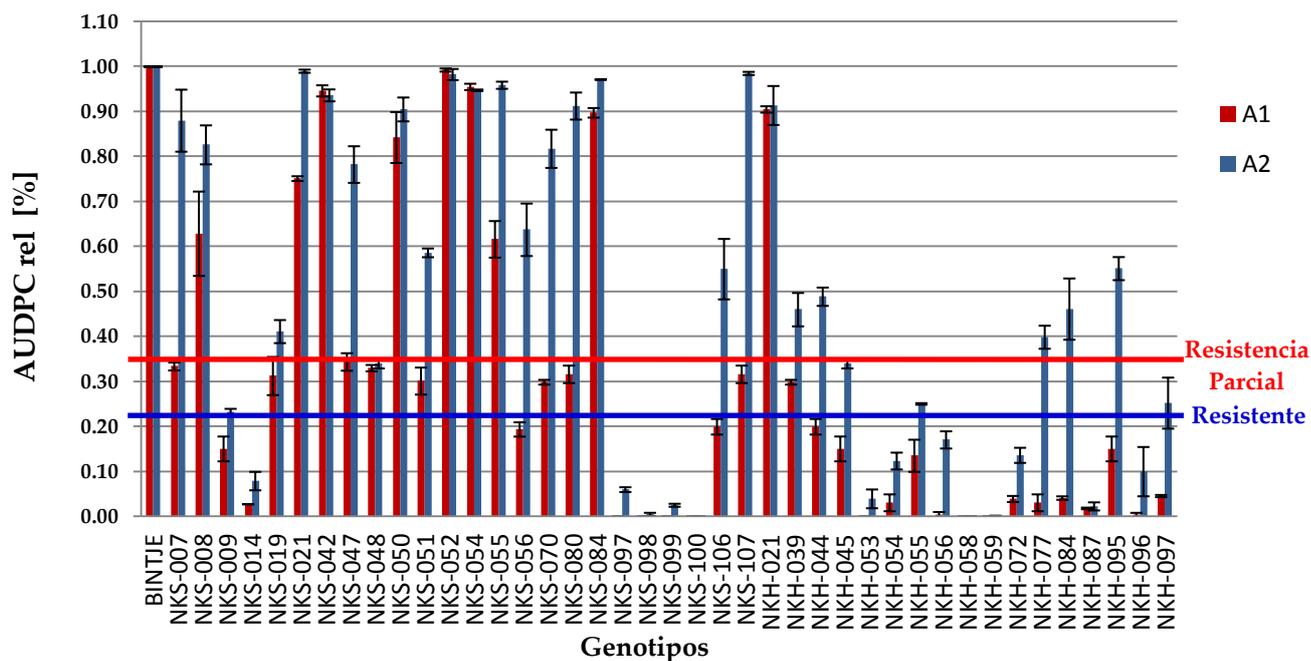


Figura 5.2. AUDPCrel para las especies silvestres e híbridos somáticos evaluados

5.3.1.2. Índice de la Enfermedad (IE)

El análisis de varianza del *área foliar necrosada* mostró diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$) entre los genotipos evaluados, así como para la interacción del genotipo con el aislado (Tabla 5.5).

La separación de medias evidenció que los genotipos NKS-098, NKS-100 presentaron el grado de necrosis más bajo para ambos tipos de apareamiento tanto para A1 y A2, por otro lado el genotipo NKS-097 presentó el grado de necrosis bajo para el tipo A1. (Tabla 5.6).

Tabla 5.5. ANOVA para el área foliar necrosada.

Fuentes de Variación	gdl	Cuadrados medios
Genotipos	41	31,68***
Aislados	1	67,89***
Genotipo x Aislados	41	2,45***
Rep.	1	0,00095
Error	83	0,15
Total	167	

CV= 6,5%; *** significativo al nivel de probabilidad del 0,001

La figura 5.3 muestra el área foliar necrosada para los dos aislados, con una media para el tipo *A1* de 5,35 y 6,62 para el *A2*. La mínima diferencia significativa (LSD 0,05) fue de 0,118.

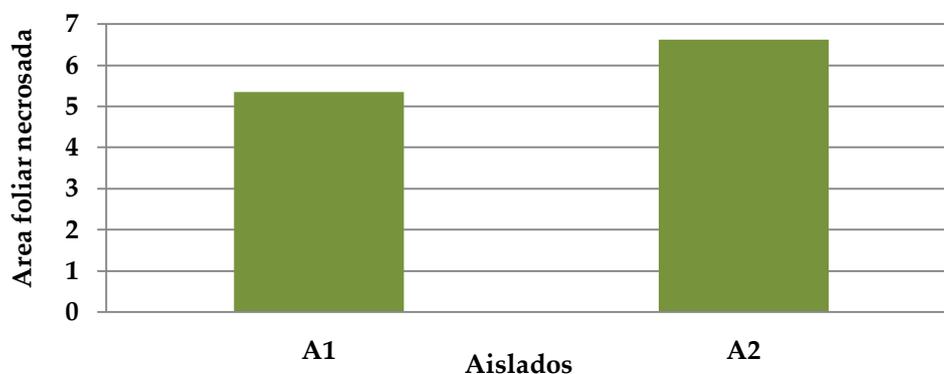


Figura 5.3. Área foliar necrosada para ambos aislados.

En cuanto al *grado de esporulación*, el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre genotipos, aislados y la interacción genotipos x aislados. (Tabla 5.7).

La separación de medias mostró a los genotipos NKS-098, NKS-100, NKH-058 y NKH-059, con el grado de esporulación más bajo para ambos aislados (*A1* y *A2*). Por otro lado, NKS-096, NKS-097, NKS-099, NKH-053 y NKH-056, sólo presentaron el grado de esporulación bajo para el tipo de apareamiento *A1*. (Tabla 5.8).

La figura 5.4 muestra el grado de esporulación para los dos aislados (*A1* y *A2*), con una media para el tipo *A1* de 1,46 y 1,96 para el tipo *A2* respectivamente. El LSD (0,05) fue de 0,0595.

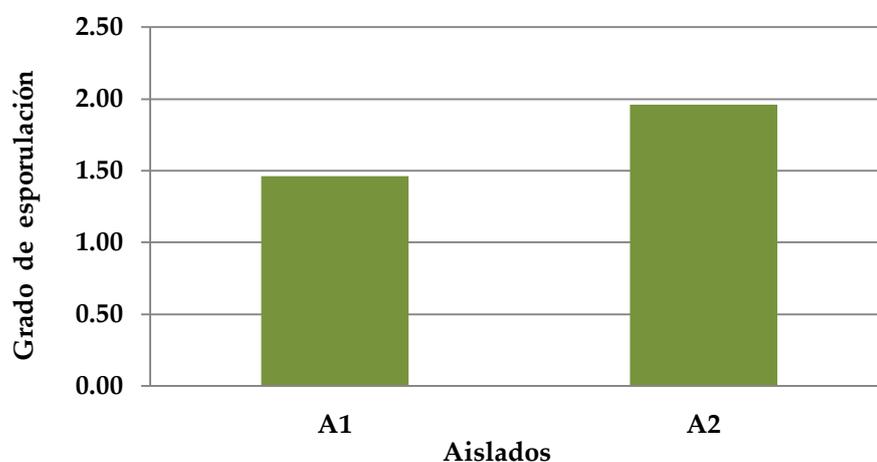


Figura 5.4. Grado de esporulación para ambos aislados.

Tabla 5.6. Medias del área foliar necrosada en el conjunto de genotipos evaluados.

Genotipos	Área necrosada	Genotipos	Área necrosada
BINTJE A1	9,0	NKH-044 A1	6,3
BINTJE A2	9,0	NKH-097 A2	6,3
NKH-021 A1	9,0	NKH-045 A2	5,9
NKH-021 A2	9,0	NKH-056 A2	5,5
NKH-039 A2	9,0	NKS-009 A2	5,1
NKS-007 A2	9,0	NKS-009 A1	5,0
NKS-008 A2	9,0	NKH-087 A2	4,8
NKS-042 A1	9,0	NKS-007 A1	4,8
NKS-042 A2	9,0	NKH-095 A1	4,6
NKS-047 A2	9,0	NKS-106 A1	4,5
NKS-048 A1	9,0	NKH-084 A1	4,2
NKS-048 A2	9,0	NKH-054 A2	4,1
NKS-050 A1	9,0	NKH-096 A2	4,0
NKS-050 A2	9,0	NKH-097 A1	3,8
NKS-052 A1	9,0	NKH-072 A2	3,8
NKS-052 A2	9,0	NKH-054 A1	3,6
NKS-054 A1	9,0	NKH-055 A1	3,6
NKS-054 A2	9,0	NKS-056 A1	3,6
NKS-080 A1	9,0	NKH-077 A1	3,3
NKS-080 A2	9,0	NKH-055 A2	3,3
NKS-084 A1	9,0	NKH-045 A1	2,9
NKS-084 A2	9,0	NKS-014 A1	2,9
NKS-107 A2	9,0	NKH-087 A1	2,9
NKS-021 A1	9,0	NKS-014 A2	2,9
NKS-021 A2	8,9	NKH-072 A1	2,8
NKS-051 A2	8,9	NKH-059 A2	2,6
NKS-055 A2	8,9	NKH-053 A2	2,4
NKS-056 A2	8,9	NKH-056 A1	2,4
NKS-070 A2	8,9	NKH-096 A1	2,2
NKH-044 A2	8,8	NKS-099 A2	2,1
NKS-047 A1	8,8	NKH-053 A1	2,0
NKS-019 A2	8,7	NKH-059 A1	2,0
NKH-084 A2	8,6	NKH-058 A1	1,8
NKS-055 A1	8,6	NKH-058 A2	1,6
NKH-095 A2	8,3	NKS-099 A1	1,5
NKS-106 A2	8,1	NKS-097 A2	1,2
NKS-008 A1	7,9	NKS-097 A1	1,0
NKH-077 A2	7,8	NKS-098 A1	1,0
NKS-107 A1	7,7	NKS-100 A1	1,0
NKS-070 A1	7,6	NKS-098 A2	1,0
NKS-051 A1	7,0	NKS-100 A2	1,0
NKS-019 A1	6,9		
NKH-039 A1	6,8		

*LSD (0,05)= 0,772

Tabla 5.7. ANOVA para el grado de esporulación.

Fuentes de Variación	gdl	Cuadrados medios
Genotipos	41	4,85***
Aislados	1	10,50***
Genotipos x Aislados	41	0,44***
Rep.	1	0,04
Error	83	0,03
Total	167	

CV= 11,3%; *** significativo al nivel de probabilidad del 0,001

La Figura 5.5 representa el Índice de la Enfermedad (IE) para el conjunto de los genotipos evaluados.

Las especies silvestres NKS-009, NKS-014, NKS-056, NKS-097, NKS-098, NKS-099, NKS-100 y NKS-106 presentaron un IE inferior a 9, al igual que los siguientes híbridos somáticos NKH-045, NKH-053, NKH-054, NKH-055, NKH-056, NKH-058, NKH-059, NKH-072, NKH-077, NKH-084, NKH-087, NKH-095, NKH-096, NKH-097. Todos ellos se consideraron por lo tanto resistentes al patotipo ALA-001-13.

Del mismo modo las especies silvestres que presentaron un IE inferior a 9 para el patotipo CAD-001-13 fueron NKS-014, NKS-097, NKS-098, NKS-099, NKS-100, junto con los híbridos somáticos NKH-053, NKH-054, NKH-055, NKH-056, NKH-058, NKH-059, NKH-072, NKH-087 y NKH-096, reflejado en una necrosis leve del tejido y una reducida esporulación.

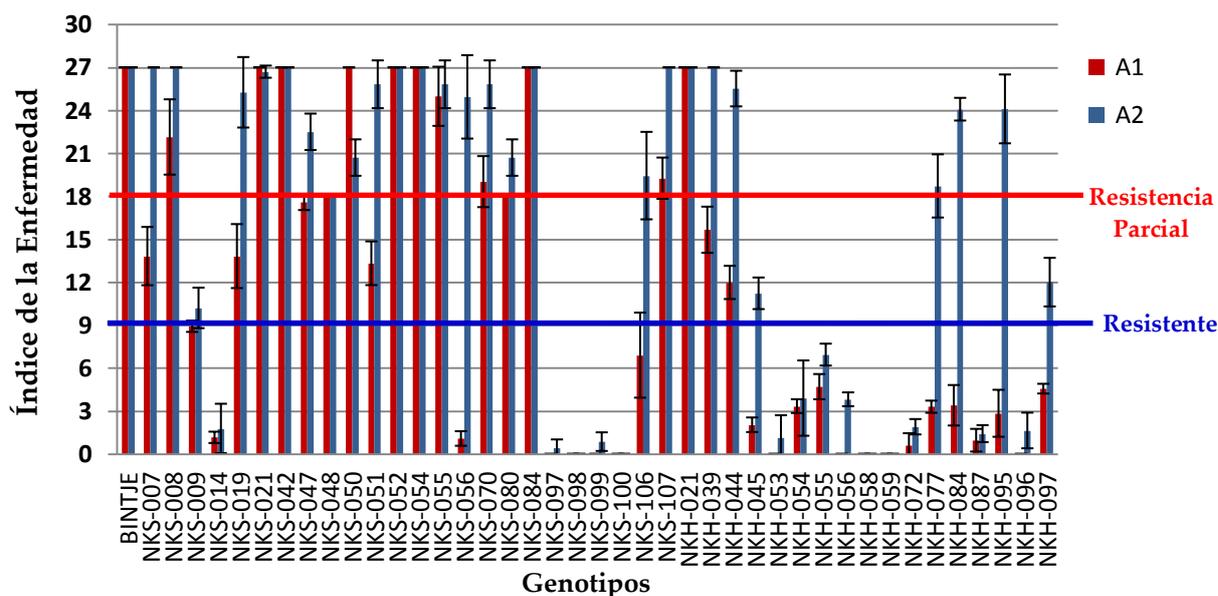


Figura 5.5. Índice de la enfermedad para las especies silvestres e híbridos somáticos evaluados.

Tabla 5.8. Medias del grado de esporulación en los genotipos evaluados

Genotipos	Grado de esporulación	Genotipos	Grado de esporulación
BINTJE A1	3,0	NKS-080 A1	2,0
BINTJE A2	3,0	NKH-097 A2	1,9
NKH-021 A1	3,0	NKH-044 A1	1,9
NKH-021 A2	3,0	NKH-045 A2	1,9
NKH-039 A2	3,0	NKS-051 A1	1,9
NKS-007 A2	3,0	NKS-009 A1	1,8
NKS-008 A2	3,0	NKS-007 A1	1,5
NKS-021 A1	3,0	NKS-106 A1	1,5
NKS-021 A2	3,0	NKH-055 A1	1,3
NKS-042 A1	3,0	NKH-097 A1	1,2
NKS-042 A2	3,0	NKH-077 A1	1,0
NKS-050 A1	3,0	NKH-054 A1	0,9
NKS-052 A1	3,0	NKH-054 A2	0,9
NKS-052 A2	3,0	NKH-084 A1	0,8
NKS-054 A1	3,0	NKH-045 A1	0,7
NKS-054 A2	3,0	NKH-056 A2	0,7
NKS-084 A1	3,0	NKH-095 A1	0,6
NKS-084 A2	3,0	NKS-014 A2	0,6
NKS-107 A2	3,0	NKH-072 A2	0,5
NKS-019 A2	2,9	NKS-014 A1	0,4
NKS-070 A2	2,9	NKH-053 A2	0,4
NKH-044 A2	2,9	NKH-096 A2	0,4
NKH-095 A2	2,9	NKS-099 A2	0,4
NKS-051 A2	2,9	NKH-087 A1	0,3
NKS-055 A1	2,9	NKH-087 A2	0,3
NKS-055 A2	2,9	NKS-056 A1	0,3
NKS-008 A1	2,8	NKS-097 A2	0,3
NKH-084 A2	2,8	NKH-072 A1	0,2
NKS-056 A2	2,8	NKH-053 A1	0,0
NKS-047 A2	2,5	NKH-056 A1	0,0
NKS-070 A1	2,5	NKH-058 A1	0,0
NKS-107 A1	2,5	NKH-058 A2	0,0
NKH-077 A2	2,4	NKH-059 A1	0,0
NKS-106 A2	2,4	NKH-059 A2	0,0
NKH-039 A1	2,3	NKH-096 A1	0,0
NKS-050 A2	2,3	NKS-097 A1	0,0
NKS-080 A2	2,3	NKS-098 A1	0,0
NKH-055 A2	2,1	NKS-098 A2	0,0
NKS-019 A1	2,0	NKS-099 A1	0,0
NKS-009 A2	2,0	NKS-100 A1	0,0
NKS-047 A1	2,0	NKS-100 A2	0,0
NKS-048 A1	2,0		
NKS-048 A2	2,0		

*LSD (0,05)=0,385

La Figura 5.6 muestra el Índice de la Enfermedad para los dos aislados, con una media para el tipo A1 de 10,97 y de 16,08 para el A2, y un LSD (0,05) de 0,386.

