

DETECCION *in Vitro* DE OOSPORAS DE *Phytophthora*  
*infestans* (Mont.) de Bary

YISA MARIA OCHOA FUENTES

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA



Universidad Autónoma Agraria  
"Antonio Narro"

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenvista. Saltillo. Coah.

OCTUBRE DE 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

DETECCION *in Vitro* DE OOSPORAS DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de

Bary

POR

YISA MARIA OCHOA FUENTES

TESIS

ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE  
ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL  
GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITE PARTICULAR:

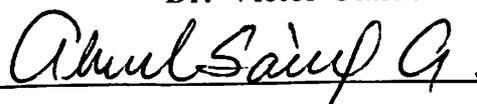
Asesor principal:

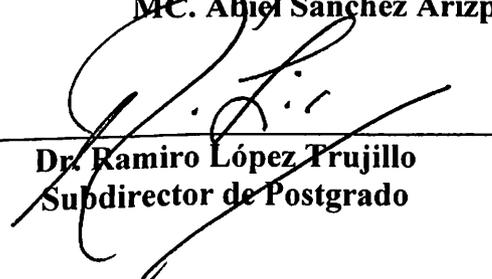
  
MC. Alberto Flores Olivas

Asesor :

  
Dr. Víctor Olalde Portugal

Asesor:

  
MC. Abiel Sánchez Arizpe

  
Dr. Ramiro López Trujillo  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Octubre de 2002

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

Silverio Ochoa Macias  
Ma. del Carmen Fuentes Recio

Que me han dado la vida y todo el apoyo para lograr la culminación de mis estudios.

### **A MIS HERMANOS:**

Gualberto S. Ochoa Fuentes  
Guadalupe Montserrat Ochoa Fuentes  
Aldo Aldebaran Ochoa Fuentes  
Laura Alicia Ochoa Fuentes  
Mary Carmen Ochoa Fuentes

Que con su cariño, me alentaron toda la carrera a dar lo mejor de mí.

### **A MI ESPOSO:**

Ernesto Cerna Chavez

Por ser la persona más importante en mi vida.

### **A MIS FAMILIARES Y AMIGOS**

Que me brindaron su apoyo moral y grata compañía, en los momentos que me encontraba lejos de mi hogar.

### **A MIS COMPAÑEROS DE GENERACIÓN**

De los cuales aprendí el valor de la amistad y el trabajo en equipo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por su apreciable amistad y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Víctor Olalde Portugal**, por su amable disposición para participar asesorando la presente investigación.

Al **Dr. Abiel Sánchez Arizpe**, por su participación en la asesoría de la presente investigación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por su apoyo durante mi estancia en el postgrado.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por cobijarme en su seno durante la realización de mis estudios de postgrado.

Al **Personal del Departamento de Parasitología**, por brindar el apoyo necesario para formarme como profesionista.

## COMPENDIO

**Detección *in Vitro* de oosporas de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**

**POR**

**Yisa María Ochoa Fuentes**

**MAESTRÍA**

**PARASITOLOGIA AGRICOLA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 2002.**

**MC Alberto Flores Olivas - Asesor-**

**Palabras clave: Tizón tardío, proteínas, inmunología.**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN) Unidad Irapuato, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila; en el periodo de Febrero del año 2000 a Julio del año 2001.

El trabajo tuvo como objetivo el desarrollar una metodología de detección *in vitro* de oosporas de *P. infestans*. En esta investigación se utilizaron aislados de los dos grupos de compatibilidad sexual de *Phytophthora infestans* (grupos A1 y A2) los cuales fueron confrontados en medio de cultivo centeno agar, de esta manera se obtuvo concentraciones de oospora de 80,000 hasta 160,000 oosporas/ml, posteriormente estas oosporas fueron perfectamente purificadas con el complejo enzimático Novozym<sup>™</sup> 234; ya purificadas, se obtuvo la proteína de oosporas y micelios de diferentes especies de *Phytophthora* incluyendo a *infestans* y fueron cuantificadas las proteínas mediante el método de Bradford, 1976 y Kruger, 1994.

Se realizó electroforesis en SDS- Poliacrilamida y se obtuvieron cuatro bandas proteicas exclusivas en el patrón de oosporas, tal es el caso de las bandas con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa y 106 kDa en las oosporas y dos bandas de bajo peso molecular de aproximadamente 8.2 y 8.7 kDa. También se observó en el patrón electroforético que existen bandas proteicas conservadas en el micelio de todas las especies de *Phytophthora* incluyendo *infestans*; así como a las oosporas de *P. infestans* la banda presentó un peso de 19.9 kDa. Otra observación derivada del perfil electroforético es la presencia de una banda de 14 kDa en el patrón de *P. cinnamomi*, que es muy semejante a la que se observa en *P. citrophthora*, esta misma banda se presentó también en *P. citricola*.

Para la inmunodetección se eligieron dos anticuerpos desarrollados previamente los cuales fueron específicos a oosporas de *P. infestans*; ya que se requería que la inmunodetección fuera lo más específica y evidente posible. La autorradiografía de los

anticuerpos reveló una fuerte inmunodetección de dos bandas proteicas de bajo peso molecular de aproximadamente 33.2 y 26.9 kDa, respectivamente; dichas bandas no sólo fueron detectadas en oosporas, sino también en micelio de *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *P. citrophthora* y *P. capsici*, pero no se presentaron en *P. infestans*.

También se pudo observar que en la muestra de oosporas se detectaron por este mismo suero, otras dos bandas proteicas de un alto peso molecular correspondientes a 106 y 123.6 kDa aproximadamente, mismas que no se presentan en el resto de las muestras; es decir, fueron específicas para oosporas.

**ABSTRACT**

**In *Vitro* Detection of *Phytophthora infestans* ( Mont.) of Bary Oospores**

**BY**

**Yisa María Ochoa Fuentes**

**MASTER IN SCIENCE**

**AGRICULTURAL PARASITOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTOBER 2002.**

**MC Alberto Flores Olivas- Advisor-**

**Key words: Late Blight, proteins, immunology.**

This investigation was realized in the CINVESTAV-IPN Unit Irapuato, National School of Biological Sciences of IPN and the UAAAN Saltillo Mexico; during the period of February, of 2000 to July, of 2002.

The objective was to develop a methodology of detection *in vitro* *P. infestans* of oospores. We used isolated (A1 and A2) of *Phytophthora infestans* of both compatibility, which were confronted in rye agar culture, of this way, we were obtained

80,000 up to 160,000 oospores/ml concentrations of oospores, later these oospores were perfectly purified with the Novozym tm 234 enzymatic complex; proteins purified, were obtained of oospores and micelia of different species of *Phytophthora* including to *infestans* and the proteins were quantified by means of the Bradford method. (1976 and Kruger, 1994).

SDS- Poliacrilamid electrophoresis was realized and four bands proteins exclusive were obtained in the oospores pattern, such bands with 17 kDa and 106 kDa molecular weight of approximately in the oospores and two bands of low molecular weight of approximately 8.2 y 8.7 kDa. Showed that bands conserved proteins as the one that was observed in electrophoretic patron of the *P. infestans* micelia whit a molecular weight of 19.9 kDa, the which is common in all the species and the oospores. Another observation, electrophoretic profile presented a 14 kDa band by *P. cinnamomi* that was similar to one observes in *P. citrophthora*, this same band was also presented in *P. citricola*.