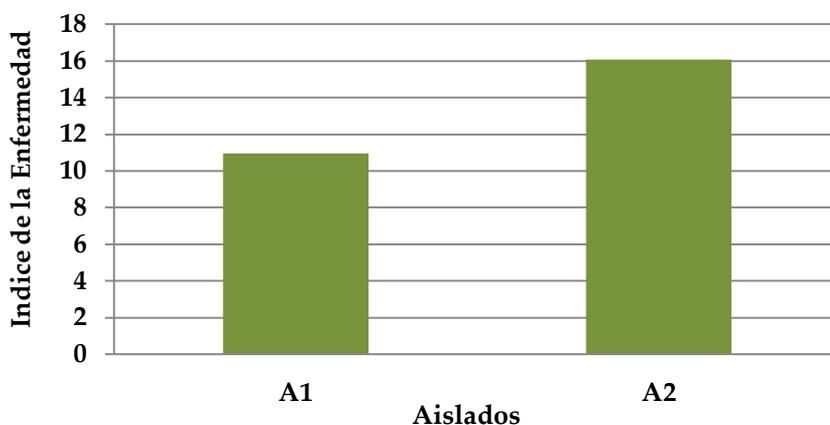


Figura 5.6. Índice de la enfermedad para ambos aislados.

5.4. DISCUSIÓN

Las especies silvestres constituyen una fuente potencial de nuevos genes de resistencia, aunque tan sólo un 10% se ha utilizado para incluirlas en el pedigrí de nuevos cultivares europeos de patata (Hawkes, 1990). De acuerdo con Ross (1986), el 50% de las variedades comerciales cultivadas en el mundo, tienen material genético de *S. demissum*.

Ruíz de Galarreta *et al.* (1998) encontraron que en torno al 70% de las especies silvestres que evaluaron, presentaban uno o más tipos de resistencia. Sin embargo, a pesar de este gran potencial, en muchos casos no ha sido posible lograr la incorporación vía sexual por cruzamientos convencionales. En este sentido el desarrollo de híbridos somáticos ha contribuido a vencer los obstáculos de incompatibilidad por diferencia en la ploidía y número de balance del endospermo (EBN) (Spooner y Hijmans, 2001).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, los genotipos NKS-014, NKS-097, NKS-098, NKS-099, NKS-100, pertenecientes a las especies *S. bulbocastanum*, *S. caripense*, *S. fraxinifolium* fueron altamente resistentes a la raza más compleja de *P. infestans*. Igualmente, los híbridos somáticos NKH-053, NKH-054, NKH-055, NKH-056, NKH-058, NKH-059, NKH-072, NKH-087 y NKH-096 de *S. circaefolium*, *S. okadae* y *S. bulbocastanum*, se mostraron igualmente resistentes, demostrando que podrían constituir una fuente potencial de genes a transferir. Estudios similares desarrollados en países como Bolivia, Colombia y Ecuador, han determinado que los materiales con mayor

resistencia provenían de híbridos somáticos con estas mismas especies (Schilde-Rentschler, 1998).

Otros estudios similares han descrito niveles altos de resistencia en *S. bulbocastanum*, *S. circaefolium*, *S. okadae* (Barquero *et al.*, 2005b), *S. caripense*, *S. andreanum*, *S. muricatum* (Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997; Ruíz de Galarreta *et al.*, 1998), *S. brachycarpum*, *S. pinnatisectum*, *S. guerreroense*, y *S. fendleri* (Douches *et al.*, 2001). También se han encontrado genotipos resistentes en *S. cardiophyllum*, *S. ehrenbergii* (Bamberg *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2004), *S. papita*, *S. trifidum*, (Darsow y Hinze, 1991), *S. polytrichon* (Podgaetskii, 1995), *S. sparsipilum* y *S. arnezii* (Colon *et al.*, 1992).

La variación encontrada entre los genotipos resistentes estaría revelando posiblemente la expresión de los tipos de resistencia más comunes como la específica o vertical y la resistencia general u horizontal. Según Forbes *et al.* (2005), la primera está asociada a genes mayores o genes *R* y la segunda a genes menores no específicos o poligénicos.

La resistencia específica se caracteriza por la reacción de hipersensibilidad (HR) en forma de necrosis que expresan las células del mesófilo en la zona de penetración del patógeno. Se manifiesta por una respuesta rápida que produce una necrosis localizada lo que restringe al patógeno al sitio de la lesión, impidiendo su expansión a otros tejidos de la planta. Esto es, debido a que el producto de un gen de resistencia dominante de la planta (*R*), interactuaría específicamente con un elicitador específico de la raza del patógeno, producto de un gen genéticamente dominante de avirulencia "*Avr*" resultante del estímulo de una reacción de hipersensibilidad (Cornelissen y Melchers, 1993).

Dicha reacción fue observada en las especies *S. fraxinifolium*, *S. caripense*, y *S. bulbocastanum*, así como en híbridos somáticos de *S. okadae*, *S. circaefolium* y *S. bulbocastanum*. Dichas reacciones hipersensibles pueden indicar la existencia de genes mayores.

Naess *et al.* (2000) confirmaron la segregación del factor de resistencia de tipo específico (*Rblc*) en el cromosoma VIII, en híbridos somáticos provenientes de *S. bulbocastanum*. Esto sugiere que el alto nivel de resistencia detectado en los genotipos que comparten herencia con esta especie y evaluados en el presente estudio, podría ser también el efecto de una resistencia gobernada por genes mayores.

En el caso de genotipos derivados de *S. okadae*, Brigneti *et al.* (2004) lograron mapear genes con un alto nivel de resistencia lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, Barquero *et al.* (2005b)

describieron en esta misma especie, un tipo de resistencia parcial no específica, llegando a pensar en la existencia tanto de genes mayores como menores. Esta teoría había sido defendida anteriormente por Rivera-Peña, (1990) quien encontró en las especies *S. demissum*, *S. verrucosum*, *S. iopetalum* y *S. brachycarpum*, un tipo de resistencia específica, además de mostrar un alto nivel de resistencia general en campo, cuyos efectos no pudieron ser discriminados.

En el caso de *S. caripense* los resultados obtenidos concuerdan con Trognitz y Trognitz, (2005), quienes defendieron la existencia de una segregación como un gen tipo *R* en esta especie. En cuanto a *S. brachycarpum*, Colque *et al.* (2011) demostraron su susceptibilidad en ensayos de tres localidades endémicas de *P. infestans* en Bolivia, lo cual no coincide con los resultados encontrados en este trabajo, al considerar parcialmente resistente para el aislado CAD-001-13 (A2). Sin embargo teniendo en cuenta los estudios de Rivera-Peña, (1990), su resistencia podría estar gobernada por ambos tipos de genes, entendiendo que el tipo vertical ha sido vencido por patotipos bolivianos, pero no por las razas españolas aquí evaluadas.

Respecto a *S. bulbocastanum*, Helgenson *et al.* (1998) sostienen que la resistencia hallada en híbridos somáticos con *S. tuberosum*, no fue debida a genes tipo *R*. En cambio, Brigneti *et al.* (2004) describen una resistencia específica en esta especie al mapear genes *R* tales como *Rpi-blb1* (Van der Vossen *et al.*, 2003), *Rpi-blb2* (Van der Vossen *et al.*, 2005) y *Rpi-blb3* (Park *et al.*, 2005) situados en diferentes cromosomas. Debido a esto se podría pensar que, al igual que *S. brachycarpum* y *S. okadae*, la resistencia adquirida por genotipos derivados de esta especie, sería como consecuencia de la expresión de una resistencia combinada.

Coca *et al.* (2007) encuentran en las poblaciones de *S. circaeifolium* (*crc-LA*, *crc-LB* y *crc-CO*) resistencias a *P. infestans*, pero con diferencias entre sí, pese a que provienen de la misma localidad. Estos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo que confirman la resistencia descrita en *S. circaeifolium* (Hawkes y Hjerting, 1989; Ruíz de Galarreta *et al.*, 1998).

Capítulo 6

**Mejora genética para la
resistencia a *P. infestans***

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA

La patata, es una especie muy vulnerable a un gran número de plagas y enfermedades. Hooker (1980) encontró un total de 25 virus, 38 hongos, 6 bacterias, 2 micoplasmas y un viroide, además de 68 especies de nematodos y 128 insectos-plaga, totalizando un total de 266 patógenos. Dentro de ellos uno de las más importantes es el oomiceto *P. infestans* (Erwi y Ribeiro, 1996). Actualmente la mayor parte de las variedades de patata poseen una estrecha base genética, con un 80% de los genes procedentes de las primeras introducciones en Europa. Sin embargo, debido a la gran epidemia de *P. infestans*, ocurrida entre 1846–1850, diversos investigadores buscaron el centro de origen de esta especie para intentar incorporar nuevo material genético al entorno genético de *S. tuberosum* (Contreras, 2008).

Los recursos genéticos afines a la patata tienen un valor probado en los programas de mejora para resistencia a enfermedades, estreses ambientales y otros caracteres agronómicos de interés (Ross 1986, Ruíz de Galarreta *et al.*, 1998; Spooner *et al.*, 2004). La distribución mundial de este germoplasma y el amplio rango de adaptación ecológica que presentan, implica que existan genotipos que hayan superado distintas limitaciones ambientales y desarrollado fuertes resistencias a todo un abanico de enfermedades y plagas, en contraste con las limitaciones de las especies cultivadas (Hawkes, 1994). Así, los bancos de germoplasma formados por especies afines a la patata, constituyen una importante reserva de genes para los objetivos de la mejora genética de esta especie (Hanneman y Bamberg, 1986).

Sobre la base de esta identificación, los mejoradores iniciaron la introgresión de genes mediante cruzamientos. A pesar de la gran diversidad genética disponible sólo un pequeño número de especies han sido utilizadas para la incorporación de resistencias, estimando que apenas un 5% han sido empleadas en programas de mejora (Coca y Montealegre, 2006; García *et al.*, 2007). Desde principios del siglo XX se han buscado fuentes de resistencia en el género *Solanum*, tal y como se ha descrito en el Capítulo 5, mediante numerosas expediciones a Méjico, América Central y Sudamérica, permitiendo identificar taxonómicamente unas 200 especies silvestres (Hawkes, 1990). Por la poca diversidad existente de la patata cultivada (Glendinning, 1983), se ha calculado que los coeficientes de parentesco entre variedades norteamericanas son iguales o superan, en muchos casos, a los calculados entre parentales y descendencia, o entre medios hermanos (Mendoza y Haynes, 1974). Por ello una de las vías para ampliar esta base es mediante incorporación de nuevo germoplasma.

En un principio los programas de mejora estuvieron orientados hacia la introgresión de genes de resistencia vertical. No obstante, ésta es monogénica y de corta duración debido a la capacidad del patógeno para generar nuevas razas. La resistencia vertical a *P. infestans* está gobernada por genes mayores *R*, descritos en *S. demissum* con reacción de hipersensibilidad (Black *et al.*, 1953; Malcolmson y Black, 1966) cuya introducción no han dotado a los cultivares de una resistencia duradera, apareciendo con el tiempo nuevas razas lo que condujo a la búsqueda de nuevas fuentes (Stewart *et al.*, 2003, Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2009).

Por otra parte se describió una resistencia parcial de campo o resistencia no específica de carácter cuantitativo, producto de la suma de efectos pequeños los cuales estén, probablemente, bajo control poligénico (Jaramillo, 2003). Se han realizado estudios de aptitud combinatoria general, confirmando la existencia de dichos efectos (Malcolmson y Killick, 1980). Colon y Budding (1990) mediante observaciones en campo de este tipo de resistencia, analizaron los componentes de la resistencia en seis clones derivados de cruzamientos con especies silvestres frente a la variedad cultivada Pimpernel. Los autores encontraron una gran variación en el grado de la misma, detectando cierto grado de independencia entre los componentes de la resistencia general, los cuales podrían utilizarse en la mejora.

6.1.2. MÉTODOS DE MEJORA Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

El método clásico de mejora genética en patata se basa en la creación de variabilidad mediante cruzamientos dirigidos y una posterior selección de los genotipos deseados en la F1 y generaciones clonales sucesivas (Ruíz de Galarreta *et al.*, 2000b). El éxito de la mejora depende básicamente de escoger los parentales adecuados, de manera que el cruzamiento origine individuos con características valiosas que se combinen o se complementen. Se persigue cruzar genotipos que originen una progenie vigorosa y con alto grado de heterosis. Cuanto menos relacionados genéticamente estén los progenitores, las probabilidades de un elevado vigor serán mayores según a los criterios de selección acordes con el objetivo planteado. Tradicionalmente, los programas de mejora en patata han cruzado genotipos con características complementarias y actualmente sigue siendo la metodología utilizada. Las primeras fases son la elección de los genitores, los cruzamientos y la selección de plántulas en la primera generación (Ruíz de Galarreta *et al.*, 2000b). Las semillas obtenidas se siembran por separado, eliminándose en primera instancia las plántulas con síntomas de virosis. El resto se trasplanta a macetas y cuando terminan el ciclo se vuelve a realizar una selección basada principalmente en criterios

morfológicos. Los genotipos seleccionados constituyen los clones de 1º año (Rousselle *et al.*, 1999). (Figura 6.1).

En las campañas sucesivas se realizan ensayos en los que se estiman las características presentes en los clones, seleccionando los más favorables y enviándolos finalmente al Registro de Variedades Comerciales. Cuando una característica deseable se debe a factores mendelianos simples, se pueden obtener progenies con los caracteres deseados, permitiendo una selección temprana a nivel de plántula (Ross, 1986). Un método complementario al anterior son los programas de selección recurrente, en los que se persigue transferir un determinado carácter de un donante a un genotipo receptor superior. En este caso se cruzan el recurrente y el donante, seleccionando en la F1 los descendientes similares al primero, con el carácter de interés del parental donante. Este proceso se repite el número de generaciones necesarias para obtener finalmente una variedad casi isogénica del genitor recurrente, pero con el carácter deseado.

Estrada (1978) utilizó esta técnica para introducir genes de resistencia a heladas en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y Gálvez y Brown (1980), para transferir genes de resistencia a virus. Sin embargo, cuando la característica deseada está controlada por varios genes, la utilización de los retrocruzamientos se hace difícil, debido a la baja heredabilidad de los caracteres. En consecuencia, hay que obtener grandes cantidades de semillas para conseguir seleccionar una variedad mejorada (Rousselle *et al.*, 1999).

En la obtención de una nueva variedad de patata se persiguen los siguientes objetivos (Ruíz de Galarreta *et al.*, 2000a):

- Características morfológicas, fisiológicas y agronómicas favorables como buen aspecto de planta, tubérculos homogéneos, piel fina, ojos superficiales, elevado rendimiento, estabilidad en la producción, ciclo corto y buena conservación.
- Resistencia a factores abióticos: heladas, sequía y suelos salinos.
- Resistencia a factores bióticos relacionados con plagas y enfermedades.
- Calidad en función del destino del producto, como concentración de sólidos totales, contenido en azúcares reductores, aptitud a la cocción, buena fritura, propiedades organolépticas, lavado, verdeamiento y bajo contenido en glicoalcaloides.

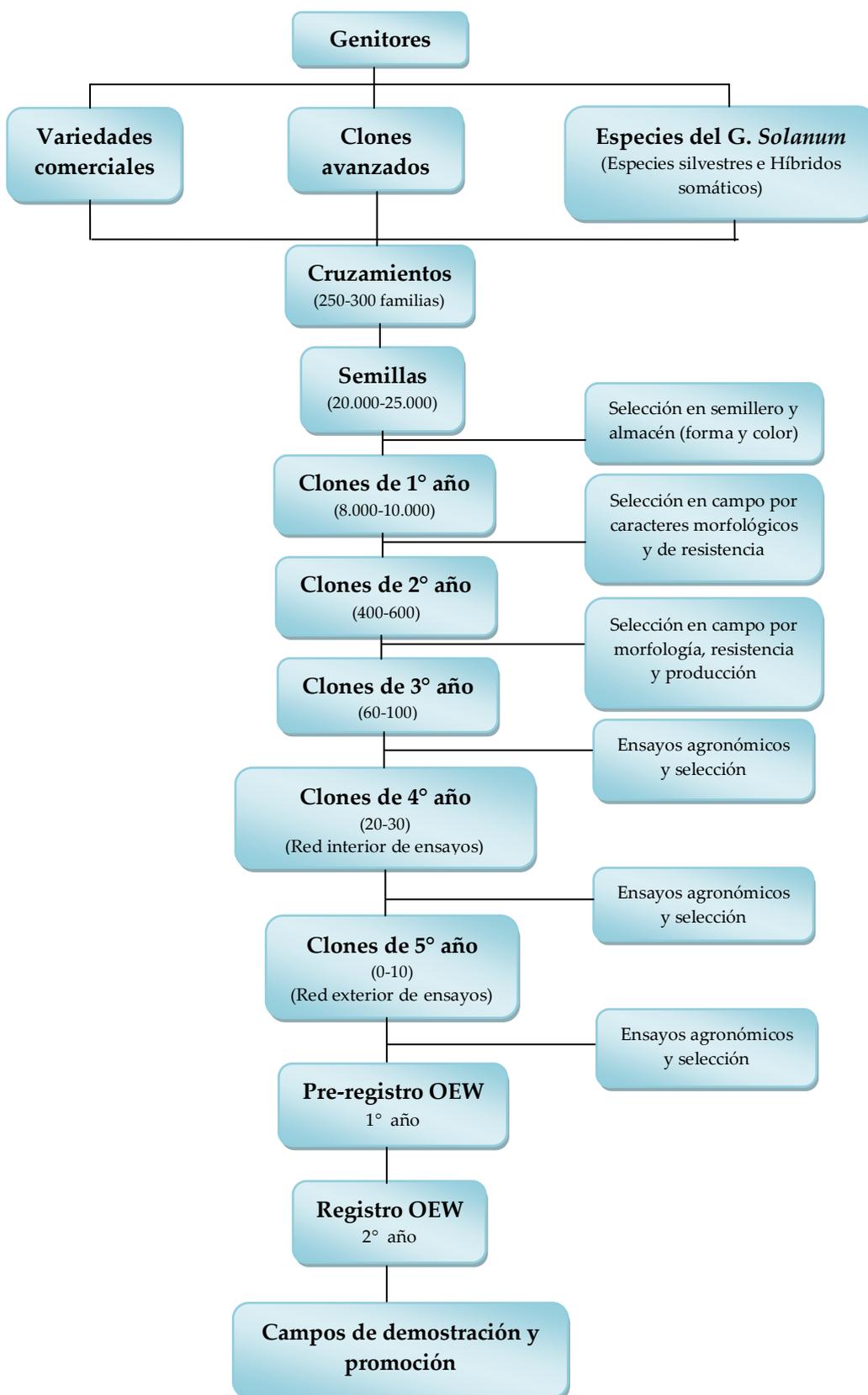


Figura 6.1. Esquema de mejora genética de patata realizada en Neiker-Tecnalia.

En muchos casos se procede a la estructuración de subprogramas dentro del programa general de mejora, para luego finalmente proceder a la combinación de los genotipos resultantes de cada uno de ellos.

6.1.3. INCORPORACIÓN DE LA RESISTENCIA A *P. infestans*

En 1909 Salaman identificó resistencia al mildiu en la que denominó *S. edinense* y que posteriormente fue *S. demissum* y lo retrocruzó con el Grupo *Tuberosum* (Muller y Black, 1951). Posteriormente en 1963, se inició un programa de mejora en New York mediante cruzamientos con esta especie y posterior selección por inoculación artificial en folíolos y tubérculos (Plaisted, 1987). La identificación de los 11 genes mayores (R_1 a R_{11}) de resistencia específica en *S. demissum*, propició el inicio de su incorporación en nuevos cultivares, siendo el primer paso para la obtención de variedades con cierta resistencia en campo a este patógeno (Gebhardt y Valkonen, 2001).

A pesar de la aparente accesibilidad a este inmenso acervo genético, es importante resaltar que pocas especies, tanto silvestres como nativas cultivadas, han sido utilizadas en mejora (Hawkes, 1994). En la práctica, la introgresión de germoplasma silvestre está centrada en unas pocas entradas, aunque hay muchas más disponibles. Se ha estimado que el 80% de las variedades europeas y norteamericanas llevan genes de sólo 7 especies silvestres relacionadas (Hermsen, 1980).

Una de las principales barreras es la diferencia en el nivel de ploidía y/o en el número de balance del endospermo (EBN), por lo que muchas de estas especies no pueden ser utilizadas como donantes de genes de resistencia en cruzamientos con *S. tuberosum* (Tiwari *et al.*, 2010).

Por tal razón la hibridación somática ha sido empleada para evitar la incompatibilidad entre especies y favorecer la transferencia de genes de interés. Además constituye una herramienta para la modificación y la mejora de caracteres poligénicos, posibilitando la modificación del material genético extranuclear, al obtenerse una célula híbrida con una mezcla de citoplasmas de dos parentales (Roest y Gilissen, 1993).

Se han obtenido híbridos somáticos de *S. tuberosum* con especies como *S. circaefolium* (Louwes *et al.*, 1992) y *S. bulbocastanum* (Hegelson *et al.*, 1998, Naess *et al.*, 2000) mostrando buenos niveles de resistencia en campo. No obstante existen inconvenientes con este método, al requerir tiempo para eliminar los caracteres indeseables provenientes del donante silvestre y tener que realizar

varias generaciones de retrocruzamientos con la especie cultivada (Oberwalder *et al.*, 2000).

En cuanto a la mejora tradicional Haynes *et al.* (2014) evaluaron la resistencia al mildiu procedente de un programa de selección recurrente de medios hermanos en la población *S. phureja* x *S. stenotomum*, observando una mejora de los niveles de resistencia sin efecto adverso en la varianza genética aditiva. De esta forma sugieren que la resistencia se debe a genes menores en lugar de los genes dominantes *R*.

Orellana (2001), indica que la herencia de la resistencia al mildiu es compleja y en varios de los casos epistática, donde existe interacción de genes de dominancia debido a la presencia de genes mayores y poligenes.

En el programa de mejora genética del INTA en Balcarce (Argentina) se viene trabajando con especies silvestres que confieren un amplio espectro de resistencia al mildiu, se ha evaluado especies como *S. chacoense*, *S. commersoni*, *S. gourlayi*, *S. microdontum*, *S. maglia*, y *S. tarijense* (Capezio, 2002; Mroginski *et al.*, 2007) encontrando algunas de ellas prometedoras en los programas de mejora genética de patata.

La mejora genética de la patata estuvo basada en métodos convencionales, pero actualmente se está apoyando en las técnicas moleculares, es por esa razón que el empleo de la selección asistida por marcadores es de mucha utilidad puesto que estos marcadores están estrechamente ligados a genes de resistencia pueden ser fácil de aplicar en los genotipos ampliamente relacionados. La mayoría de los marcadores usados eran RFLP, AFLP, que se encuentra exclusivamente utilizando en poblaciones segregantes diploides. Pero actualmente los marcadores del tipo SCAR y CPS están siendo utilizados por su facilidad. (Tiwari *et al.*, 2013c).

Sokolova *et al.* (2011) desarrollaron tres marcadores SCAR: R1-1205, R3-1380 y SDM-523 que reconocen la raza específica de los genes *R₁* y *R₃*. Estos marcadores fueron validados en el cribado de 209 accesiones de 21 especies silvestres de *Solanum*. Sedlák *et al.* (2005) validaron el gen *R₁* en los recursos genéticos de patata en la República Checa empleando marcadores desarrollados previamente por la selección asistida SPUD237 y GP21 (De Jong *et al.*, 1997), y R1F / R (76-2sf2 / 76-2SR) (Ballvora *et al.*, 2002).

En la actualidad, los genes *Rpi-blb* (*Rpi-blb1*/RB, *Rpi-blb2* y *Rpi-blb3*) son los genes *R* más importantes de la patata que se desarrollaron a partir de *S. bulbocastanum* para el reconocimiento de un amplio espectro de resistencia al tizón tardío. La Selección Asistida por Marcadores (SAM) se ha aplicado con

éxito en el gen RB en el mejoramiento de la patata. Los marcadores SCAR RB-629/638, Sblb-509 (Sokolova *et al.*, 2011), RB-1223 y RB-629 (Pankin *et al.*, 2011) unido al gen RB (*Rpi-blb1*) de *S. bulbocastanum* fueron validados por la selección asistida por marcadores.

También se está utilizando en la mejora molecular los QTL (*Quantitative Trait Locus*), el cual se está utilizando el mapeo con en especies silvestres como *Solanum berthaultii* (Ewing *et al.*, 2000), *S. phureja* (Ghislain *et al.*, 2001), y *S. paucissectum* (Villamón *et al.*, 2005). Los factores que controlan este tipo de resistencia se han localizado en casi todos los cromosomas, reflejando una verdadera naturaleza poligénica (Tiwari *et al.*, 2013c).

Se han descrito QTLs que confieren resistencia de campo incluyendo cruzamientos intraespecíficos entre *S. tuberosum* (Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999). También interespecíficos con *S. phureja* (Ghislain *et al.*, 2001), *S. berthaultii* (Ewing *et al.*, 2000), *S. microdontum* (Bisognin *et al.*, 2005), *S. paucissectum* (Villamon *et al.*, 2005) y *S. vernei* (Sorensen *et al.*, 2006), así como híbridos entre *S. phureja* y *S. stenotomum* (Costanzo *et al.*, 2005).

Chakrabarti *et al.* (2014) identificaron varios QTLs en *S. chacoense*, la cual cruzaron con *S. spegazzinii*, obteniendo en la progenie diploide, la presencia de posibles loci de resistencia cuantitativa contra el mildiu. Otros autores como Li *et al.* (2012) identificaron dos QTLs en los cromosomas II, VII y XII y tres en el cromosoma IX. Danan *et al.* (2009, 2011) describe que el mayor efecto de estos QTLs se encuentran en *S. sparsipilum* y *S. spegazzinii* y están mapeados en el cromosoma X. Wickramasinghe *et al.* (2009) mapearon igualmente, QTLs de *S. phureja* x *S. stenotomum*.

No obstante se han probado la existencia de asociaciones de estos QTLs con caracteres no deseables como maduración tardía, lo cual reduce su utilidad potencial. Estos posibles loci de resistencia contra el mildiu en muchos casos no son consistentes y pueden variar dependiendo del aislado, método de evaluación, análisis de mapeo y de las condiciones ambientales de los experimentos (Nowicki *et al.*, 2012).

Por otro lado tenemos las discordancias sexuales que pueden ser evitadas a través de la clonación y transferencia de genes *R* por cisgénesis o transgénesis con la modificación genética (GM), mediante fusión de protoplastos o duplicando el número de cromosomas (Park *et al.*, 2009). Cerca de 20 genes *Rpi* han sido clonados (Sliwka y Zimnoch-Guzowska, 2012) y algunos transferidos a cultivares por estas vías, incluyendo *RB/Rpi-blb1* (Song *et al.*, 2003), *Rpi-vnt1.1* (Foster *et al.*, 2009), *Rpi-mcq1* y *Rpi-Phy1* (Sliwka *et al.*, 2006).

Actualmente y debido a la aparición de nuevas razas de *P. infestans* mucho más adaptadas y más virulentas, están siendo capaces de vencer la resistencia vertical, la mejora genética está siendo orientada en la búsqueda de una resistencia horizontal o cuantitativa. Como ejemplo de las nuevas razas agresivas tenemos el aislado CAD-001-13 presentando 11 factores de virulencia, caracterizado en el apartado 4.3.1 del Capítulo 4 y genotipado con marcadores SSR identificándolo como el genotipo 13_A2_65, una variante de Blue 13 descrito en el capítulo 3.

La situación actual exige un conocimiento exhaustivo de las poblaciones presentes en cada área de cultivo para optimizar los métodos de control de la enfermedad. Es por ellos que se hace indispensable la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia en especies silvestres e híbridos somáticos con técnicas moleculares como la selección asistida por marcadores (SAM) y QTLs.

Por todo lo expuesto anteriormente el presente capítulo tiene por objetivo la incorporación de resistencia a *P. infestans* mediante cruzamientos dirigidos para la obtención de los primeros clones avanzados.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal estuvo constituido por 7 especies silvestres, 8 híbridos somáticos, 2 variedades comerciales Nagore y Zorba (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) y 2 clones avanzados diploides de *S. tuberosum* provenientes del programa general de mejora. Tanto las especies silvestres como los híbridos somáticos fueron evaluados previamente con el aislado CAD-001-13, con tipo de apareamiento A2 y con 11 factores de virulencia, siendo una variante de Blue 13 (13_A2_68). (Ver Tabla 4.5 del Capítulo 4 y Tabla 3.20 del Capítulo 3).

6.2.1. CRUZAMIENTOS Y PLÁNTULAS

Durante los meses de Enero-Febrero de 2013 se realizaron cruzamientos dirigidos entre los materiales seleccionados como parentales, utilizando las especies silvestres e híbridos somáticos como genitores masculinos. Dichos genotipos fueron seleccionados tras la evaluación e identificación de la resistencia a *P. infestans* tal y como se ha descrito en el apartado 5.3.1.2 (Capítulo 5). Los genitores fueron sembrados en invernadero en condiciones de 16 h de fotoperíodo y con oscilación térmica entre 12 y 20 °C.

Para estimular la floración, los tubérculos de las especies tuberíferas, se dispusieron sobre ladrillos, cubiertos con turba, eliminando los estolones a

medida que fueron apareciendo. Posteriormente, se cortaron tallos de unos 30 cm con inflorescencias, procediendo a la castración de los botones florales e introduciéndolos en tarros de cristal con solución nutritiva de macro y micronutriente. Estos se dispusieron en invernadero en condiciones controladas de luz y temperatura y tras dos días de la emasculación se procedió a la polinización. Se determinó la viabilidad del polen mediante tinción con carmín acético al 1% (p/v) (Trognitz, 1991), tomando tres muestras por variedad.

Tabla 6.1. Especies silvestres seleccionados resistentes a mildiu.

Código Neiker	Especie	Código original	Ploidía	Test <i>P. infestans</i>
NKS-009	<i>S. brachycarpum</i>	bcp-8100	72	PR
NKS-014	<i>S. bulbocastanum</i>	blb-8008	24	R
NKS-048	<i>S. pinnatisectum</i>	pnt-8175	24	PR
NKS-097	<i>S. caripense</i>	303143	24	R
NKS-098	<i>S. caripense</i>	303153	24	R
NKS-099	<i>S. caripense</i>	303159	24	R
NKS-100	<i>S. fraxinifolium</i>	303129	24	R

R: Resistente; PR: Parcialmente resistente

Tabla 6.2. Híbridos somáticos seleccionados resistentes a mildiu.

Código Neiker	Pedigree	Test <i>P. infestans</i>
NKH-045	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>	PR
NKH-053	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-054	<i>S. circaefolium</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-056	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-058	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-059	<i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-072	<i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-087	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-096	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>	R
NKH-097	<i>S. okadae</i> + <i>S. tuberosum</i>	PR

R: Resistente; PR: Parcialmente resistente

Tabla 6.3. Clones (2x) de *S. tuberosum* utilizados como genitores.

Especie	Entrada	Ploidía
<i>S. tuberosum</i>	SR 260	24
<i>S. tuberosum</i>	H 88 31/34	24

Tabla 6.4. Variedades de *S. tuberosum* (4x) empleadas como genitores.