Two antibodies were chosen for the immunodetection, which one were developed previously contra *P. infestans* oospores; since it was required that the immunodetection was the most specific and evident possibly. Autoradiographyc of revealed strong immunodetection from two bands of low molecular weight of approximately 33.2 and 26.9 k Da, respectively; non alone these bands were detected in oospores, also of *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *P. citrophthora* and *P. capsici* micelia, but they were not presented in *P. infestans*.

Sample of oospores were detected by this same antibody , other two bands proteics of a high molecular weight correspondents to 106 and 123.6 kDa, respectively , same that they do not appear in the rest of the samples; that it to say, they were specific for oospores.

## INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	xi
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	xiv
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
Objetivos.....	3
<b>REVISION DE LITERATURA</b> .....	4
Tizón tardío de la papa <i>Phytophthora infestans</i> .....	4
Generalidades .....	4
Ubicación taxonómica .....	5
Características morfológicas .....	6
Sintomatología.....	8
Epidemiología.....	9
Variación patogénica.....	12
Importancia.....	12
Tipos y fuentes de variación.....	12
Descubrimiento de grupos de compatibilidad.....	14
Reportes del estado sexual.....	15
Efectos de la reproducción sexual de <i>Phytophthora infestans</i> .....	17
Diagnóstico de organismos fitopatógenos.....	18
Importancia.....	18
Diagnóstico de <i>Phytophthora infestans</i> .....	19
Métodos de detección de oosporas de <i>Phytophthora infestans</i> .....	21

<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>22</b>
Obtención de oosporas <i>in vitro</i> .....	22
Purificación de oosporas <i>in vitro</i> .....	23
Obtención y cuantificación de proteína.....	23
Electroforesis en gel de SDS – poliacrilamida.....	24
Electrotransferencia de proteína.....	25
Inmunodetección.....	26
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
Obtención de oosporas <i>in vitro</i> .....	27
Purificación de oosporas <i>in vitro</i> .....	28
Cuantificación de proteína.....	28
Electroforesis en gel de SDS – poliacrilamida.....	30
Inmunodetección.....	31
<b>DISCUSION.....</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>36</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>37</b>
<b>PAGINAS WEB CONSULTADAS.....</b>	<b>46</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>		<b>Página</b>
<b>4.1</b>	Oosporas obtenidas <i>in vitro</i> por confrontación de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de <i>P. infestans</i> .....	27
<b>4.2</b>	Curva estándar de albúmina sérica bovina, utilizada para la cuantificación de proteína.....	28

## INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Página
<b>Cuadro 4.1</b>	Cantidad de proteína obtenida de oosporas de <i>P. infestans</i> y micelio de diferentes especies de <i>Phytophthora</i> .....29

## INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los alimentos más consumidos por el hombre, solo superado por el trigo, arroz y maíz. Sin embargo, su valor nutritivo es mucho mayor (CONPAPA,1999). En México, el cultivo se establece durante todo el año debido a la gran diversidad de condiciones climatológicas en el territorio nacional, por lo que su venta en tubérculo fresco para consumo se dá en cualquier época del año. En nuestro país, la superficie sembrada para el 2000 fue de 73,904 hectáreas con una producción promedio de 1,592,595 toneladas y con un rendimiento promedio de 21.5495 ton/ha. (FAOSTAT 2001).

En nuestro país los costos de producción son muy altos, para 1999 oscilaban en \$85,000 por hectárea (CONPAPA 1999), ello se debe fundamentalmente al uso de agroquímicos, sobre todo utilizados en el combate de enfermedades, que es la principal limitante Técnica - Ecológica de la papa en México (Flores, 1999).

Entre los principales problemas que limitan la producción de papa están los fitosanitarios destacando entre estos las enfermedades, siendo las más importantes para este cultivo *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* , *Erwinia carotovora* y *Ralstonia solanaceum* (Ramos, 1991), así como enfermedades virosas como el virus (PVY<sup>n</sup>)(Flores, 1999).

El tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, es la enfermedad de mayor importancia en el cultivo de la papa, pues bajo condiciones favorables para el patógeno, como lo son alta humedad relativa y temperatura oscilando entre 15 y 21°C, es extremadamente destructivo (Apple y Fry, 1983; Franc *et al.*, 1996) pues con una sola planta infectada y si no se aplican medidas de combate, puede devastar todo un campo de cultivo (Draper *et al.*, 1994; Alonso, 1996).

El tizón tardío posee dos grupos de compatibilidad sexual A1 que dominó por más de 150 años en el mundo, y el tipo A2 que solo había sido reportado en el centro de México hasta inicios de los 80s, actualmente es reportado en Norteamérica, Europa y Asia. A partir de la diseminación del grupo A2 se incrementaron los costos de combate del tizón. Por ejemplo, en Estados Unidos antes de los 90s era de 70 dls/ha , después del 90 incrementó a 1000 dls y en México antes de los 90s era de 350 dls/ha y después del 90 es de 2000-2500 dls/ha.

En México se ha detectado la mayor diversidad genética de *Phytophthora infestans*; ya que este patógeno es originario de los Valles Altos de Toluca en el estado de México. Y es aquí donde ocurre la reproducción sexual del patógeno en la que intervienen los dos grupos de compatibilidad A1 y A2 produciéndose oosporas de tipo sexual heterotálicas (Cohen *et al.*, 1997). Se sospecha que las oosporas son la fuente de inóculo inicial importante de las epidemias de tizón tardío (comunicación personal), además la progenie que de ahí se deriva, posee mayor variabilidad, presentándose clones más patogénicos y tolerantes a los fungicidas convencionales (Andrivon, 1995; Gregory, 1983).

Por lo anterior es importante implementar metodologías para realizar estudios que permitan detectar las oosporas, debido a que actualmente no existen. Por lo anterior en este trabajo se planteó el siguiente objetivo.

- ◆ Desarrollar un método inmunolectroforético que permita la detección de oosporas de *Phytophthora infestans*.

## REVISION DE LITERATURA

### Tizón tardío de la Papa *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

#### Generalidades

El tizón tardío de la papa se presenta en casi todas las regiones donde se establece el cultivo. Sin embargo; es más virulento donde las condiciones como clima húmedo y fresco prevalecen, ya que; favorecen tanto a la producción de tubérculos como de la enfermedad, que puede destruir la planta en cualquier momento durante la estación de crecimiento . Puede atacar también a los tubérculos cuando se almacena o transporta (Agrios,1991; Draper *et al.*, 1994).

El nombre del género *Phytophthora* se deriva del griego *phyto* que significa planta y *phthora* significa destructor (Erwin y Ribeiro, 1996). *Phytophthora infestans* es originario de la región del Valle de Toluca, en el centro de México, en donde se encontró atacando plantas silvestres del género *Solanum* (Niederhauser, 1991). El rango de hospederos de importancia económica de *P. infestans* está limitado a las especies de tomate (*Lycopersicum esculentum L.*) y papa (*Solanum tuberosum L.*) (Spielman *et al.*,1989).