Especie	Variedad	Ploidía
<i>S. tuberosum</i>	Zorba	48
<i>S. tuberosum</i>	Nagore	48

Los genotipos con más del 50% del polen teñido se consideraron fértiles por lo que se conservó en placas Petri a una temperatura de 4 °C. Tras 8-10 días de la polinización, si el cruzamiento resultó viable, se formaron frutos o bayas, las cuales se cubrieron con mallas y se dejaron madurar en torno a las 4 semanas. Transcurrido este período se extrajeron las semillas, que se conservaron una vez secas a 4 °C en tarros de cristal con gel de sílice para preservarse de la humedad hasta su utilización.



Figura 6.2. A: Genitores en invernadero. B: Flor emasculada. C: Polinización

En Junio de 2013 las semillas se sembraron por familias de cruzamientos en bandejas con turba, rompiendo la dormancia mediante inmersión en ácido giberélico (1500 ppm) durante 24 h. Las plántulas obtenidas se trasplantaron a macetas para la obtención de tubérculos. Se realizó una inoculación en hoja desprendida a mildiu, utilizando la raza anteriormente descrita y el método de

inoculación siguiendo el protocolo propuesto por Barquero *et al.*, (2005) tal como está descrito en el apartado 4.2.4.1 del Capítulo 4.

Durante la recolección se realizó una primera selección en cuanto a forma, homogeneidad, profundidad de ojos, color de piel y color de la carne del tubérculo, obteniendo la primera generación clonal (CL1).

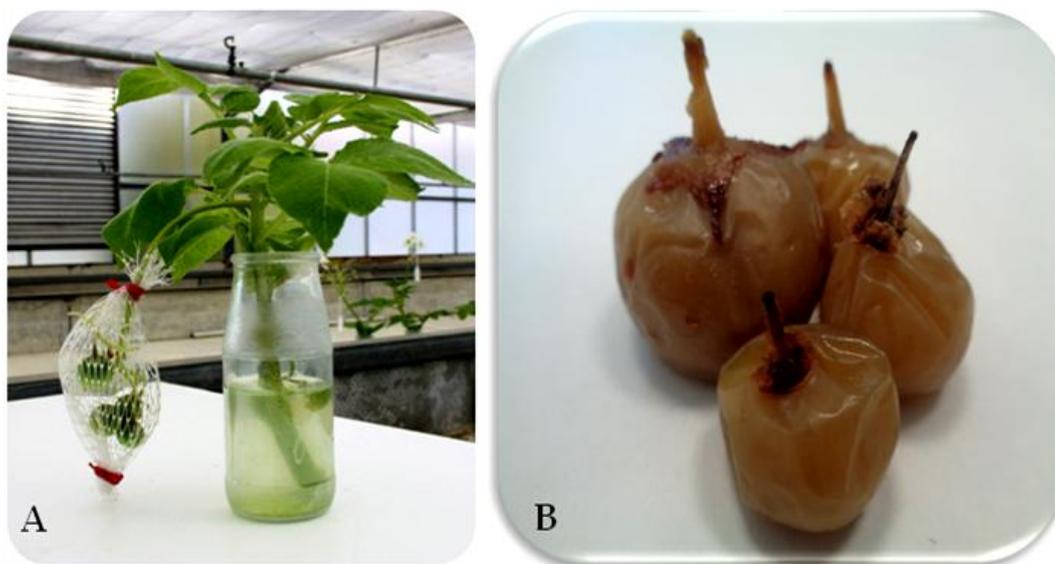


Figura 6.3. A: Enmallado de las bayas. B: Maduración de las bayas.

6.2.2. CLONES DE PRIMER AÑO

Los clones de primer año seleccionados (CL1) por resistencia a mildiu y aspecto morfológico se sembraron en campo en Mayo del 2014 en la Finca de Iturrieta (Álava), situada a 990 m de altitud. La situación estratégica de este campo reúne las condiciones climatológicas y sanitarias adecuadas para un programa de selección con baja presión infectiva de áfidos, causantes de transmisión de enfermedades producidas por virus. Se sembró un tubérculo por clon, incluyendo como testigos de ciclo las variedades Jaerla (temprana), Kennebec (semitemprana), Desiree (semitemprana) y Agria (tardía).

Durante el cultivo se procedió a la selección de '*visu*' por aspecto de planta, y también aquellas plantas que mostraban resistencia a *P. infestans* en campo. Se eliminaron aquellas con síntomas de virosis o enfermedades fúngicas como *Alternaria solani*. Tras la cosecha, se realizó una selección basada en formas y aspectos comerciales de los tubérculos. Los clones seleccionados constituyeron la segunda generación clonal o clones de 2º año (CL2).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. CRUZAMIENTOS Y OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS

De los cruzamientos realizados con las especies silvestres e híbridos somáticos se obtuvieron los siguientes resultados que se detallan en las Tabla 6.5.

En el año 2013, se obtuvieron 4 familias de los cruzamientos realizados entre las variedades comerciales de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (Nagore y Zorba) con los híbridos somáticos seleccionados.

Tabla 6.5. Cruzamientos, bayas y semillas obtenidas

Familia	Genitor femenino	Genitor masculino	Cruzamientos	Bayas	Semillas
13/50	ZORBA	NKH-045	30	3	-
13/54	NAGORE	NKH-053	58	40	1150
13/58	ZORBA	NKH-054	25	10	343
13/63	NAGORE	NKH-056	10	2	-
13/78	ZORBA	NKH-058	20	-	-
13/79	NAGORE	NKH-059	50	31	928
13/82	ZORBA	NKH-072	19	-	-
13/101	NAGORE	NKH-087	77	31	1407
13/103	ZORBA	NKH-096	11	-	-
13/104	NAGORE	NKH-097	17	4	-
13/105	H 88 31/34	NKS-009	25	6	-
13/106	SR 260	NKS-014	40	5	-
13/109	SR 260	NKS-048	38	3	-
13/110	H 88 31/34	NKS-097	25	-	-
13/112	SR 260	NKS-098	30	-	-
13/116	SR 260	NKS-099	35	-	-
13/120	H 88 31/34	NKS-100	30	2	-
TOTAL			540	137	3828

Con las especies silvestres y clones diploides se obtuvieron 16 bayas de cuatro familias, pero ninguna de ellas con semillas. De otras tres familias no se obtuvo ningún cruzamiento viable. Tras la maduración de las 137 bayas se extrajeron un total de 3828 semillas que se almacenaron en condiciones controladas de humedad, luz y temperatura.

Del total de semillas se sembraron un total de 1000 semillas representativas de todas las familias obtenidas (Figura 6.4-A). Con un porcentaje de germinación del 70%, se trasplantaron un total de 741 plántulas

morfológicamente viables (Figura 6.4-B). En este estadio se realizó la evaluación a *P. infestans* utilizando el aislado CAD-001-13. Se obtuvieron un total de 209 genotipos con resistencia, eliminando el resto de individuos.

Tras la cosecha, se seleccionaron un total de 115 clones de primer año o CL1 por aspecto de tubérculo y formas comerciales. La Tabla 6.6 muestra el número de semillas por familia, plántulas obtenidas y clones de primer año seleccionados.

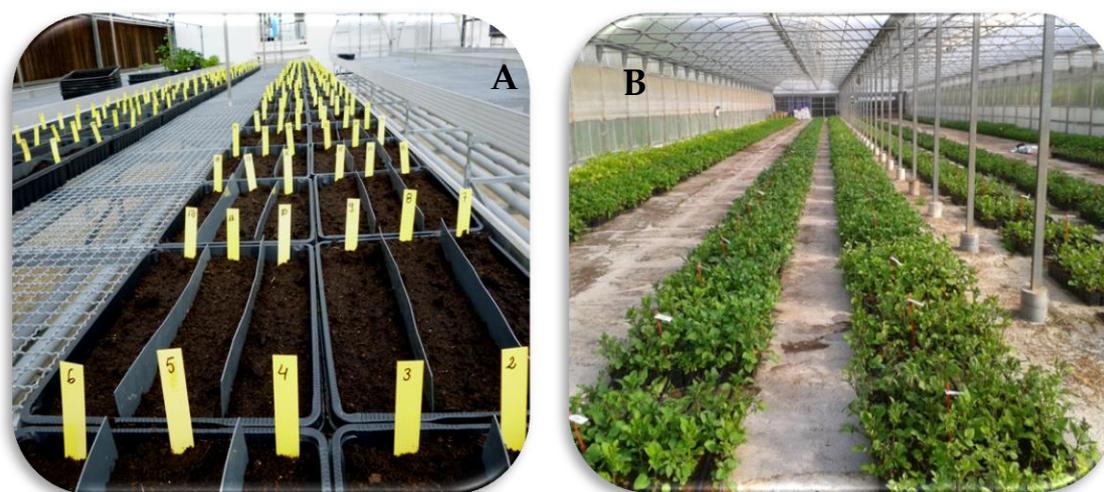


Figura 6.4. A: Semilleros. B: Plántulas trasplantadas a macetas.

Tabla 6.6. Clones de primer año (CL1) seleccionado.

Familia	Genitor femenino	Genitor masculino	Semillas	Plantas	CL1 resistentes ¹	CL1 seleccionados
13/54	NAGORE	NKH-053	250	179	49	27
13/58	ZORBA	NKH-054	250	181	51	29
13/79	NAGORE	NKH-059	250	186	55	31
13/103	NAGORE	NKH-087	250	195	54	28
TOTAL			1000	741	209	115

¹ Escala del AUDPCrel, resistentes con valores inferiores a 0,21 (Gabriel et al., 2007)

6.3.2. CLONES DE PRIMER AÑO

En el año 2014 se evaluaron un total de 115 CL1, sembrando un tubérculo por clon, incluyendo variedades como testigos de ciclo Jaerla (temprana), Kennebec (semitemprana), Desiree (semitardía) y Agria (tardía). Se realizó una selección en campo por aspecto de planta y ciclo y en recolección por forma y aspecto de tubérculo. Asimismo, se eliminó en campo cualquier planta con síntomas claros de virosis o enfermedades fúngicas.

Se evaluó la resistencia a mildiu en hoja desprendida, se seleccionaron un total de 107 clones. Tras la cosecha, se realizó una selección basada en formas y aspectos comerciales de los tubérculos, que junto con la selección en campo se eligieron un total de 33 clones de buenas características (Tabla 6.7). Las Figuras 6.5 y 6.6 muestran el aspecto de la evaluación en campo de los clones de 1° y 2° año seleccionados, respectivamente.



Figura 6.5. Evaluación en campo de los clones de 1° año.



Figura 6.6. A y B: Clones de 2 ° año seleccionado.

Tabla 6.7. Clones de segundo año (CL2) seleccionado

Familia	Genitor femenino	Genitor masculino	CL1 seleccionados	CL2 resistentes ¹	CL2 seleccionados
13/54	NAGORE	NKH-053	27	24	6
13/58	ZORBA	NKH-054	29	26	8
13/79	NAGORE	NKH-059	31	29	10
13/103	NAGORE	NKH-087	28	28	9
TOTAL			115	107	33

¹Escala del AUDPCrel, resistentes con valores inferiores a 0,21. (Gabriel et al., 2007)

6.4. DISCUSION

Tras la epidemia causada por el oomiceto *P. infestans*, investigadores europeos recurrieron al centro de origen del cultivo para incorporar nuevo germoplasma. Las variedades nativas, aunque han mostrado gran variabilidad y adaptación y son materiales potencialmente utilizables como genitores en programas de mejora (Bamberg y del Rio, 2011), han sido infrautilizadas (Contreras, 2008).

La patata común, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* es un tetraploide con especies emparentadas de diferentes ploidías (Hawkes, 1994). Gran parte de

este material no puede utilizarse directamente en cruzamientos debido a problemas de hibridación interespecífica (Camadro *et al.*, 2004). En su mayoría, las especies diploides son autoincompatibles y alógamas obligadas, a diferencia de las de superior ploidía. Estas últimas se comportan como autógamias, debido al fenómeno de interacción competitiva (Frankel y Galun, 1977) que disminuye o anula la autoincompatibilidad. Jonhston *et al.* (1980) propusieron un modelo para explicar fallos en cruzamientos debidos al desarrollo anormal embrionario, que depende de la ploidía efectiva o Número de Balance del Endospermo (EBN). El cociente en el endospermo tiene que estar en proporción 2:1 para un correcto desarrollo, aportados por los progenitores femenino y masculino, respectivamente.

Además de lo expuesto anteriormente, existen otras barreras pre-cigóticas que pueden impedir el éxito de los cruzamientos. Una de las principales es la androesterilidad, con diversas formas como indehiscencia de anteras, fusiones antera-pistilo, flores deformadas o polen contraído (Larrosa *et al.*, 2005; Marfil *et al.*, 2009). Este tipo de causas pueden justificar la ausencia de bayas y, en su caso semillas, en los cruzamientos realizados con las especies silvestres en el presente trabajo. Estos inconvenientes ya han sido citados por varios autores que han empleado dichas especies en programas de mejora genética de patata (Serraf *et al.*, 1994).

Castillo *et al.* (2007), obtuvo el Clon 380389, que proviene del cruzamiento de (BL-1)2 como progenitor femenino, cuya resistencia deriva de Black (*Solanum tuberosum* × *Solanum demissum*), que aporta tolerancia a heladas y resistencia de campo al tizón tardío.

Por otro lado Swiezinsky *et al.* (1991) encontraron diferentes niveles de resistencia en progenies derivadas de cruzamientos con parentales portadores de genes *R* de *S. demissum* y variedades comerciales de *S. tuberosum*. Gabriel *et al.* (2011) estimó la aptitud combinatoria mediante cruzamientos con 10 variedades nativas resistentes, encontrando un 67% susceptibles frente al 33% de las progenies con resistencia.

Espejo *et al.* (2009), mencionan que la incorporación de estos genes permitiría ampliar la base genética de la patata cultivada. Aunque las barreras de incompatibilidad sexual pueden interferir para incorporar caracteres deseables en los cultivares de patata, la fusión de protoplastos puede ser una alternativa para la utilización de este germoplasma aunque aún permanecen algunos problemas, especialmente relacionados con la regeneración de plantas, no cabe duda que existe un potencial para ser utilizado en la mejora con especies incompatibles.

Las técnicas de cultivo *in vitro* de células y tejidos ofrecen herramientas que pueden ayudar, asimismo, a la mejora convencional para superar estas las barreras de cruzamientos existentes.

Utilizando esta metodología, se han transferido importantes caracteres de las especies silvestres tales como *S. berthaultii* (Serraf *et al.*, 1991), *S. brevidens* (Barsby *et al.*, 1984; Rokka *et al.*, 1994), *S. bulbocastanum* (Austin *et al.*, 1993), *S. circaeifolium* (Mattheij *et al.*, 1992), *S. commersonii* (Nyman y Waara, 1997) y *S. pinnatisectum* (Ward *et al.*, 1994).

También se ha obtenido cierto grado de resistencia a *P. infestans* en híbridos somáticos entre *S. tuberosum* y *S. circaeifolium* (Mattheij *et al.*, 1992), *S. pinnatisectum* (Polzerova *et al.*, 2011), *S. bulbocastanum* (Helgeson *et al.*, 1998), *S. nigrum* (Horsman *et al.*, 2001), *S. berthaultii* (Bidani *et al.*, 2007), *S. tarnii* (Thieme *et al.*, 2008) y *S. cardiophyllum* (Thieme *et al.*, 2010).

Por todo lo expuesto anteriormente, para superar estos inconvenientes, en los programas de mejora genética, se aplican rutinariamente métodos que intentan aprovechar al máximo las posibilidades que brinda la patata cultivada. Tales métodos utilizan la reproducción sexual para obtener nuevas combinaciones genéticas y la asexual para multiplicar las mejores de ellas; también se reducen de cuatro a dos el número de juegos de cromosomas de las especies tetraploides, con el fin de obtener descendencia mediante su cruce con diploides e incorporar genes de resistencia y características agronómicas deseables que servirán para introducir en el programa de mejora genética.

Capítulo 7

Conclusiones

1. Se han identificado por primera vez en España los dos tipos de apareamientos (A1 y A2) mediante técnicas moleculares en aislados de *P. infestans*. Esto trae como consecuencia la posibilidad de una reproducción sexual entre ambos tipos y, con ello, un incremento de la variabilidad genética del patógeno con la aparición de nuevas razas más virulentas, lo que puede incidir en el control y la epidemiología de la enfermedad.
2. La utilización de marcadores moleculares específicos de tipo CAPS han confirmado la presencia simultánea de los tipos A1 y A2. Este método simplifica la identificación del tipo de apareamiento frente al cruzamiento *in vitro*, al discriminar a ambos en una sola reacción.
3. Se han detectado los haplotipos mitocondriales Ia y IIa en el conjunto de los aislados, siendo mayoritario el primero, con más del 98% y, el cual está asociado a los linajes clonales US-7 y US-8.
4. De la caracterización con marcadores microsatélites SSR se han identificado 12 genotipos, predominando el 2_A1 y seguido por el Blue 13 (13_A2) y variantes, caracterizado este último, por ser el más virulento y con resistencia al Metalaxyl. También se han detectado dos aislados nuevos en Europa, denominados 'Misc' con diferente tipo de apareamiento, lo que podría significar que se hayan originado mediante recombinación sexual, implicando un cambio importante en la epidemiología del patógeno en España.
5. Se han identificado 17 razas fisiológicas de *P. infestans* mediante el espectro de virulencia con cultivares diferenciales de *S. demissum*, siendo el primer estudio realizado de este tipo con aislados españoles. La raza portadora de los 11 genes de virulencia, procede de Cádiz, siendo uno de las más complejas y agresivas descritas hasta la fecha en Europa.
6. De la evaluación de resistencia a fungicidas, la Ciazofamida fue la única materia activa que controló a los cuatro aislados probados, para todas las dosis aplicadas. Se detectó, asimismo, resistencia parcial al Benalaxil con su dosis más elevada de 100 mg l⁻¹, evidenciando resistencia de los aislados al Metalaxyl y Cimoxanilo.
7. Se han identificado fuentes de resistencia en las especies silvestres *S. bulbocastanum*, *S. caripense* y *S. fraxinifolium*, frente a la inoculación con la raza más compleja portadora de los 11 genes de virulencia (CAD-001-13).

8. Tras la inoculación del aislado CAD-001-13 se han identificado nueve híbridos somáticos derivados de *S. bulbocastanum*, *S. circaefolium* y *S. okadae* como fuentes de resistencia al patógeno. Estos genotipos se podrían retrocruzar con *S. tuberosum* con el fin de incorporar las características de adaptación y calidad de la especie cultivada.
9. Se ha iniciado un programa de mejora genética para la resistencia a *P. infestans*, mediante cruzamientos de las especies silvestres e híbridos somáticos resistentes por variedades comerciales y clones avanzados. Para ello se han empleado las especies como parentales masculinos, sin obtener descendencia viable, debido probablemente, a problemas de incompatibilidad interespecífica.
10. De los cruzamientos realizados con híbridos somáticos se han obtenido 33 clones de 2º año, algunos de ellos con buenas características, los cuales se ha incorporado al programa general de mejora genética de Neiker, con el fin de continuar con el proceso de selección.
11. Los resultados derivados de este trabajo constituyen el punto de partida de estudios posteriores de caracterización de un mayor número de aislados, ampliando las zonas de producción de patata con el fin de profundizar en la epidemiología de *P. infestans*, así como de la genética de la resistencia. Asimismo es de interés la prospección en otros hospedantes de importancia económica como el tomate con el fin de poder aplicar la metodología y resultados preliminares obtenidos, a futuros programas de mejora genética en estos cultivos.

Capítulo 8

Referencias bibliográficas

- Abad, G., and Abad, J. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. *Plant Disease* 81: 682-8.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier-Academic Press. San Diego CA. 922 p.
- Alarcón, N. 2011. Caracterización de la diversidad genética de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en Chapingo-México. Memoria de Tesis Ph.D. Universidad autónoma de Chapingo- México.
- Alor, N., Marquínez, R., Ruíz de Galarreta, J. I. 2014a. Mildiu de la patata, una enfermedad en evolución. *Revista Ciencia y Desarrollo* (Tacna-Perú) ISSN 2304-8891; 17: 99-103.
- Alor, N., Gutiérrez, I., Ruíz de Galarreta, J. I. 2014b. Prospección e identificación de aislados de *Phytophthora infestans* en el Norte de España. *Revista Ciencia y Desarrollo* (Tacna-Perú) ISSN 2304-8891; 17: 7-11.
- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., Sorrells, M. E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*. 36: 181-186.
- Andrade-Piedra, J. L., Hijmans, R. J., Forbes, G. A., Fry, W. E. and Nelson. R. J. 2005. Simulation of potato late blight in the Andes. I: Modification and parameterization of the lateblight model. *Phytopathology*. 95: 1191-9.
- Andrивon, D., Corbière, R., Lebreton, L., Pilet, F., Montarry, J., Pelle, R., y Ellisseche, D. 2004. Host adaptation in *Phytophthora infestans*: a review from population biology perspectives. *Plant Breeding and Seed Science* 50: 15-28.
- Andrивon D. 1994. Race of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. *Potato Res.* 37: 279-286.
- Austin, S., Pohlman, J. D., Brown, C. R., Mojtahedi, H., Santo, G. S., Douches, D. S., and Helgeson, J. P. 1993. Interspecific somatic hybridization between *Solanum tuberosum* L. and *S. bulbocastanum* Dun. as a means of transferring nematode resistance. *Amer. Potato J.* 70: 485-495.
- Bakonyi, J., Érsek, T. 1997. First report of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato in Hungary. *Plant Disease*. 81: 1094-1094.

- Ballvora, A., Ercolano, M. R., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C. A., Oberhagemann, P., Salamini, F., and Gebhardt, C. 2002. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 30: 361-371.
- Bamberg, B., Martin, M., and Schartner, J. 1994. Elite selections of tuber-bearing *Solanum* species germplasm. Inter-Regional Potato Introduction Station, NRSP-6. United States Department of Agriculture. pp. 56.
- Bamberg, J., and Del Rio, A. 2011. Use of Native Potatoes for Research and Breeding. *Hort Science* 46: 1444-1445.
- Barandalla, L., Ruíz de Galarreta, J. I., Ríos, D., Ritter, E. 2006. Molecular analysis of local potato cultivars from Tenerife Island using microsatellite markers. *Euphytica*. 152: 283-291.
- Barquero, M., Brenes, A. y Gómez, L. 2005. Complejidad fisiológica de *Phytophthora infestans* en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 29: 21-29.
- Barquero, M., Gómez, L., Brenes, A. 2005b. Resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en clones promisorios de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 29: 31-45.
- Barraza, B.; Nitsche, J. 2002. Contributions to late blight control caused by *Phytophthora infestans*. XI Congreso Nacional de Fitopatología – Resúmenes – Fitopatología. 37: 67-108.
- Barsby, T. L., Shepard, J. F., Kemble, R. J., and Wong, R. 1984. Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. *Plant cell reports*. 3: 165-167.
- Benavides, D., Moncayo, B., y Lagos, L. 2002. Caracterización Aloenzimática de la Población de *Phytophthora infestans* en la zonas productoras de papa *Solanum tuberosum* en el Departamento de Nariño. En: XXIII Congreso ASCOLFI. Nuevas Tendencias en Fitopatología. Bogotá, Colombia, julio3-6. Resúmenes, P.78.
- Beninal, L., Corbière R., Kedad, A., Andrivon, D., Bouznad, Z. 2009. A2 mating type, Metalaxyl resistance and complex virulence profiles: common features in some *Phytophthora infestans* isolates from Algeria. In: Proc. 11th Workshop on Euroblight, Hamar, Norway, 28–31 October 2008, pp. 237–241

- Bidani, A., Nouri-Ellouz, O., Lakhoua, L., Sihachakr, D., Cheniclet, C., Mahjoub, A., Drira, N., Gargouri-Bouzid, R. 2007. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum berthaultii* and *Solanum tuberosum* L. showed recombinant plastome and improved tolerance to salinity. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 91: 179–189.
- Bisognin, D. A., Douches, D. S., Buszka, L., Bryan, G., and Wang, D. 2005. Mapping late blight resistance in *Solanum microdontum* Bitter. *Crop Sci.* 45: 340-345.
- Black, W., Mastenbroek, C., Mills, W. R., and Peterson, L. C. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2: 173–240.
- Bradshaw, J., Bryan, G., Lees, A., McLean, K., and Solomon-Blackburn, R. 2006. Mapping the R10 and R11 genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) R gene differentials of Black. *Theor. Appl. Genet.* 112: 744-751.
- Brenes, A. 2000. Introgression of late blight resistance from *Solanum* wild species into *S. tuberosum* breeding lines. Ph.D. Thesis Tübingen University. pp. 199.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B., and Jones, J. D. 2004. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal.* 39: 264-272.
- Brurberg, M. B., Hermansen, A., Bdelhameed, E., Le, V. H., Andersson, B., Hannukkala, A., Nielsen, B., Hansen, J. G., and Yuen, J. 2007. Genetic variability of *Phytophthora infestans* in Nordic Countries. 2007.Tenth Workshop of an European Network for development of an Integrated Control Strategy of potato late blight Bologna (Italy)
- Camadro, E. L., Carputo, D., and Peloquin, S. J. 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: Interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1369-1376.
- Calderón, H. J., Castro, M., Gilchrist, E., Márquez, E., Jaramillo, S. 2002. Caracterización de las Poblaciones de *Phytophthora infestans* Presentes en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca. En: XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología (ASCOLFI). Nuevas

- Tendencias en Fitopatología. Bogotá, Colombia, julio3-6. Resúmenes, pp.46.
- Capezio, S., 2002. Análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) asociados a la resistencia horizontal a *Phytophthora infestans* en una población de *Solanum chacoense*. Tesis M.S. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce, Argentina. pp.56.
- Carter, D. A.; Archer, S. A., and Buck, K. W. 1990. Restriction Fragment Length Polimorphisms of Mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research*. 94: 1123-1128.
- Castillo, J. G. Salomón, J. L., Estévez, A., Pérez, A., Ortiz, U. 2007. Caracterización morfoagronómica del germoplasma cubano de papa (*Solanum* ssp.) Evaluación de las especies silvestres. Parte I. *Cultivos Tropicales* N° 1, pp. 63-68.
- Caten, C. E., and J. L. Jinks. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. *Canadian Journal of Botany*. 46: 329-48.
- Cavalier-Smith, T. 1987. The origin of fungi and pseudofungi. Pag. 339-354 in: *Evolutionary Biology of the Fungi*. Rayner, A. D. M., Brassier, C. M., and Moore, D. Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Chakrabarti S. K., Singh, B. P., Thakur, G., Tiwari, J. K., Kaushik, S. K., Sharma, S., and Bhardwaj, A. 2014. QTL Analysis of Late Blight Resistance in a Diploid Potato Family of *Solanum spegazzinii* × *S. chacoense*. *Potato Res*. 57: 1-11.
- Chávez, R. 1995. Por los caminos evolutivos de la papa silvestre y cultivada. *Revista Ciencia & Desarrollo*- Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. 35: 86-91.
- Chen, Q., Lynch, D., Platt, H., Li, H., Shi, Y., Li, H. J., Beasley, D., Rakosy, L., and Theme, R. 2004. Interspecific crossability and cytogenetic analysis of sexual progenies of Mexican wild diploid 1EBN species *Solanum pinnatisectum* and *S. cardiophyllum*. *Amer. J. Potato Res*. 81: 159-169.
- Clausen, A. 2003. Conservación de germoplasma de papa. Boletín informativo INTA, Actualidad papera, 2 (5).

- Coca, M., Tordoya, T. M., y Montealegre, N. 2007. Resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary de variedades de papas *phurejas* (*Solanum phureja* Juzepczuk et Bukasov) y de especies de papas silvestres, La Paz, Bolivia. *Noticiario de Recursos Fitogenéticos (Italia)*. 151: 43-48.
- Coca, M. and Montealegre, N. 2006. Short communication. Resistance to *Phytophthora infestans* in populations of wild potato species in the Sorata microcentre of genetic diversity, La Paz- Bolivia. *Spanish J. of Agric. Res.* 4: 156-160.
- Colon, L. T., Pieters, M. M. J., and Budding, D. J. 1992. Field experiments on components of resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in wild *Solanum* species. Proceedings of the Joint Conference of the EAPR Breeding & Varietal Assessment Section and the Eucarpia Potato Section, Landerneau. France. pp. 25-29.
- Colon, L. T., Jansen, R. C., and Budding, D. J. 1995. Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrid progenies of four South American *Solanum* species crossed with diploid *S. tuberosum*. *Theoretical and applied genetics*. 90: 691-698.
- Colque, C., Fernández-Northcote, E., Plata, G., Gabriel, J. 2011. Resistencia a aislamientos de tizón en especies silvestres y en variedades nativas y comerciales de papa. *Revista de Agricultura*. N° 50 - Octubre 2011.
- Collins, A., Milbourne, D., Ramsay, L., Meyer, R., Chatot-Balandras, C., Oberhagemann, P., De Jong, W., Gebhardt, C., Bonnel, E., and Waugh, R. 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Mol. Breed.* 5: 387-398.
- Contreras, M. A. 2008. Uso de especies silvestres y cultivadas en el mejoramiento de la papa. *Agro Sur*. 36: 115-129.
- Corbière, R., Montarry, J., Glais, I., Viard, A., and Andrivon, D. 2008. Aggressiveness differences between A1 and A2 isolates of *Phytophthora infestans* from France. In Eleventh EuroBlight workshop, 28-31 October 2008, Hamar, Norway.
- Cooke, D. E. L., and Andersson B. 2013. *Phytophthora infestans* and potato Late Blight in Europe En: *Phytophthora: A Global Perspective*. Ed. K. Lamour. pp. 59-67.

- Cooke, D. E. L., Cano, L. M., Raffaele, S., Bain, R. A., Cooke, L. R., Etherington, G. J., Deahl, K. L., Farrer, R. A., Gilroy, E. M., Goss, E. M., Grunwald, N. J., Hein, I., Maclean, D., McNicol, J. W., Randall, E., Oliva, R. F., Pel, M. A., Shaw, D. S., Squires, J. N., Taylor, M. C., Vleeshouwers, V. G., Birch, P. R., Lees, A. K., Kamoun, S., 2012a. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* 8: 1-14.
- Cooke, D. E. L., Lees, A. K., Shaw, D. S., Taylor, M. C., Prentice, M. W. C., Bradshaw, N. J., and Bain, R. A. 2008. The status of GB blight populations and the threat of oospores. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain*: 217-222.
- Cooke D. E. L., Lees, A. K., Grønbech-Hansen J., Lassen, P., Andersson B., Bakonyi, J. 2006. The use of microsatellite markers to examine European *P. infestans* populations using the EUCABLIGHT database.
- Cooke, L.R, Quinn, L., Baxter, E., McClelland, M. 2014. The *Phytophthora infestans* population in northern Ireland: a clonal population undergoing change. Book of acts of 19th Triennial Conference European Association for Potato Research (EAPR). Brussels (Belgium). 6-11 July. pp. 51.
- Cooke, L. R., Schepers, H. T. A. M., Hermansen, A., Bain, R. A., Bradshaw, N. J., Ritchie, F., Shaw, D. S., Evenhuis, A., Kessel, G. J. T., Wander, J. G. N. Andersson, B., Hansen, J. G., Hannukkala, A., Naerstad, R., and Nielsen, B. J. 2011. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. *Potato Res.* 54: 183-222.
- Cooke, L. R., Little, G., Armstrong, C. 2009. Recent changes in the *Phytophthora infestans* population in Northern Ireland and first results from a new all-Ireland late blight project. PPO-Special Report 13: 183–90.
- Cornelissen, B. J., and Melchers, L. S. 1993. Strategies for Control of Fungal Diseases with Transgenic Plants. *Plant physiology.* 101: 709-712.
- Creste, S., Tulmann N. A., Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biology.* 19: 299-306.
- Costanzo, S., Simko, I., Christ, B. J., and Haynes, K. G. 2005. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja*-*S. stenotomum*. *Theor. Appl. Genet.* 111: 609-617.