*Phytophthora infestans* es heterotálico; es decir requiere de dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 para que se de la reproducción sexual. El grupo de compatibilidad A1 apareció casi simultáneamente en Europa y Estados Unidos en la década de 1830- 1840 (Flores, 1999; Romero, 1988). La primera epidemia de tizón tardío asoló a Europa desde Francia hasta Rusia y causó la devastadora hambruna irlandesa en 1845-1846 (Bourke, 1991; CIP, 1993). Erwin y Ribeiro (1996) mencionan que ninguna otra fitoenfermedad ha resultado en tan extendido sufrimiento humano e impacto económico.

El grupo de compatibilidad A2 se mantuvo confinado en México hasta 1976 cuando se produjo una nueva migración que incluyó los dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 (Niederhauser, 1991; Goodwin y Drenth, 1997; Goodwin *et al.*, 1994).

Cuando el micelio de estos dos tipos de compatibilidad sexual interactúan, la reproducción sexual resulta con la formación de oosporas (Hooker, 1990) y la correspondiente recombinación genética (Fry *et al.*, 1993).

### **Ubicación taxonómica de *P. infestans* (Mont.) Bary (Beakes *et al.*, 1995)**

Reino Chromista

Clase Oomycetes

Orden Peronosporales

Familia *Pythiaceae*

Género *Phytophthora*

Especie *infestans*

## Características Morfológicas

Las hifas, son cenocíticas de 4.2 a 13.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene un esqueleto de microfibrillas de celulosa y material amorfo de  $\beta$ - 1,3 y  $\beta$ - 1,6 glucanas (Bartnicki-García y Wang, 1983); este patógeno produce esporangioforos de crecimiento indeterminado, ramificados, en simpodio compuesto, con hinchamientos en las ramas donde nacen los esporangios de forma alimonada, con papila incospicua, deciduos de pared delgada (Alexopoulos *et al.*, 1996; Romero, 1988; Hooker, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996), con dimensiones de 29 x 19  $\mu\text{m}$  (Tucker, 1931) a 36 x 22  $\mu\text{m}$  (Waterhouse, 1963).

Aún cuando los esporangios pueden germinar directamente por medio de un tubo germinativo, comúnmente los esporangios forman de 6 a 12 zoosporas (Deahl, 1996; Hooker, 1990; Fry *et al.*, 1983), las cuales, son reniformes y biflageladas (Barr, 1983) y les permiten nadar por horas (Bimpong y Clerk, 1970) y en minutos se enquistan y producen un tubo micelial germinativo (Erwin y Ribeiro, 1996).

El micelio, esporangioforos, esporangios y zoosporas son estructuras correspondientes al ciclo asexual de *P. infestans* (Romero, 1988). No se ha reportado el desarrollo de clamidosporas, ni de hinchamientos de hifa, para *P. infestans* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las estructuras sexuales de *P. infestans*, están compuestas de un anteridio (componente masculino) y un oogonio (huevo que contiene el componente femenino)

(Erwin y Ribeiro, 1996). El oogonio es liso, globoso y activo de 38 a 50  $\mu$  de diámetro; el anteridio es anfigino y pasivo ( Romero, 1988; Erwin y Ribeiro, 1996).

Las oosporas que se forman en el oogonio, es globosa o esférica, lisa, apelerótica de 25 a 35  $\mu$ m de diámetro (Galindo y Gallegly, 1960; Romero, 1988) y está caracterizada por tener pared celular de capas múltiples, la cual, se cree sirve tanto de protección como de almacenamiento (Hemmes, 1983; Bartnicki- García y Wang, 1983). Desarrolla una gruesa pared interna de 0.5-0.6  $\mu$ m (Waterhouse, 1963)compuesta principalmente por  $\beta$ -1,3 glucanas (Bartnicki- García y Wang, 1983; Hemmes, 1983). La pared externa de la oospora tiene aproximadamente 20 nm de espesor (Hemmes, 1983). La pared de la endospora, que se forma en la oospora es de aproximadamente 0.7-1.0  $\mu$ m (Erwin y Ribeiro, 1996).

Los diferentes mecanismos que son operativos para la producción de oosporas heterotálicas incluyen la hibridación directa, la estimulación por sustancias exógenas y la estimulación del grupo de compatibilidad opuesto, presumiblemente por sustancias tipo hormonas, solubles en agua  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (Ko, 1978). Siendo este último mecanismo, el que reporta la mayor formación de oosporas (Ko y Kunimoto, 1981). Cabe mencionar que los aislados del grupo A1, producen más oosporas que los aislados del grupo A2 (Ko, 1978; Ko y Kunimoto, 1981).

## Sintomatología

Los síntomas del tizón tardío varían dependiendo de la humedad, temperatura, intensidad de luz, cultivo y edad de las plantas (Weingartner, 1996). Estos síntomas pueden presentarse en hojas, tallos o tubérculos (Agrios, 1991).

Las primeras lesiones aparecen como manchas en las puntas o bordes de las hojas inferiores donde el agua o el rocío tiende a acumularse (Franc *et al.*, 1996). Las lesiones foliares son visibles como pequeñas manchas irregulares de amarillo a verde claro (Deahl, 1996; Alonso, 1996), durante clima húmedo y frío estas lesiones se expanden rápidamente, convirtiéndose en grandes lesiones necróticas o café oscuras (Drapper, 1994; Tivoli y Bedin, 1999).

Las infecciones de las hojas pueden ocurrir por el haz o envés pero, parece ser que el envés es más susceptible; debido posiblemente al número de estomas (Deahl, 1996). Por el envés de las hojas, las manchas se cubren de un vello blanquecino provocado por las fructificaciones del hongo, que en conjunto dan a esa tonalidad (Romero, 1988; Hooker, 1990; Apple y Fry, 1983; Drapper, 1994; Franc, 1996).

De las hojas, la infección avanza hacia al peciolo y luego al tallo, el cuál muestra manchas purpúreas casi negras en principio y posteriormente, en condiciones favorables para el patógeno aparece crecimiento blanquecino sobre las áreas afectadas, provocado por el desarrollo de micelio, esporangios y esporangioforos (Agrios, 1991; Romero, 1988); como ya se ha mencionado. Estas lesiones, frecuentemente matan todas las hojas

de la rama afectada (Weingartner, 1996). En el campo, las plantas severamente afectadas por tizón tardío tienen un olor pungente muy distintivo, resultado de la rápida descomposición de las hojas de papa (Drapper, 1994; Hooker, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996; Alonso, 1996).

La infección de tizón tardío en los tubérculos, está caracterizada por áreas ligeramente depresadas, de forma irregular, de color café a púrpura y de tamaño variable sobre la piel de la papa (Drapper, 1994; Alonso, 1996). Cortando justo debajo de la infección, la piel revela una podredumbre oscura café rojiza, seca y corchosa (Apple y Fry, 1983; Weingartner, 1996), relativamente superficial de 1.5 cm de profundidad (Romero, 1988); la cual varía dependiendo del tiempo después de la infección, del tipo de cultivo, de la temperatura, así como de la humedad del suelo (Erwin y Ribeiro, 1996). Sin embargo la pudrición continúa desarrollándose después de que los tubérculos han sido cosechados o bien los tubérculos infectados pueden ser invadidos posteriormente por hongos y bacterias secundarias que producen pudriciones blandas, dándole a las papas podridas un olor desagradable y putrefacto (Agrios, 1991).