- Damicone, J. 2004. Fungicide resistance management. En: <http://pearl.agcomm.okstate.edu/plantdiseases/f-766.htm>; consulta: 15 Agosto de 2014.
- Danan, S., Chauvin, J. E., Caromel, B., Moal, J. D., Pellé, R., Lefebvre, V. 2009. Major effect QTLs for stem and foliage resistance to late blight in the wild potato relatives *Solanum sparsipilum* and *S. spegazzinii* are mapped to chromosome X. *Theor Appl Genet.* 119: 705–719
- Danan, S., Veyrieras, J. B., and Lefebvre, V. 2011. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. *BMC Plant Biol.* 11:16
- Darsow, U., and Hinze, E. 1991. *Phytophthora* resistance in the Gross Ltisewitz collection of wild and cultivated *Solanum* species and its use in breeding. *Gumpenstein. Osterreich.* pp. 259-264.
- Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J. and Van der wal, D. 1981. Occurrence of Metalaxyl -resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 65-68.
- Davidse, L. C. 1995. Phenylamide fungicides: biochemical action and resistance. En: Lyr, H. (ed). *Modern selective fungicides.* 2nd edition. pp. 347-354.
- De Jong, W., A. Forsyth, D. Leister, C. Gebhardt, and D. C. Baulcombe, 1997: A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome V. *Theor. Appl. Genet.* 95: 246-252.
- Díaz M. M., Fajardo, D. A., Moreno, D., García, C., Núñez, M. V. 2003. Identificación de genes R1 y R2 que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 5: 40-50.
- Douches, D.S., Bamberg, J.B., Kirk, W. 2001. Evaluation of wild *Solanum* species for resistance to the US-8 genotype of *Phytophthora infestans* utilizing a fine-screening technique. *Amer. J. Potato Res.* 78: 159-165.
- Dowley, L. J., O'Sullivan, E., Griffin D., and Harmey, M. 2000. Genetic analysis of Irish populations of *phytophthora infestans*. *Project Report.* ISBN: 1 84170 132 7.

- Drenth, A., Goodwin, S. B., Fry, W. E. and Davidse, L. C. 1993. Genotypic Diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands Revealed by DNA Polymorphisms. *Phytopathology*. 83: 1087-1092.
- Ebersold, D. 2001. Ranman, the new marathon Fungicide. Sixth Workshop of an European Network for development of an integrated control Strategy of potato late blight, Edinburgo, Scotland. Special report N° 8.
- Egúsqüiza, R. 2000. La Papa: producción, transformación y comercialización. 1ra. Edición Editorial Prisma. Lima - Perú. 192 pp.
- Egúsqüiza, R. 1987. Botánica, Taxonomía y Mejoramiento Genético de Papa. En: El cultivo de papa con énfasis en la producción de semilla. Universidad Nacional Agraria, La Molina, Perú. pp. 11-36.
- Engel, K. H. 1964. Methoden der Kartoffelzüchtung unter besonderer Berücksichtigung der Selektionsverfahren auf Leistung. *Züchter*. 34: 235-242.
- Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. *The American Phytopathological Society*. pp 562.
- Esparza, M., Garnica, I., y Zúñiga, J. 2009. Tomate de Industria: control del mildiu. *Revista Navarra agraria*. pp. 29-33.
- Espejo, R., Cipriani, G., Rosel, G., Golmirzaie, A. and Roca, W. 2008. Somatic hybrids obtained by protoplast fusion between *Solanum tuberosum* L. subsp. *Tuberosum* and the wild species *Solanum circaefolium* Bitter. *Rev. Peru. Bol.* 15: 73-78.
- Estrada, N. 2000. La Biodiversidad en el Mejoramiento Genético de la papa. Bill Hardy, Emma Martinez (Ed.) La Paz, Bolivia. pp. 372.
- Estrada, N. R. 1978. Breeding frost resistant potatoes for the tropical highlands. En: Plant cold hardness and freezing stresses. Vol. 1, P.H. Li and A. Sakai (Eds). *Academic press*. 333-341.
- EuroBlight, 2013. Potato blight mapped in Europe.
<http://euroblight.net/currently/news/nyhed/artikel/potato-blight-apped-in-europe/>
- Evert, R. F., Eichhorn, S. E., and Raven, P. H. 1999. Biology of plants. Macmillan. ISBN: 1-57259-041-6. New York. W.H Freeman and Company. pp. 944.

- Ewing, E.E., Simko, I., Smart, C.D., Bonierbale, M.W., Mizubuti, E.S. G., May, G.D., and Fry, W.E. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Molecular Breeding*. 6: 25-36.
- FAO, 2008. La Papa. Año internacional de la papa 2008, nueva luz sobre un tesoro enterrado. <ftp://ftp.fao.org/docrep/FAO/011/i0500s/i0500s02.pdf>
- FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases (FAO) (<http://faostat.fao.org>)
- Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G., Garay-Serrano, E., Belmar-Díaz, C. R., Sturbaum, A. K., Flier, W., Lozoya-Saldaña, H. 2005. Caracterización de Aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, provenientes de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 191-197.
- Flier, W. G., and Turkensteen, L. J. 1999. Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 381-388.
- Flier, W. G., Grünwald, N.J., Kroon, L. P. N., Sturbaum, A. K., Van den Bosh, T. B. M., Garay, E., Lozoya, H., Fry, W. E., and Turkensteen, L. J. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of Central Mexico suggests genetics differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* 93: 382-390.
- Forbes, G. A., Chacón, M. G., Kirk, H. G., Huarte, M. A., Van Damme, M., Distel, S., Mackay, G. R., Stewart, H. E., Lowe, R., Duncan, J. M., Mayton, H. S., Fry, W. E., Andrivon, D., Ellissèche, D., Pellé, R., Platt, H. W., MacKenzie, G., Tam, T. R., Colón, L. T., Budding, D. J., Lozoya-Saldaña, H., Hernandez-Vilchis, A., and Capezio, S. 2005. Stability of resistance to *Phytophthora infestans* in potato: an international evaluation. *Plant Pathology*. 54: 364–372.
- Forbes, G. A., Goodwin, S. B., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordoñez, M. E., and Fry, W. E. 1998. A Global Database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*. 82 :811-818.

- Forbes, G. A., Escobar, X. C., Ayala, C. C., Revelo, J., Ordoñez, M. E., Fry, B. A., Doucett, K and Fry, W. E. 1997. Population Genetic Structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*. 87: 375-380.
- Foster, S. J., Park, T. H., Pel, M., Brigneti, G., Sliwka, J., Jagger, L., Van der Vossen, E., Jones, J. 2009. Rpi-vnt1.1, a Tm-22 homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. *Mol Plant Microbe Interact*. 22: 589–600.
- Forster, H., Cummings, M. P., and Coffey, M. D. 2000. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS, DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. *Mycological Res*. 104: 1055-1061.
- FRAC. 2007. FRAC Monitoring methods. En: www.frac.info/frac/; consulta: Septiembre del 2014.
- FRAC. 2006. QoI working group. En: <http://www.frac.info>; consulta: Septiembre de 2014.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2002. Phenylamide Working Group. www.rac.info/publications. Consulta: Septiembre de 2014.
- Frankel, R., and Galun, E. 1977. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 281.
- Fry, W. E. 2008. Plant diseases that changed the world, *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol*. 9: 385–402.
- Fry, W. E., and Goodwin, S. B. 1995. Recent migrations of *Phytophthora infestans*. Pages 89-95 in: *Phytophthora infestans*. Dowley, L. J., Bannon, E., Cooke, L. R., Keane, T., and O'Sullivan, E. eds. Boole Press, Ltd., Dublin.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D. A., and Sandlan, K. P. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and Implications. *Plant Disease* 77: 653-661.
- Fry, W. E., Drenth, A., Spielman, B. C., Mantel, L., Davidse, L. C., Goodwin, S. B. 1991. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology*. 81: 1330-1336.

- Fry, W. E. 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology*. 68: 1650-1655.
- Gabriel, J., Orellana, L., Plata, G., Siles, M. 2011. Aptitud combinatoria de la resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en cultivares nativos de papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 16: 85-98.
- Gabriel, J., Coca, A., Plata, G., and Parlevliet, J. E. 2007. Characterization of the resistance to *Phytophthora infestans* in local potato cultivars in Bolivia. *Euphytica*. 153: 321-328.
- Gálvez, R., and Brown, C. R. 1980. Inheritance of extreme resistance to PVY derived from *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. *Am. Pot. J.* 57: 476-477.
- García, R. J., Correa, R. T., Gastelum, R. F., Orum, T. V.; Wasmann, C. C., and Nelson, M. R. 2000. Temporal and Spatial Patterns of Genetic Structure of *Phytophthora infestans* from Tomato and Potato in the del Fuerte Valley. *Phytopathology*. 90: 1188-1195.
- García, H. G., Marin, M., Jaramillo, S. y Cotes, J. M. 2008. Sensibilidad de asilamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas sistémicos. *Revista Agronomía Colombiana*. 26: 47-57.
- García, W., Spooner, D., Gabriel, J., Gandarillas, A. 2007. Riqueza genética de los Andes de Bolivia: Especies silvestres de papa, su utilización y bases para la conservación *in situ*. *Revista de Agricultura*. 39: 8-13.
- Gavino, P. D., and Fry, W. E. 2002. Diversity in and Evidence for Selection on the Mitochondrial Genome of *Phytophthora infestans*. *Mycologia*. 94: 781-793.
- Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Ham, P. B., Lee, T. Y., Davis, R. M., and Fry, W. E. 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of an aggressive lineage. *Plant Disease*. 84: 731-735.
- Gebhardt, C., and Valkonen, J. P. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual review of phytopathology*. 39: 79-102.
- Geddens, R. M.; Shepherd, C. M., and Genet, J. L. 2002. Factors Affecting the Post-infection, Curative Activity of fungicides for Control of Late Blight

- (*Phytophthora infestans*). pp. 323. Potatoes Today and Tomorrow Supplement I. Abstracts of Papers and Posters. 15th Triennial Conference of the European Association Potato Research. Editors Wenzel, G. and Wulfert, I. July 14-19. Hamburg, Germany.
- Ghislain, M., Trognitz, B., Herrera, M. D., Solis, J., Casallo, G., Vasquez, C., Hurtado, O., Castillo, R., Portal, L., and Orrillo, M. 2001. Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S. tuberosum* grown under short-day conditions. *Theor. Appl. Genet.* 103: 433-442.
- Gisi U., Walder F., Resheat-Eini Z., Edel D. and Sierotzki H. 2011. Changes of Genotype, Sensitivity and Aggressiveness in *Phytophthora infestans* Isolates Collected in European Countries in 1997, 2006 and 2007. *Journal of Phytopathology.* 159: 223–232.
- Gisi, U.; Hermann, D.; Oho, L., and Steden, C. 1997. Sensitivity Profiles of *Mycosphaerella graminicola* and *Phytophthora infestans* populations to different Classes of Fungicides. *Pestic. Sci.* 0031-613X: 290-298.
- Glendinning, D. R. 1983. Potato introductions and breeding up to the early 20th century. *New Phytol.* 94: 479-505.
- Gómez-Alpizar, L., Carbone, I., Ristaino, J. B. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 9: 3306-3311.
- González, M. L., Barrios S. E., G.; Rovesti, L., y Palma, R. S. 2006. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba, 2006. pp. 126.
- Goodwin, S. B., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Deahl, K. L., Punja, Z. K., Fry, W. E. 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. *Phytopathology.* 88: 939-919.
- Goodwin, S. B. 1997. The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology.* 87: 462-437.
- Goodwin, S. B., Sujkowski, L. S., and Fry, W. E. 1995. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85: 669-676.

- Goodwin, S. B. and McGrath, M. T. 1995. Insensitivity to Metalaxyl among isolates of *Phytophthora erythroseptica* causing pink rot of potato in New York. *Plant Disease*. pp. 967.
- Goodwin, S. B., and Fry, W. E. 1994. Genetic analyses of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis*. *Exp. Mycol.* 18: 20-32
- Graziano, J. 2012. Cultivos del pasado y nuevos cultivos para afrontar los retos del siglo XXI. Seminario Internacional. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Córdoba.
- Griffith, G. W., and Shaw, D. S. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes are detected after PCR Amplification of DNA from pure cultures or from Host Lesions. *Applied of Environmental Microbiology*. 64: 4007-4014.
- Grünwald, N. J. and Flier, W. G. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 171–90.
- Grünwald, N. J., Flier, W., Sturbaum, A. K., Garay-Serrano, E., Van den Bosch, T. B. M., Smart, C. D., Matuszak, J. M., Lozoya-Saldaña, H., Turkensteen, L. J., and Fry, W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley region of central Mexico. *Phytopathology*. 91: 882-890.
- Gullino, M. L., Mescalchin, E., y Mezzalama, M. 1997. Sensitivity to cymoxanil in populations of *Plasmopara viticola* in northern Italy. *Plant Pathol.* 46: 729-736.
- Gunn, J.S. 1990. Crop Protection Handbook – Potatoes. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, GU 97 PH, UK.
- Guo, X., Xie, C., Cai, X., Song, B., He, L., Liu, J. 2010. Meiotic behavior of pollen mother cells in relation to ploidy level of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. chacoense*. *Plant Cell Rep.* 29: 1277–1285
- Guo, J., Van der Lee, T. A. J., Qu, D. Y., Yao, Y. Q., Gong, X. F., Liang, D. L., Xie, K. Y., Wang, X. W., Govers, F. 2009. *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity. *Plant Biology*. 11: 57–67.

- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. H. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M. V., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P. C., Bollmann, S. R., Bos, J. I., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J. C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M. A., Fugelstad, J., Gilroy, E. M., Gnerre, S., Green, P. J., Grenville-Briggs, L. J., Griffith, J., Grünwald, N. J., Horn, K., Horner, N. R., Hu, Ch., Huitema, E., Jeong, D-H., Jones, A. M. E., Jones, J. D. G., Jones, R. W., Karlsson, E. K., Kunjeti, S. G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., MacLean, D., Chibucos, M. C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H. J. G., Morgan, W., Morris, P. F., Munro, C. A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzón, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D. C., Schumann, U. D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D. J., Sykes, S., Thines, M., Van de Vondervoort, P. J. I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B. C., West, P. V., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P. R. J., Whisson, S. C., Judelson, H. S., and Nusbaum, C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*. 461: 393-398.
- Hanneman, R. E., and Bamberg, J. B. 1986. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. USDA Bulletin 533.
- Hannukkala, A., M. Rastas, y A. E. Hannukkala. 2008. Phenotypic characteristics of Finnish and North-Western Russian populations of *Phytophthora infestans* in 2006-2007. Proceedings of the Euroblight Workshop, 28-31 October 2008, Hamar, Norway.
- Harbaoui, K., Van der Lee, T., Vleeshouwers, V. G. A. A., Khammassy, N., Harrabi, M., Hamada, W. 2013. Characterization of *Phytophthora infestans* Isolates Collected from Potato and Tomato Crops in Tunisia During 2006–2008. *Potato Res.* 56: 11–29.
- Harrison, J. G. 1995. Factors involved in the development of potato late blight disease (*Phytophthora infestans*). In: Potato ecology and modelling of crops under conditions limiting growth. Haverkort, A. J., and MacKerron, D. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 216-36.
- Haverkort, A., Struik, P., Visser, R., Jacobsen, E. 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 52: 249–264.

- Hawkes, J.G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. En: Bradshaw, J. E., y Mackay, G. R., (eds.). *Potato Genetics*. CAB International. Wallingford, UK. pp. 3-42.
- Hawkes, J. G., Ortega, J. F. 1992. The potato in Spain during the late 16 Century. *Economic Botany*. 46: 86-97.
- Hawkes, J. G. 1990. The potato evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, Oxford, UK.
- Hawkes, J. G., and Hjerting, J. P. 1989. The potatoes of Bolivia: their breeding value and evolutionary relationships. *Oxford Science Publications*.
- Hawkes, J.G. 1988. The evolution of cultivated potatoes and their tuberbearing wild relatives. *Kulturpflanze*. 36: 189-298.
- Hawkes, J. G. 1979. Evolution and polyploidy in potato species. En: Hawkes, J. G. (eds.). The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. *Linnean Soc. Symp. Ser.* 7: 637-646.
- Haynes, K. G., Xinshun, Q., Barbara, J., and Christ. 2014. Two Cycles of recurrent Maternal Half-Sib Selection Reduce Foliar Late Blight in a Diploid Hybrid *Solanum phureja* x *S. stenotomum*. Population by Two-thirds. *Am. J. Potato Res.* 91: 254–259.
- Hein, I., Birch, P., Danan, S., Lefebvre, V., Achieng Odeny, D., Gebhardt, C., Trognitz, F., and Bryan, G. 2009. Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives. *Potato Res.* 52: 215-227.
- Helgeson, J. P., Pohlman, J. D., Austin, S., Haberlach, G. T., Wielgus, S. M., Ronis, D., Zambolim, L., Tooley, P., McGrath, J. M., James, R. V., Stevenson, W. R. 1998. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theor Appl Genet.* 96: 738–742.
- Henfling, J. W. 1987. El Tizón Tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Boletín de Información Técnica 4. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima Perú. 25p.
- Hermansen, A., Amundsen, T. 1995. Mating types of *Phytophthora infestans* in Norway. In: Dowley L. J., Bannon E., Cooke L. R., Keane T., O'sullivan E. (eds): *Phytophthora infestans*. Boole Press, Ltd, Dublin: 77–82.