## **Epidemiología**

El desarrollo epidémico de *Phytophthora infestans* depende en gran parte del efecto que tienen las condiciones climatológicas presentes, sobre las diferentes etapas del ciclo de vida del patógeno (Holliday, 1980; Agrios, 1991).

El patógeno presenta una mayor esporulación a una humedad relativa de 100 por ciento y a temperaturas que oscilan entre 16-22°C (Agrios 1991), por tal motivo, la infección en el campo es más exitosa en condiciones de humedad y frío (Hooker, 1990). Se requieren condiciones de humedad por al menos 7-10 horas para la producción de esporangios, la cuál es óptima a 21 °C (Drapper, 1994).

La temperatura óptima para la germinación indirecta de los esporangios vía zoosporas es de 12°C, produciendo cada uno de los esporangios de 3 a 8 zoosporas (en algunas ocasiones el número es mayor de 6 a 12), las cuales son diseminadas cuando se rompe la pared esporangial a nivel de su papila. mientras que para la directa vía tubos germinales es de 24 °C (Hooker, 1990). Una vez que los esporangios han germinado se requiere un período de 2 a 2.5 horas a una temperatura de 15 a 25°C para que se produzca la penetración de los tubos germinales en los tejidos del hospedero (Deahl, 1996; Franc, 1996). Posteriormente a la penetración del hongo, la temperatura óptima para su desarrollo es de 17 a 21 °C (Holliday, 1980). Las epidemias pueden resultar con la dispersión del inoculo desde campos distantes o desde piezas de semilla infectada (Alonso, 1996).

Las temperaturas mayores a los 30°C inhiben el desarrollo del patógeno en el campo, pero no lo destruyen, de ahí que pueda esporular nuevamente con una temperatura favorable; siempre y cuando la humedad sea lo suficientemente alta (Agrios, 1991; Duvauchelle y Andrivon, 1999).

Los síntomas iniciales en un lote de papa provienen del inóculo primario, es decir el tubérculo (Holliday, 1980), ya que el hongo inverna en forma de micelio en los tubérculos de papa infectados (Agrios, 1991; Alonso, 1996). Síntomas secundarios, normalmente los más desastrosos, se ven en hojas y brotes tiernos (Ames, 1980).

*P. infestans* inverna no solo en tubérculos que son usados como semillas, sino también en los que aún no se cosechan, en los apilados en tiraderos de granjas o almacenes comerciales (Alonso, 1996). Los mecanismos por los cuales *P. infestans* persiste en el suelo y llega a ser fuente primaria de inóculo han sido controversiales (Andrивon, 1995; Gregory, 1983). De acuerdo a muchos reportes, el inóculo sobrevive en tubérculos infectados y en áreas donde ambos tipos de compatibilidad sexual existen (Erwin y Ribeiro, 1996).

Parte del por que *P. infestans* es un patógeno de mucho éxito es debido a los dos ciclos de reproducción; sexual y asexual, que posee (Deahl, 1996). La espora asexual es el esporangio con una habilidad única de fructificar rápidamente en el tejido de las hojas y tallos (Agrios, 1991). La oospora es el primer foco del ciclo sexual (Deahl, 1996). A pesar de que existen pocos estudios, las oosporas son consideradas una fuente tanto de inóculo como de variabilidad patogénica (Fry *et al.*, 1983; Aragonés, 1984; Agrios, 1991; Andrивon 1995; Deahl, 1996). Se sabe que en las hojas se encuentran en contacto con el suelo frecuentemente son las primeras en infectarse, esto sugiere que las oosporas probablemente juegan un papel en la supervivencia de *P. infestans* bajo condiciones adversas (Hooker, 1990). La información sobre el ciclo sexual y la producción, supervivencia, germinación e infectividad de las oosporas es imperativa para el

desarrollo del futuro control de la enfermedad y las estrategias de manejo del inóculo que es transportado en el suelo (Deahl, 1996).

## **Variación Patogénica en *Phytophthora infestans***

### **Importancia**

Variación es la propiedad o capacidad que tienen los organismos para cambiar sus características de generación en generación (Agrios, 1991). McDonald (1989) dice que la cantidad de variación en las poblaciones afecta su habilidad para adaptarse a condiciones ambientales fluctuantes, en general, poblaciones altamente variables son más hábiles para adaptarse a condiciones cambiantes que aquellas con poca variación.

### **Tipos y Fuentes de Variación**

Brasier (1992) menciona que muestras de especies de *Phytophthora* manifiestan a menudo una amplia variación en muchos caracteres, dice también que el sistema genético en este género presenta una amplia gama de mecanismos para la expresión de variación.

Agrios (1991) señala que en la mayoría de los fitopatógenos la variación en la progenie es debida a la segregación y recombinación de genes ocasionada por la reproducción sexual.

Robertson (1991) puntualiza que se han realizado múltiples esfuerzos para entender las bases de la variabilidad en *Phytophthora infestans* y el respaldo genético de tal variación. Señala también que, por si sola, la reproducción sexual normal no explica la gran variación de este patógeno.

Se menciona que la abundante variación en fenotipos encontrados dentro de las colecciones de *Phytophthora infestans* del tipo de compatibilidad A1, fuera de México, sugiere que una forma desconocida de recombinación sin sexo es responsable (Shaw, 1991).

Son varios los mecanismos diferentes a la reproducción sexual, que se mencionan como responsable de la variación en *Phytophthora infestans*; así, se menciona a la mutación (Gallegly y Eichenmuller, 1959, Mills y Peterson, 1952, Howatt y Grainger, 1955, y Van der Plank, 1963), recombinación somática (Leach y Richl, 1969 y Malcolmson, 1970).

Dentro de las manifestaciones de variación en *P. infestans*, se reportan las siguientes: en requerimientos nutricionales (Cantino y Turian, 1959 y Holh, 1991), morfología colonial (Caten y Jenkins, 1968 y Shattock *et al*, 1990), en comportamiento sexual (Galindo y Gallegly, 1960), germinación de esporangios (Anderson y Barnett, 1957), morfología del anteridio (Shaw, 1991), en isoenzimas (Mosa *et al*, 1993 y Tooley *et al*, 1985), resistencia a metalaxyl (Staub *et al*, 1979) en contenido de DNA del núcleo (Spielman *et al*, 1990) y en patogenicidad (Caten, 1960, Giddings y Berg 1919, Galindo, 1958 y Sujkowski, 1991), entre otros.

## Descubrimiento de Grupos de Compatibilidad

En estudios iniciados en 1955 y culminados en 1957, para determinar si existía heterotalismo en este hongo, se realizaron cruzas entre 105 aislamientos provenientes de Estados Unidos, Canadá, Europa Oriental, Sudáfrica y las Indias Orientales. Estas cruzas produjeron pocas oosporas viables (Goaugh *et al.*, 1957 y Smoot *et al.*, 1957).

Posteriormente se incluyeron cuatro aislamientos mexicanos 26 M, 42 M, 43 M y 66 M, los cuales se cruzaron con los 105 aislamientos anteriores. De los resultados de estas cruzas se encontró que existen dos grupos de apareamiento sexual compatibles. Al cruzarse cualquier aislamiento de un grupo con cualquier otro, se formaban oosporas con anteridios anfigenos en gran abundancia y cuando se realizaron los cruzamientos entre los aislamientos de un mismo grupo no se formaron oosporas en abundancia. Tres de los cuatro aislamientos mexicanos el 26 M, 42 M y 43 M formaron un grupo de apareamiento, mientras que el aislamiento 66 M se comportó como cualquiera de los 105 y conformaron otro grupo. Con lo anterior fue evidente que los dos grupos de compatibilidad estaban presentes solo en México (Smoot *et al.*, 1958).

A raíz del descubrimiento de Smoot, en México se iniciaron trabajos para determinar las reacciones de apareamiento de un gran número de aislamientos, con el propósito de determinar si existían otros tipos de apareamiento, en adición a los dos ya descritos y también para esclarecer si el estado sexual de *Phytophthora infestans* ocurría en la naturaleza en México. Así tras realizar cruzas entre 95 aislamientos mexicanos, se

encontró que los tipos de apareamiento se presentaban en México en una relación aproximada de 1:1. Otro hallazgo importante fue realizado en el Valle de Toluca donde sobre hojas de papa de la variedad Katahdin, infectadas naturalmente, se encontraron oosporas, las cuales fueron semejantes en todos los aspectos a las formadas en el cultivo puro (Gallegly y Galindo, 1957 y 1958).

El hecho de que para una abundante formación de oosporas se requiera de dos cepas, indicaba la existencia de heterotalismo en esta especie, más no se descartaba la posibilidad de que la formación de oosporas tuviera otras causas (Galindo y Romero, 1958).

Aunque estudios anteriores demostraron que *Phytophthora infestans* es principalmente heterotálico, de forma ocasional algunos investigadores lo han observado como homotálico, en este caso están Graham y Romero (1958) quienes de 88 aislamientos encontraron 53 del grupo A1, 33 del A2 y 2 se comportaron como homotálicos.

### **Reportes del Estado Sexual**

A partir del reporte de Smoot, *et al* en 1958, en el cuál se establece la presencia del grupo de compatibilidad A2 y de la confirmación de esto, por Gallegly y Galindo, en 1958, los trabajos realizados en México solo involucraban capas del centro de la república, esto debido a que era la única localidad en la cual se sabía que existían ambos tipos de apareamiento.

Estudios realizados por Goodwin *et al* (1992), mostraron la presencia de los dos tipos de apareamiento en diferentes localidades. Este trabajo marcó el antecedente de la presencia del grupo de apareamiento A2 en esta región y en la zona noreste.

Por más de un cuarto de siglo fue aceptado que *Phytophthora infestans* solo se reproducía sexualmente en México, debido a que era el único lugar donde se había encontrado el grupo de compatibilidad A2 y las oosporas se encontraban sobre el follaje de cultivos de papa en forma natural. Además de acuerdo a Reddick (1943), México es el centro de origen del hongo.

El primer reporte de la presencia del grupo de compatibilidad A2, fuera de México, provino de Suiza en 1984 (Hohl, y Iselin, 1984). Después de este reporte, investigadores de varios países se dieron a la tarea de revisar los aislamientos de sus colecciones y los que obtenían en campo, con el propósito de determinar la presencia o ausencia del grupo A2 en sus países.

Otros países reportan también la presencia del Grupo de compatibilidad A2 , así tenemos a Holanda ( Fry *et al.*, 1991 y Therrien *et al.*, 1989), Polonia (Ritch, 1990, Ritch, 1991 y Sujkowsky *et al.*, 1994), Inglaterra y Gales (Shattock *et al.*, 1990), Japón (Therrien y Daggett, 1990 y Mosa *et al.*, 1993), Alemania Oriental (Daggerr y Gotz, 1991) y la U.R.S.S.

Aún cuando no se tiene una respuesta exacta para explicar la aparición abrupta del grupo de apareamiento A2 en diferentes partes del mundo. Se manejan varias hipótesis, una de ellas es:

Entre 1977-1978, *P. infestans* “escapó” de nuevo de su hogar México, probablemente en embarque de papas de México a Europa. Esta vez fue la cepa A2. De Europa esta nueva cepa se ha diseminado y llegado a establecer en todo el mundo (Niederhauser, 1993).

### **Efectos de la reproducción sexual de *Phytophthora infestans***

La función de oosporas de tipo homotáticos, es como propágulos persistentes en la planta enferma (Stack y Millar, 1985). El papel en el campo de las oosporas en tipos heterotáticos no está bien comprendido, pero fuertes evidencias indican que el apareamiento de los tipos de compatibilidad sexual A1 y A2 pueden ser una fuente de nuevas razas o biotipos (Romero y Erwin, 1969, Tooley *et al.*, 1986; Spielman *et al.*, 1989 y 1990; Erwin y Ribeiro, 1996), especialmente, en los lugares en donde ambos tipos coexisten en la naturaleza por ejemplo, en la región de Toluca, México (Smoot *et al.*, 1958; Niederhauser y Cobb, 1959; Galindo y Gallegly, 1960).

A pesar de que las oosporas son sensibles a la falta de agua, pueden establecerse en condiciones de sequía mucho mejor que las esporas asexuales o esporangios, por esta razón las oosporas son capaces de sobrevivir por meses o años en el suelo, por lo tanto, si *P. infestans* se reproduce sexualmente en el campo, las oosporas deben ser otra muy

importante fuente de inóculo inicial para tizón tardío, no solo en papa si no, también en tomate (Fry *et al.*, 1983; Griffith *et al.*, 1995), por lo que la epidemiología de tizón tardío debe estar cambiando drásticamente (Fry *et al.*, 1983; Franc *et al.*, 1996; Deahl, 1996).

Sin embargo, debido a que las oosporas no son conocidas en la mayoría de las áreas productoras de papa en el mundo, solamente existen pocos estudios del ciclo sexual y de las condiciones que favorecen la reproducción sexual de *P. infestans* en ambientes naturales (Deahl, 1996; Franc *et al.*, 1996). Este hecho evidencia la necesidad de desarrollar metodologías que ayuden a detectar oportunamente a las oosporas.

## **Diagnostico de Organismos Fitopatógenos**

### **Importancia**

El diagnóstico oportuno de los patógenos, es fundamental para desarrollar medidas de control efectivas, optimizar los recursos y reducir los efectos negativos en el medio ambiente. El diagnóstico de enfermedades vegetales es una arte con sólidas bases científicas; es un arte y una ciencia por que requiere integrar el conocimiento del patosistema y la función de cada factor en el desarrollo de la enfermedad (Flores, 1997). Un diagnóstico oportuno detecta el agente causal de un evento patológico y es fundamental para el manejo del problema; genera una reducción en los costos de producción, y en el daño ecológico e incrementa la eficiencia de las medidas de control (Barnes, 1994; Grogan, 1981).