- Hermanova, V., Bárta, J., Curn, V. 2007. Wild potato species: characterization and biological potential for potato breeding. *Czech J Genet Plant Breed.* 43: 73–81.
- Hermsen, J. G. 1980. Current use of potato collections. En: *The Use of Plant Genetic resources*. Brown, A. H. D., Franket, O. H., Marshall, D. R., J. T. Williams (Eds). Cambridge university Press, Melbourne, pp. 68-87.
- Hernández, K., and G. Gómez. 2005 Aplicación de marcadores bioquímicos y moleculares en el estudio de poblaciones de *Phytophthora infestans* (mont.) de Bary causante del tizón tardío en papa y tomate. *Fitosanidad.* 9: 39-59. Consulta: 22/09/14
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=209116173007>
- Hohl, H. R., and Iselin, K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society.* 83: 529–530.
- Hooker, W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Nematodos parásitos de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima. Perú. pp. 131-134.
- Horsman, K., Gavrilenko, T., Bergervoet, M., Huigen, D.J., Joe, A. T. W., Jacobsen, E. 2001. Alteration of the genomic composition of *Solanum nigrum* (?) potato backcross derivatives by somatic hybridization: selection of fusion hybrids by DNA measurements and GISH. *Plant breed.* 120: 201–207.
- Howard, R. J., Ferrari, M., Genet, J. L., and Stidham, M. 2000. Biology of Curzate R action against *Plasmopara viticola* infection on grape. AFPP- Sixieme Conference Internationale sur les maladies des plantes. 6-8 de décembre, 2000. Tours, Francia.
- Huamán, Z. 1986. Botánica sistemática y morfología de la papa. (Lima), Bol. 06. CIP. 23 pp.
- Huang, S., Vleeshouwers, V. G. A. A., Werij, J. S., Hutten, R. C. B., Van Eck, H. J., Visser, R. G. F., and Jacobsen, E. 2004. The R3 resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked R genes with distinct specificities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 428-435.
- Irwin, J. A. G., Cahill, D. M., and Drenth, A. 1995. "Phytophthora in Australia." *Australian Journal of Agricultural Research* 46: 1311-1337.

- Jaramillo, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 141pp.
- Jaramillo, S., Afanador, L., Márquez, E. J., López, J. B., Arango, R., y Zapata, J. L. 2002a. Caracterización Genética del Pato sistema *Phytophthora infestans/Solanum tuberosum* y su relación con polimorfismos moleculares. Informe Final Proyecto de Investigación. Convenio COLCIENCIAS - Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Jaramillo, S., Gutierrez, L. A., Gilchrist, E., Afanador, L., and Morales, J. G. 2002. Sensibilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary procedentes de diferentes zonas paperas colombianas a fungicidas sistémicos. Mimeografiado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Judelson, H. S., and Roberts, S. 1999. Multiple Loci Determining Intensity to Phenylamide Fungicides in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 89: 754-760.
- Judelson, H. S. 1997. The Genetics and Biology of *Phytophthora infestans*: Modern Approaches to a Historical Challenge. *Genetics*. 22: 65-76.
- Judelson, H. S. 1996. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Mol Gen Genet*. 252: 155-161.
- Judelson, H. S., Spilman, L. J, and Shattock, R. C. 1995. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Genetics*. 141: 503-512.
- Jmour, W., and Hamada, W. 2006. First report of A2 mating type of *Phytophthora infestans* in Tunisia using molecular markers and some observations on its Metalaxyl resistance. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 1: 85-91.
- Jonhston, S. A., Nijs, D. T. M., Peloquin, S. J., and Hanneman, R. E. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet*. 57: 5-9.
- Kankila, J. J., Hannukkala, A. O., Rokka, V. M., Pietila, L. T. 1995. Screening *Phytophthora infestans* populations and breeding for resistance in Finland. In: Dowley L. J., Bannon E., Cooke L. R., Keane T., O'Sullivan E. (eds): *Phytophthora infestans*. Boole Press, Ltd, Dublin: 261-267

- Kessel, G. J. T., Turkensteen L. J., Schepers, H. T. A: M., Van Bekkum, P. J., and Flier, W. G. 2002. *Phytophthora infestans* Oospores in the Netherlands: occurrence and effects of cultivars and fungicides. pp 114. Potatoes Today and Tomorrow Supplement I. Abstracts of Papers and Posters. 15th Triennial Conference of the European Association Potato Research. Editors Wenzel, G. and Wulfert, I. July 14-19. Hamburg, Germany.
- Kim, K. J., and Lee, Y. S. 2002. Genetic DNA Marker for A2 mating type in *Phytophthora infestans*. *The Journal of Microbiology*. 40: 254-259.
- Knapova, G., and Gisi, U. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*. 51: 641-653.
- Knapova, G., Tenzer, I., Gessler, C., and Gisi, U. 2001. Characterization of *Phytophthora infestans* from Potato and tomato with Molecular Markers. In: Biodiversity in plant Pathology, Proceedings of the 5° Congress of the European Foundation for the Plant Pathology, 18-22 September 2000, Taormina/Giardini-Naxos, Sicily, Italy. SIPV Pisa, Italy. P: 6-9.
- Koh, Y. J., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Cohen, B. A., Ogoshi, A., Sato, N., Fry, W. E. 1994. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. *Phytopathology*. 84: 922-927.
- Koller, W. 2000. Fungicide resistance.. Encyclopedia of plant pathology. *John Wiley and Sons*. 2: 483-488.
- Kuhl, J. C., Hanneman, R. E., and Havey, M. J. 2001. Characterization and mapping of Rpi1, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol. Genet. Genom.* 265: 977-985.
- Larrosa, F. H., Camadro, E. L., Ispizúa, V., and Clausen, A. M. 2005. Fertilidad de polen y polen 2n en poblaciones de papas silvestres del No Argentino. *J. Basic Appl. Genet.* XVII: 159-160.
- Lebecka, R. 2009. Inheritance of resistance in *Solanum nigrum* to *Phytophthora infestans*. *European journal of plant pathology*, 124: 345-348.
- Lebecka, R., Sliwka, J., Sobkowiak, S. y Zimnoch-Guzowska, E. 2007. *Phytophthora infestans* population in Poland. Proceedings of the 10th Workshop of an European Network for development of an integrated control strategy of potato late blight, 2-5 May 2007, Bologna, Italy, pp 155-159.

- Lebreton, L., Andrivon, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 583–594.
- Le, V. H., Ngo, X. T., Brurberg, M. B., and Hermansen, A. 2008. Characterization of *Phytophthora infestans* populations from Vietnam. *Australian Plant Pathology*. 37: 592-9.
- Lees, A. K., Sullivan, L., Lynott, J. S. and Cullen, W. 2012. Development of a quantitative real-time PCR assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples. *Plant Pathology*. 61: 867-876.
- Lees, A. K., Cooke, D. E. L., Stewart, J. A., Sullivan, L., Williams, N. A., and Carnegie, S. F. 2008. *P. infestans* population changes: implications. In *EuroBlight Workshop Hamar*.
- Lees, A. K, Wattier, R., Shaw, D. S., Sullivan, L., Williams, N. A, Cook, D. E. L. 2006. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathol*. 55: 311–319.
- Llácer, G., López, M., Trapero, A., y Bello, A. 1996. Patología Vegetal. Tomo II. *Sociedad española de fitopatología*. España. Mundi prensa p. 721.
- Leroux, P., K. Chabane y G. Bompeix. 1993. Selection and characterization of *Phytophthora parasitica* mutants with ultraviolet-induced resistance to dimethomorph or Metalaxyl. *Pestic. Sci*. 39: 325-329.
- Li, Y., Cooke, D. E. L., Jacobsen, E., Van der Lee, T. 2013. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Microl M*. 92: 316-322.
- Li, Y., Van der Lee, T., Zhu, J. H., Jin, G. H., Lan, C. Z., Zhu, S. X., Zhang, R. F., Liu, B. W., Zhao, Z. J., Kessel, G., Huang, S. W., and Jacobsen, E. 2013. Population structure of *Phytophthora infestans* in China – geographic clusters and presence of the EU genotype Blue_13 .*Plant Pathology*. 62: 932–942.
- Li, J., Lindqvist-Kreuze, H., Tian, Z., Liu, J., Song, B., Landeo, J., Portal, L., Gastelo, M., Frisancho, J., Sanchez, L., Meijer, D., Xie, C., Bonierbale, M. 2012. Conditional QTL underlying resistance to late blight in a diploid potato population. *Theor Appl Genet*. 124: 1339–1350

- Li, G., Huang, S., Guo, X., Li, Y., Yang, Y., Guo, Z., Kuang, H., Rietman, H., Bergervoet, M., Vleeshouwers, V., Van der Vossen, E. A. G., Qu, D., Visser, R., Jacobsen, E., and Vossen, J. 2011. Cloning and characterization of R3b; Members of the R3 superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1132-1142
- Li, Y., Govers, F., Mendes, O., Testa, A., Jacobsen, E., Huang, S. W., Van der Lee, T. A. J. 2010. A new set of highly informative SSR markers for *Phytophthora infestans* population analysis assembled into an efficient multiplex. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 1098–1105.
- Liu, Z., Halterman, D. 2009. Different genetic mechanisms control foliar and tuber resistance to *Phytophthora infestans* in wild potato *Solanum verrucosum*. *Am J Potato Res.* 86: 476-480.
- López, J. B., Márquez, M. E., Jaramillo, S., Zapata, J. L., Mazo, J. J., Patiño, L. F. 1997. Determinación de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary. *Revista latinoamericana de papa* (ALAP) ISSN-1019-6609. 10: 156-170.
- Louwes, K. M., Hoekstra, R., and Mattheij, W. M. 1992. Interspecific hybridization between the cultivated potato. *Solanum tuberosum*, 362-370.
- Lozoya-Saldaña, H., Hernández, A., Flores, R., and Bamberg, J. 1997. Late blight on wild *Solanum* species in the Toluca Valley in 1996. Abstract, 81 Annual Meeting of the Potato Association of America, Prince Edward Island. Canada.
- MAGRAMA, 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. www.magrama.gob.es.
- Mahuko, G., Peters, R. D., Platt, H. W., and Daayf, F. 2000. Random Amplified Polymorphic DNA (RADP) analysis of *Phytophthora infestans*. Isolates Collected in Canada During 1994 to 1996. *Plant Pathology.* 49: 252-260.
- Malcolmson, J. F., and Killick, R. J. 1980. The breeding values of potato parents for field resistance to late blight measured by whole seedlings. *Euphytica.* 29: 489-495.

- Malcolmson, J. F., and Black, W. 1966. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15: 199–203.
- Maldonado, J., y García, C. 2002. Determinación de Polimorfismos por Haplotipos de *Phytophthora infestans* de Cundinamarca. En: XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología (ASCOLFI). Nuevas Tendencias en Fitopatología. Bogotá, Colombia, julio 3-6. Resúmenes, pp. 78.
- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209–220.
- Marfil, C. F., Camadro, E. L., and Masuelli, R. W. 2009. Phenotypic instability and epigenetic variability in a population of the wild potato *Solanum ruiz-lealii*. *BMC Plant Biol.* 9: 21.
- Mariette, N., Montarry, J., Boulard, F., Mabon, R., Corbière, R., Andrivon, D. 2014. Aggressiveness and genetic structure of french populations of *Phytophthora infestans* from 2001 to 2008. Are the most aggressive isolates the fittest?. Book of acts of 19th Triennial Conference European Association for Potato Research (EAPR). Brussels (Belgium) 6-11 July. pp.52.
- Marquínez, R. 1995. Resistance of *Phytophthora infestans* strains to phenylamides in Spain. En *Phytophthora infestans*. Dowley, L. J., Bannon, E, Cooke, R. L.; Keane, T., and O’Sullivan, E., eds, Boole Press Ltd. Dublin. pp. 137-141.
- Martínez, G. E., Barrios, S. G., Rovesti, L., y Santos, P. R. 2006. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba.
- Mattheij, W. M., Eijlander, R., De Koning, J. R. A., and Louwes, K. M. 1992. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaefolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. *Theoretical and Applied Genetics.* 83: 459-466.
- Matuszak, J. M., Fernandez-Elquezabal, J., Villarreal-Gonzalez, M., FRY, W. E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to Metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Disease.* 78: 911-916.

- Mendoza, H. A., and Haynes, F. L. 1974. Genetic basis of heterosis for yield in the autotetraploid potato. *Tag.* 45: 21-25.
- Möller, K., Dilger, M., Habermeyer, J., Zinkernagel, V., Flier, W. G. and Hausladen, H. 2009. Polpulation studies on *Phytophthora infestans* on potatoes and tomatoes in southern Germany. *Eur J Plant Pathol.* 124: 659-72.
- Mroginski, E., Capezio, S., Huarte, M. y Feingold, S., 2007. Regiones genéticas asociadas a la resistencia al virus del enrollado de la hoja en *Solanum chacoense*. Redbio 2007. 6º Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Agropecuaria. Viña del Mar, Chile 22-26 de Octubre de 2007.
- Muller, K. O., and Black, W. 1951. Potato breeding for resistance to blight and virus diseases during last hundred years. *Zeitschrift für Pflanzenzuchtung.* 31: 305-318.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15: 473-497.
- Myint, M. M. 2002. Research on Management of Potato Late Blight in Myanmar. Gilb'02 Conference: late blight managing the global threat. Abstracts. 11-13 July. Hamburg, Germany.
- Naess, S. K., Bradeen, J. M., Wielgus, S. M., Haberslach, G. T., McGrath, J. M., and Helgeson, J. P. 2000. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theoretical and Applied Genetics.* 101: 697-704.
- Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., Kozik, E. U. 2012. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an Overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease.* 96 No. 1.
- Nuninger, C, Steden, C., And Staub, T. 1995. The contribution of Metelaxyl-based fungicide mixtures to potato late blight control. pp. 122-129. En: *Phytophthora infestans*. Dowley, L. J., Bannon, E., Cooke, R. L.; Keane, T., and O'Sullivan, E., eds, Boole Press Ltd. Dublin.
- Nyman, M., and Waara, S. 1997. Characterisation of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and its frost-tolerant relative *Solanum commersonii*. *Theoretical and applied genetics.* 95: 1127-1132.