Los métodos de diagnóstico tradicional como aislamiento, microscopia de luz, uso de plantas diferenciales, y otros, siguen usándose rutinariamente (Barnes, 1994; Streets, 1969). Sin embargo las técnicas modernas han permitido una detección más eficiente. Además, la detección correcta de un microorganismo, nos permite realizar estudios cualitativos y cuantitativos de tipo epidemiológico, permitiéndonos con ello resolver dudas sobre la biología y ecología de estos fitopatógenos

### **Diagnóstico de *Phytophthora infestans***

Se pueden considerar dos fases: I.- diagnóstico macroscópico, el cual se basa en la observación de síntomas y signos en el patosistema en estudio. Son fundamentales la experiencia del fitopatólogo y su conocimiento de las variables que inciden en la enfermedad, como el cultivo a investigar, el suelo, clima y patógeno, etc; II.- El diagnóstico microscópico, que consiste en la observación de las estructuras del microorganismo fitopatógeno. Esta observación puede ser directamente al microscopio de luz (Flores, 1997).

Normalmente es necesario inducir la formación de estructuras reproductivas, como esporas del patógeno (Shaad *et al.*, 1995) las cuales las obtendremos mediante los aislamientos del patógeno en medio selectivo como los son el agar-centeno (Hohl, 1991) y v8-agar siendo este último el que mejores resultados ha presentado. Este proceso, que es en sí tedioso y consumidor de tiempo, debe incluir muestras correctas o representativas del problema, así como las observaciones de campo para dirigir correctamente el examen de laboratorio.

Las técnicas basadas en el diagnóstico tradicional de *P. infestans*, así como de otros microorganismos fitopatógenos, se basan de manera general, en los postulados de Koch( Erwin y Ribeiro 1996; Flores *et al.*, 1997) y, aunque estos han permitido el reconocimiento de una gran variedad de especies como generadores de enfermedades en un amplio rango de plantas (Bauer, 1991), presentan en la actualidad un sin número de limitaciones (Miller, 1996); debido a que con estas técnicas no es posible detectar y cuantificar estructuras como las oosporas de *P. infestans* en el suelo.

Sin embargo las técnicas modernas han permitido una detección más eficiente de los patógenos. Además, la detección correcta de un microorganismo, nos permite realizar estudios cualitativos y cuantitativos de tipo epidemiológico, permitiéndonos con ello resolver dudas sobre la biología y ecología de estos fitopatógenos. Existen técnicas modernas que han permitido una detección de variantes patogénicas un ejemplos es caso de Serología (Clark, 1981), como ensayos de inmunosorbencia unidos a enzimas (ELISA). Por otro lado, la tecnología de ácidos nucleicos ha incrementado su empleo exponencialmente en el diagnóstico y detección de variantes patogénicas, principalmente mediante el empleo de marcadores genéticos (Landegren *et al.*, 1988; Lewin, 1994; Michelmore y Hulbert, 1987; Miller y Martin, 1988).

## Métodos de Detección de Oosporas de *Phytophthora infestans*

La detección de los síntomas de la enfermedad son fácilmente reconocibles, pero la presencia del patógeno no siempre es tan obvia. La detección de oosporas en los suelos es una muestra de ello; pues para determinar la presencia de estas se requiere desarrollar métodos sensibles, que nos permita conocer la presencia de oosporas en el suelo; actualmente existe un método desarrollado para detectar contaminación en las semillas y oosporas en el suelo pero este método de PCR fue desarrollado para *Phytophthora fragariae*.

Actualmente no existe información publicada relacionada a métodos de detección de oosporas de *Phytophthora infestans*.

Muestra de ellos los trabajos que se han estado realizando hasta la fecha en el laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV Unidad Irapuato; donde se evalúan tres técnicas de detección de oosporas como lo son la microbiológica, serológica y molecular, en esta última usaron la Reacción en Cadena de la Polimerasa y dos iniciadores específicos para ampliar una secuencia de 462 pb de *P. infestans*. Además se esta utilizando la técnica citada por Zhou 1995 y modificada en el mismo laboratorio para extracción de AND a partir de suelo. Ellos reportan que los resultados han sido satisfactorios ya que se ha logrado amplificar la secuencia específica de *P. infestans*. Actualmente están tratando de cuantificar las oosporas por esta técnica (Flores y Olalde, 2000).

## **MATERIALES Y METODOS**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN) Unidad Irapuato, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila; en el periodo de Febrero del año 2000 a Julio del año 2001.

Los aislados que se usaron pertenecieron al grupo de compatibilidad sexual A1 con las cepas 64134, 64135 fueron adquiridas en la American Type Culture Collection y los aislados nativos que fueron donados por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad, Irapuato, Guanajuato, México (CINVESTAV-IPN) previamente identificados como A2.

### **Obtención de Oosporas *in Vitro***

Se hicieron confrontaciones de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2. Se colocaron discos con micelio en los extremos de las cajas de petri con medio V8-agar y fueron incubadas a 18°C de 10 a 15 días en oscuridad. La identificación se realizó al microscopio compuesto por medio de montajes con lactofenol azul.

## **Purificación de Oosporas *in Vitro***

Se usó la técnica de Spielman modificada (1989), se utilizó el complejo enzimático Novozym<sup>™</sup> 234, (Calbiochem) para la degradación de micelio y esporangios de *P. infestans*. Para su purificación se separaron alícuotas de 1ml de la suspensión micelio- oosporas a las que se le adicionó 24 mg/ml de complejo enzimático Novozym; el complejo se diluyó previamente en 500 ml de amortiguador SCS pH 5.5 (citrate de sodio 20 mM y sorbitol 1M), se dejó actuar a una temperatura de 23 °C durante 2 h. Transcurrido el tiempo de acción de Novozym, las suspensiones fueron cosechados con una centrifuga a 2,500 rpm durante 5 min, el sobrenadante se desechó; la pastilla con oosporas se lavó dos veces y el paquete celular se cosechó con una centrifuga a 2,500 rpm durante 5 min con agua desionizada estéril. La pastilla final de oosporas fué resuspendido en solución salina 0.85 por ciento y se guardó a 4°C. La concentración de oosporas se determinó con un hematocímetro o cámara de Neubauer.

## **Obtención y Cuantificación de Proteína**

Para la purificación de proteínas se usó 2 ml de una suspensión concentrada de oosporas, se agitó con perlas de vidrio de 0.05 mm de diámetro (en una proporción 1:1) en un homogenizador vortex mistral mixer modelo 1190 a máxima velocidad por 7 pulsos por min cada uno, dejando reposar el paquete en hielo entre los intervalos de cada pulso. Se separó el sobrenadante de las perlas de vidrio y se separó con una centrifuga a 2,500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se guardó a 4 °C hasta su uso y la pastilla fue resuspendida en una solución de SDS al 2 por ciento, esta suspensión se mantuvo en ebullición a baño maría durante 20 min y se separó la pastilla con una

centrifuga a 2,500 rpm por 10 min se desechó la pastilla y el sobrenadante se mezcló con el sobrenadante anteriormente guardado a 4 °C.

Esta suspensión se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 12 por ciento a -20 °C durante toda la noche. El precipitado se separó con una centrifuga Eppendorf 5415 C a 12,000 rpm en una durante 10 min desechando el sobrenadante, la pastilla se lavó con acetona anhidra con una centrífuga a 12,000 rpm por 10 min, se dejó secar a 4 °C y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril. 5 µl de la proteína resuspendida fueron utilizados para la cuantificación de la misma por el método Bradford ( Bradford, 1976; Kruger, 1994). La proteína restante se guardó a -20 °C. Este mismo procedimiento se realizó para la obtención de proteína de micelio fresco de *P. infestans*, y micelio liofilizado de *P.cinnamomi*, *P.citrophthora*, *P.citricola*, *P.capsici* y *P.parasitica*; con la única diferencia de que el número de pulsos en el homogenizador vórtex para este caso fue de 8.

### **Electroforesis en Gel de SDS- Poliacrilamida**

Las proteínas de las oosporas y micelio de las especies de *Phytophthora* fueron separadas. Se utilizó un gel separador al 7.5 por ciento conteniendo regulador para el gel pH 8.5 (tris 3M, SDS 0.3 por ciento) al 30 por ciento, glicerol al 10 por ciento, persulfato de amonio al 0.5 por ciento y TEMED al 0.05 por ciento. El gel concentrador al 4 por ciento está compuesto por regulador para el gel pH 8.5 al 20 por ciento, persulfato al 0.3 por ciento y TEMED al 0.03 por ciento.

La composición del amortiguador para el cátodo pH 8.25 fue de Tris 0.1M, Tricina 0.1 M, SDS 0.3 por ciento y para el amortiguador del ánodo pH 8.9 fue de Tris 0.2M. Se aplicaron 50 volts al comienzo de la corrida y una vez que las proteínas alcanzan el gel separador se aumentó a 100 volts, voltaje que se mantuvo hasta terminar la separación; la fuente de poder que se utilizó fué el modelo OSP-105 de Labsen Scientific Co y una cámara Hoefer Spacer-Mate. 10 µl de la muestra de proteína se diluyeron en proporción 1:1 con el regulador de carga 2X (SDS 10 por ciento, Glicerol 30 por ciento, Tris 100mM, azul de bromofenol 0.6 por ciento y 2b-Mercaptoetanol 4 por ciento y se calentaron en baño maría durante 20 min.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron estándares preteñidos de BIO RAD (fosforilasa B 103,000 Da, albúmina sérica bovina 76,000 Da, ovalbúmina 49,000 Da, anhidrasa carbónica 33,200 Da inhibidor de tripsina de soya 28,000 Da y lisozima 19,000 Da).

### **Electrotransferencia de Proteínas**

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas ya mencionadas en PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Millipore), para la transferencia se aplicó una corriente de 210 mA en un tiempo aproximado de 2 h 45 min. La composición del regulador que se corrió fue tris 0.025M, glicina 0.192M, pH 8.3 y metanol 20 por ciento. La transferencia se efectuó en una cámara de Hoefer Scientific Instruments y una fuente de poder de Labsen Scientific Co. OSP-105.

## Inmunodetección

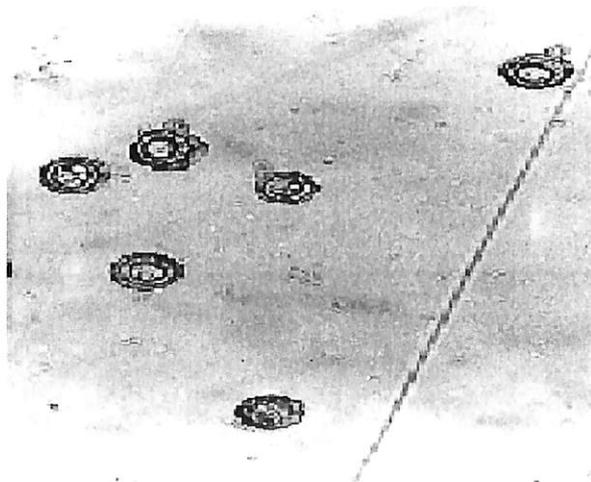
Para esta prueba se utilizaron los anticuerpos adsorbidos a 37°C 1 h y a 4°C toda la noche y estuvo basada en el método que describen Rosell y White (1978) citado por Tijssen, (1993), para el cual se utilizó un kit conejo /ratón para Westen Blot con quimioluminiscencia (Crisp y Dunn, 1994). La membrana PVDF se lavó tres veces con TBS pH 7.5 (Tris 50 Mm, NaCl 150 mM), se incubó 1 h 45 min en regulador de bloqueo (svelty 5 por ciento), después se incubó con el anticuerpo contra oosporas de *P. infestans* diluido en regulador de bloqueo al 0.5 por ciento en una proporción 1:500 durante toda la noche. La membrana se lavó dos veces con TBS-T (TBS - Tween 20 0.1 por ciento), se lavó otras dos veces más con regulador de bloqueo 0.5 por ciento. Se incubó con el anticuerpo de ratón – anticonejo IgG-POD (acoplado a peroxidasa) durante 1 h. Se efectuaron 4 lavados con TBS-T de 15 min cada uno y finalmente se reveló con luminol sobre una película Kodak X-Omat AR.

## RESULTADOS

### Obtención de Oosporas *in Vitro*

Las mejores combinaciones en la obtención de oosporas de *P. infestans* fueron las confrontaciones de los aislados 64134 y 64135 con el grupo de compatibilidad A2; incubadas por 15 días a 18°C y 10 días más a 4 °C en oscuridad en ambos casos. De esta manera se logró obtener concentraciones de 80,000 hasta 160,000 oosporas/ml (Figura 4.1).

Figura 4.1. Oosporas obtenidas *in vitro* por confrontación de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *P. infestans*



## Purificación de Oosporas Obtenidas *in Vitro*

El complejo enzimático Novozym<sup>™</sup> 234 resultó ser altamente efectivo para la purificación de oosporas, logrando suspensiones, perfectamente purificadas y totalmente libres de micelio. Con esta metodología, se lograron concentrar suspensiones hasta de 180,000 oosporas/ml.

## Cuantificación de Proteína

La curva estándar utilizada para la determinación de la cantidad de proteína se muestra en la Figura 4.2.