- Oberwalder, B., Schilde-Rentschler, L., Loßfelhardt-Ruo, B., Ninnemann, H. 2000. Differences between hybrids of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum circaeifolium* Bitt. obtained from symmetric and asymmetric fusion experiments. *Potato Res.* 43: 71-82
- Ochoa, D. 2004. Determinación de la sensibilidad en aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* hacia Cymoxanil, Dimetomorf y Clorotalonil. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Oliva, R. F., Erselius, L. J., Adler, N. E., Forbes, G. A. 2002. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Plant Pathol.* 51: 710-719.
- Ordoñez, M. E., Hohl, H. R., Velasco, J. A., Ramón, M. P., Oyarzún, P. J., Smart, C. D., Fry, W. E., Forbes, G. A., and Erselius, L. J. 2000. A Novel Population of *Phytophthora*, similar to *Phytophthora infestans* attacks Wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology.* 90: 197-202.
- Orellana, L. 2001. Caracterización de la resistencia al tizón *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. En Progenitores y progenies de primera generación filial (F1) obtenidas por recombinación de cultivares nativos de papa boliviana. Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarías Veterinarias Y Forestales "Martín Cárdenas", Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba – Bolivia.
- Orillo, M. and Bonierbale, M. 2009. Biología reproductiva y citogenética de la papa. Manual Técnico. Centro Internacional de la Papa (CIP). Red Latinpapa. pp. 1-2.
- Oyarzun, P. J., Taípe, J., and Forbes, G. A. 2001. *Phytophthora infestans* Characteristics and Activity in Ecuador. Country Profile. Present Status of Integrated Blight Management (IPM-Late Blight) in Andean Countries CGIAR.
- Páez, O., Valverde, R., Gómez, L., y Brenes, A. 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: 9-16.
- Pajerowska-Mukhtar, K., Stich, B., Achenbach, U., Ballvora, A., Lübeck, J., Strahwald, J., and Gebhardt, C. 2009. Single nucleotide polymorphisms in the Allene Oxide Synthase 2 gene are associated with field resistance

- to late blight in populations of tetraploid potato cultivars. *Genetics*. 181: 1115-1127.
- Pankin, A., Sokolova, E., Rogozina, E., Kuznetsova, M., Deahl, K., Jones, R., and Khavkin, E. 2011. Allele mining in the gene pool of wild *Solanum* species for homologues of late blight resistance gene RB/*Rpi-blb1*. *Plant Genet. Resour.* 9: 305-308.
- Paquin, B., Laforest, M. J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J., and B. F. Lang. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31: 380–395.
- Park, T. H., Vleeshouwers, V. G. A. A., Jacobsen, E., Van der Vossen, E., Visser, R. G. F. 2009. Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.) a perspective of cisgenesis. *Plant Breed.* 128: 109–117.
- Park, T. H., GrosSikkema, J., Vleeshouwers, A., Muskens, V.G.A.A., Allefs, M., Jacobsen, S., Visser, E., and Van der Vossen, R. G. F. 2005. The late blight resistance locus *Rpi-blb3* from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight R gene cluster on chromosome 4 of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 722-729.
- Pérez, W. G., and Forbes, G. 2008. Manual técnico. El tizón tardío de la papa. Centro internacional de la Papa. Departamento de Comunicación y Difusión del CIP. Lima, Perú. pp.41.
- Pérez, W. G., Gamboa, J. S., Falcon, Y. V., Coca, M., Raymundo, R. M., and Nelson, R. J. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 91: 956–965.
- Peters, R. D., Plantt, H. W., Hall, R. 1998. Changes in race structure of canadian populations of *Phytophthora infestans* based on specific virulence to selected potato clones. *Potato Res.* 41: 335-370.
- Plaisted, R. L., and Hoopes, R. W. 1989. The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *Am. Pot. J.* 66: 607-627.
- Podgaetskii, A. A. 1995. Establishing sources of *Phytophthora* resistance of the leaves in potato using the crop gene pool. *Tsitoh giya i Genetika*. 29: 25-31.

- Polzerova, H., Patzak, J., Greplova, M. 2011. Early characterization of somatic hybrids from symmetric protoplast electrofusion of *Solanum pinnatisectum* Dun. and *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104: 163–170.
- Power, R., R. Hamlen and A. Morehart. 1995. A variation in sensitivity of *Phytophthora infestans* field isolates to cymoxanil, chlorothalonil and Metalaxyl. En: Dowley L. J., Annon, E., Cooke, R. L., Keane, T., y O'Sullivan, E. (eds). *Phytophthora infestans*. Boole Press, Dublin. pp. 154-159.
- Raven, P. H., Evert, R. F., and Eichhom, S. E. 1999. *Biology of Plants*. New York. W.H Freeman and Company. pp. 370.
- Reis, A., Smart, C. D., Fry, W. E., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G. 2003. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease*. 87:896–900.
- Rich, A.E. 1983. *Potato diseases*. Academic Press, Nueva York. 228 pp.
- Ríos, D., Ghislain, M., Rodriguez, F., Spooner, D. M. 2007. What is the Origin of the European Potato? Evidence from Canary Island Landraces. *Crop Sci*. 47: 1271-1280.
- Rivera-Pena, A., 1990. Wild tuber bearing species of *Solanum* and incidence of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary on the western slopes of the volcano Nevado de Toluca. 3. Physiological races of *Phytophthora infestans*. *Potato Res*. 33: 349-355.
- Riveros, F., Sotomayor, R., Rivera, V., Secor, G., Espinoza, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary a Metalaxil, en cultivo de papas en el norte de Chile. *Agric. Téc.* 63 N°2. Chillán-Chile.
- Roest, S., and Gilissen, L. J. W. 1993. Regeneration from protoplasts a supplementary literature review. *Acta botanica neerlandica*. 42: 1-23.
- Rohlf, F. J. 2001. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1, Exetter Software, Setauket.
- Rokka, V. M., Xu, Y. S., Kankila, J., Kuusela, A., Pulli, S., and Pehu, E. 1994. Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica*. 80: 207-217.

- Ross, H. 1986. Potato breeding-problems and perspectives. En: Horn, W. y Röbbelen, G. (eds.). *Advances in Plant Breeding* 13. Berlín y Hamburgo, pp. 1-132.
- Rossmann, A. Y., and Palm, M. E. 2007. Why are the *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi. *Inoculum*. 58: 1-3.
- Rousselle, P., Robert, Y., and Crosnier, J. C. 1999. La patata. Ed. Mundiprensa, Madrid. pp. 298.
- Ruíz de Galarreta, J. I., Barandalla, L., Ríos, D. J., López, R., Ritter, E. 2011. Genetic relationships among local potato cultivars from Spain using SSR markers. *Genet Resour Crop Evol*. 58: 383-395.
- Ruíz de Galarreta J. I., Ríos D. J. 2008. Variedades de patata y papas españolas. Vitoria- Gasteiz (España) ISBN: 978-84-612-3401-1, 192 pp.
- Ruíz de Galarreta, J. I., Pascualena, J., Legorburu, F. J., Relloso, J. B., y Ritter, E. 2000a. Obtención de nuevas variedades de patata en Neiker: antecedentes y perspectivas. *Actas de Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata, Vitoria, España*. pp. 99-107.
- Ruíz de Galarreta, J. I., Pascualena, J., Legorburu, F. J., y Ritter, E. 2000b. Obtención de nuevas variedades de patata adaptadas a las condiciones ambientales españolas. *Cuadernos de Fitopatología* 1: 16-23.
- Ruíz de Galarreta, J. I., Carrasco, A., Salazar, A., Barrena, I., Iturritxa, E., Marquinez, R., Legorburu, F.J. and Ritter, E. 1998. Wild *Solanum* species as resistance sources against different pathogens of potato. *Potato Res*. 41: 57- 68.
- Runno-Paurson, E., Fry, W. E., Myers, K. L., Koppel, M, Mänd, M. 2009. Characterization of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato in Estonia during 2002–2004. *Eur J Plant Pathol*. 124: 565–575.
- Salaman, R. N. 1910. Male Sterility in Potatoes, a dominant Mendelian character; with Remarks on the Shape of the Pollen in Wild and Domestic Varieties. *J. Linnean Society of London, Botany*. 39: 301-312.
- Santos, J., Zarb, J., Juntharathep, P., and Leifert, C. 2002. Effect of Organic Fertility Input Type, Level and N:K Ratio on Late Blight Development and Yield Production. *Gilb' 02 Conference Late blight: Managing The Global Threat. Abstracts*. 11-13 July, Hamburg, Germany.

- Schilde-Rentschler, L., Boos, G., Ninnemann, H. 1998. Somatic hybridization of diploid potato lines, a tool in potato breeding. In: Puite, K. J., Hunizing, H. J., Kool, A. J., Koorneef, M., Krens, F. A. (eds). Progress in plant protoplast research. Kluwer. Boston, London. pp. 195-196.
- Schippers, C. L., Gieffers, W., Schafer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S.J., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: A case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics*. 137: 67-77.
- Schöber, R., Turkensteen, L. J., 1992. Recent and future developments in potato fungal pathology. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 98: 73–83.
- Sedegui, M., Carroll, R. B., Morehart, A. L., Evans, T. A., Kim, S. H., Lakhdar, R., Arifi, A. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population on Morocco. *Plant Disease*. 84: 173-176.
- Sedlák, P., Vej, P., Melounová, M., Krenek, P., Domkarová, J., and Zoufalá, J. 2005. Characterization of resistance genes resources against late blight available for Czech potato breeding by means of selected DNA markers. *Plant Soil Environ*. 51: 82-86.
- Segura, J. M., De Cara, M., Santos, M., and Tello, J. 2007. *Phytophthora infestans* Mating Types on Tomato (*Solanum lycopersicum*) in Southern Spain. Universidad de Almería, Departamento. Producción Vegetal, Spain. *Plant Dis*. 91: 109. Disponible en:
<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PD-91-0109B>.
- Servicio de Información de Noticias Científicas (SINC) www.agenciasinc.es
- Sherraf, I., Tizroutine, S., Chaput, M. H., Allot, M., Mussio, I., Sihachakr, D., and Ducreux, G. 1994. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *Lycopersicon pennellii*. *Plant cell, tissue and organ cultura*. 37: 137-144.
- Silva, B., Jaramillo, S., Marín, M. 2009. Caracterización genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y norte de Santander (Colombia). *Actual Biol*. 31: 5-20.

- Sliwka, J., Zimnoch-Guzowska, E. 2012. Resistance to late blight in potato. In: Tuberosa R, Varshney RK (eds) Genomics applications in plant breeding. Wiley, USA (in press).
- Sliwka, J., Jakuczyn, H., Kaminski, P., and Zimnoch-Guzowska, E. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying Rpiphu1, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *J. Appl. Genet.* 51: 133-140.
- Sliwka, J., Jakuczun, H., Lebecka, R., Marczewski, W., Gebhardt, C., and Zimnoch-Guzowska E. 2006. The novel, major locus Rpi-phu1 for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theor. Appl. Genet.* 113: 685-695.
- Smart, C. D., Sandrock, R. W., and Fry, W. 2000. Molecular Techniques and Mystery of the Potato Late Blight Pathogen. *Plant-Microbe Interactions*. Edited by Gary Tacey and Noel Keen. 336 p. APS (*American Phytopathology Society*).
- Smilde, W. D., Brigneti, G., Jagger, L., Perkins, S., and Jones, J. D. G. 2005. *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene Rpi-moc1. *Theor. Appl. Genet.* 110: 252-258.
- Sokolova, E., A. Pankin, M. Beketova, M. Kuznetsova, S. Spiglazova, E. Rogozina, I. Yashina, and Khavkin, E. 2011. SCAR markers of the R-genes and germplasm of wild *Solanum* species for breeding late blight-resistant potato cultivars. *Plant Genet. Resour.* 9: 309-312.
- Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C. R., Helgeson, J. P., Jiang, J. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100: 9128–9133.
- Sorensen, K. K., Madsen, M. H., Kirk, H. G., Madsen, D. K., and Torp, A. M. 2006. Linkage and quantitative trait locus mapping of foliage late blight resistance in the wild species *Solanum vernei*. *Plant Breed.* 125: 268-276.
- Spooner, D. M., and Hijmans, R. J. 2001. Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *Amer. J. Potato Res.* 78: 237-268; 395.
- Spooner, D. M., Van der Berg, R. J., Rodriguez, A., Bamberg, J., Hijman, R. J., and Lara Cabrera, S. I. 2004. Systematic botany monographs: Wild

- potatoes (*Solanum* section petota: *Solanaceae*) of North and Central America. *The Amer. Society Plant Taxonomists*. pp. 209.
- Stewart, H. E., Bradshaw, J. E., and Pande, B. 2003. The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathology*. 52: 193-198.
- Sujkowski, L. S., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., and Fry, W. E. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84: 201-207.
- Sujkowski, L. S., Fry, B. A., Power, R. J., Goodwin, S. B., Peever, T. L., Therrien, D. I., Ritch, L. S. Sujkowski, L. J., Spielman, A. and Fry, W. E. 1993. *Phytophthora infestans* in Poland from 1987–1989; nuclear DNA content, mating type distribution and response to Metalaxyl. *J. Phytopathol.* 139: 68–80.
- Swiezynski, K. M., Domanski, L., Zarzycka, H., Zimnoch-Guzowska, E. 2000. The reaction of potato differentials to *Phytophthora infestans* isolates collected in nature. *Plant Breeding*. 119: 119-126.
- Swiezynski, K. M. 1994. Inheritance of Resistance to viruses. En: *Potato genetics*. Bradshaw, J. E, Mackay, G. R. (Eds). CAB International, Wallingford, 15: 339-364.
- Thieme, R., Rakosy-Tican, E., Nachtigall, M., Schubert, J., Hammann, T., Antonova, O., Gavrilenko, T., Heimbach, U., Thieme, T. 2010. Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. *Plant Cell Rep.* 29: 1187–1201.
- Thieme, R., Rakosy-Tican, E., Gavrilenko, T., Antonova, O., Schubert, J., Nachtigall, M., Heimbach, U., Thieme, T. 2008 Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. x *Solanum tarnii*) and their fertile BC1 progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theor Appl Genet.* 116: 691–700.
- Tiwari, J. K., Sundaresha, S., Singh, B. P., Kaushik, S. K., Chakrabarti, S. K., Bhardwaj, V., Chandel, P. 2013c. Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. *Plant Breed.* 132: 237–245.

- Tiwari, J. K., Sarkar, P. D., Pandey, S. K., Gopal, J., Kumar, S. R. 2010. Molecular and morphological characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. etuberosum* Lindl. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 103: 175–187.
- Tooley, P. W., Therrien, C. D., Ritch, D. L. 1989. Mating type, race composition, nuclear DNA cont and isozyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology.* 79: 478-81.
- Torres, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. (<http://www.cipotato.org/csd/materials/HTorres/HTorresTT.pdf>) Consulta: 22/09/14.
- Trognitz, F. C., Trognitz, B. R. 2005. Survey of resistance gene analogs in *Solanum caripense*, a relative of potato and tomato, and update on R gene genealogy. *Mol. Gen. Genomics.* 274: 595–605.
- Trognitz, B. R. 1991. Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. *Euphytica*, 56: 143-148.
- Umaerus, V., and Umaerus, M. 1994. Inheritance of Resistance to Late Blight. En: Bradshaw J. E. and Mackay G. R. *Potato Genetics*. UK. Scottish Crop Research Institute. Cab International. pp 372.
- Vaillant, D. I., y Gómez, G. 2009. Incidencia de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora infestans* en Cuba. *Agricultura Técnica en México.* 35: 219-223.
- Van den Bosch, T., Li, Y., Evenhuis, B., Förch, M., Van Der Lee, T., and Kessel, G. 2011. The population structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands during the years 2000-2009. Thirteenth EuroBlight workshop. PPO-Special Report No. 15: 31-36.
- Van der Lee, T., De witte, I., Drenth, A., Alfonso, C. and Govers, F. 1997. AFLP Linkage Map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology.* 21: 278-291.
- Van der Vossen, E., Gros, J., Sikkema, A., Muskens, M., Wouters, D., Wolters, P., Pereira, A., and Allefs, S. 2005. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J.* 44: 208-222.

- Van der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B.L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W., Allefs, S. 2003 An ancient R gene from wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 36: 867–882.
- Villamon, F. G., Spooner, D. M., Orrillo, M., Mihovilovich, E., Pérez, W., Bonierbale, M. 2005. Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species *Solanum paucisectum* (series Piurana). *Theor Appl Genet.* 111:1201–1214.
- Wang, M., Allefs, S., Van den Burg, R. G., Vleeshouwers, V. G. A. A., Van der Vossen, E. A. G., and Vosman, B. 2008. Allele mining in *Solanum*: Conserved homologues of Rpi-blb1 are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 933-943.
- Wickramasinghe, W. M. D. K., Qu, X. S., Costanzo, S., Haynes, K. G., Christ, B. J. 2009. Development of PCR-based markers linked to quantitative resistance to late blight in a diploid hybrid potato population of *Solanum phureja* × *S. stenotomum*. *Am. J. Potato Res.* 86: 188–195.
- Zimnoch-Guzowska, E., Lebecka, R., Kryszczuk, A., Maciejewska, U., Szczerbakowa, A., Wielgat, B. 2003. Resistance to *Phytophthora infestans* in somatic hybrids of *Solanum nigrum* L. and diploid potato. *Theor Appl Genet.* 107: 43-48.