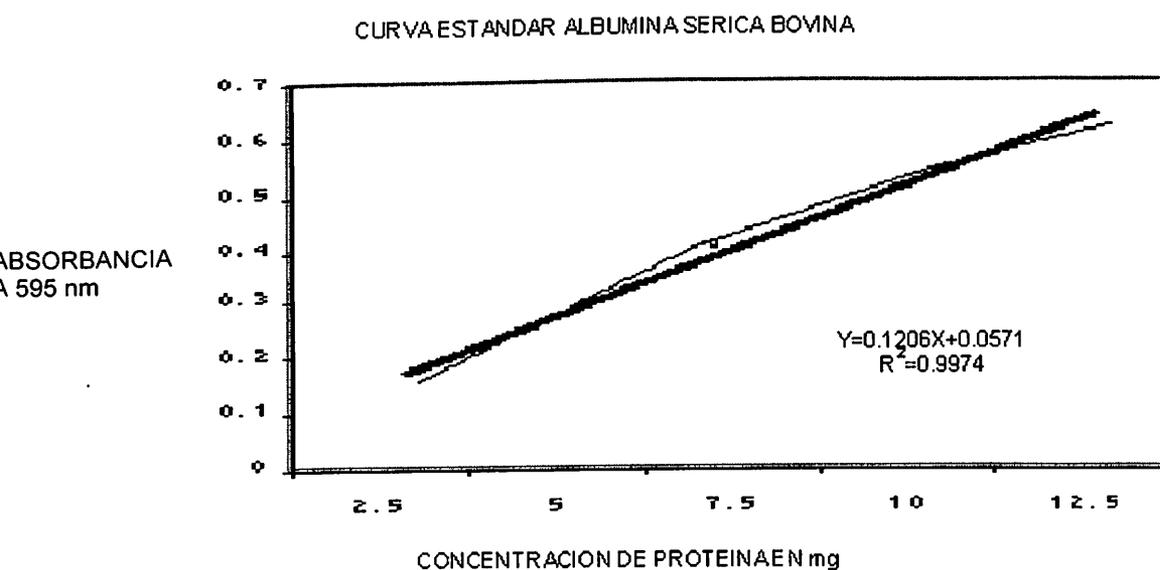


Figura 4.2. Curva estándar de albúmina sérica bovina, utilizada para la cuantificación de proteína.

Esta curva fue utilizada para interpolar y obtener los valores de proteína desconocidos, teniendo los valores de absorbancia de las muestra problema tomados a 595 nm y con la ecuación de la recta, obtenida de la línea estándar para concentraciones conocida de albúmina sérica bovina y se calcularon las cantidades de proteína de las diferentes especies. En el Cuadro 4.1 se muestran las cantidades proteínicas obtenidas para oosporas y el micelio de las diferentes especies de *Phytophthora*, con las que se trabajó .

Cuadro 4. 1. Cantidad de proteína obtenida de oosporas de *P. infestans* y micelio de diferentes especies de *Phytophthora*.

MUESTRA	PROTEINA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Oosporas de <i>P. infestans</i>	0.31
<i>Micelio de P. infestans</i>	0.86
<i>Micelio de P. capsici</i>	0.25
<i>Micelio de P. cinnamomi</i>	0.18
<i>Micelio de P. citricola</i>	0.44
<i>Micelio de P. citrophthora</i>	0.09
<i>Micelio de P. parasítica</i>	0.33

## Electroforesis en SDS- Poliacrilamida

Se presentaron cuatro bandas proteínicas en el patrón de oosporas, que no se encuentran en los micelios de las diferentes especies de *Phytophthora*. Tal es el caso de las bandas con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa y 106 kDa en las oosporas y dos bandas de bajo peso molecular de aproximadamente 8.2 y 8.7 kDa.

Existen diferencias en el patrón electroforético de proteínas de las oosporas de *P. infestans* con respecto al micelio de las diferentes especies de *Phytophthora*, incluyendo *P. infestans*, también existen bandas proteicas conservadas como la que se observó en el patrón electroforético del micelio de *P. infestans* con un peso de 19.9 kDa, la cuál es común en todas las especies y las oosporas. Otra observación derivada del perfil electroforético es la presencia de una banda de 14 kDa en el patrón de *P. cinnamomi*, que es muy semejante a la que se observa en *P. citrophthora*, esta misma banda se presentó también en *P. citricola*.

Por lo anterior, se encuentran diferencias inmunogénicas marcadas, de tal manera, las diferencias inmunogénicas permiten, la detección de las oosporas de *P. infestans* con los anticuerpos policlonales utilizados.

## Inmunodetección

Para esta prueba se eligieron dos anticuerpos desarrollados previamente los cuales fueron específicos a oosporas de *P. infestans*; ya que se requería que la inmunodetección fuera lo más específica y evidente posible.

La autorradiografía de los anticuerpos reveló una fuerte inmunodetección de dos bandas proteínicas de bajo peso molecular de aproximadamente 33.2 y 26.9 kDa, respectivamente; dichas bandas no solo fueron detectadas en oosporas, sino también en micelio de *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *P. citrophthora* y *P. capsici*, pero no se presentaron en *P. infestans*. Estas bandas no se detectaron con la misma intensidad en todas las muestras, siendo en las oosporas la detección más clara, seguidas por *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *P. citrophthora*, *P. citricola* y *P. capsici*, respectivamente.

También se pudo observar que en la muestra de oosporas se detectaron por este mismo anticuerpo, otras dos bandas proteicas de un alto peso molecular correspondientes a 106 y 123.6 kDa aproximadamente, mismas que no se presentan en el resto de las muestras; es decir, fueron específicas para oosporas.

## DISCUSION

Respecto a los resultados de electroforesis, se esperaba existieran diferencias inmunogénicas marcadas, no solo con las proteínas que no comparten, sino también con respecto a las que tienen en común y cuya cantidad de proteína presente en oosporas es baja. De tal manera que si esas diferencias inmunogénicas fueran reales, se esperaría que la detección de las oosporas por los anticuerpos utilizados en este trabajo fuera más específica para dichas estructuras.

Los resultados coinciden con aquellos reportados por Erselius y Vallavicille (1984), quienes realizaron una comparación de los perfiles proteicos de seis especies de *Phytophthora*, en la cuál encontraron similitudes entre especies; ellos hicieron una interpretación visual de las bandas fuertemente teñidas, de la misma manera que fue realizada para este trabajo.

En los perfiles proteicos que obtuvieron Erselius y Vallavicille (1984), señalan que existe una banda en común entre *P. capsici* y *P. citrophthora* así como hasta siete bandas compartidas entre aislados de *P. citrophthora* y *P. citricola*, ellos no reportan el peso molecular de ningún banda, por lo tanto la comparación que aquí se presenta es solamente subjetiva. Mencionan además que los perfiles electroforéticos de las oosporas obtenidas de *P. cactorum* y *P. citricola*; ambas especies homotáticas, fueron idénticos a

los obtenidos para el micelio de *P. cactorum* y *P. citricola* respectivamente, caso que no sucedió con los perfiles de las oosporas y el micelio de *P. infestans* que aquí se reportan.

Esto se explica porque *P. infestans* es una especie heterotálica, en la que ocurre recombinación genética entre los dos grupos de compatibilidad durante la formación de las oosporas, y no es de sorprenderse que el perfil proteico de la progenie sea poco similar al de cualquiera de las especies progenitoras; y siendo *P. cactorum* y *P. citricola* especies homotálicas, dicha recombinación genética no sucede y los perfiles proteicos no se ven alterados.

En cuanto a la inmunodetección es importante resaltar, que los anticuerpos no detectaron ninguna banda proteica de *P. infestans*, confirmando de esta manera, que los anticuerpos utilizados contra el micelio de esta especie realmente fueron eliminados durante la adsorción realizada a los anticuerpos, evitando que los anticuerpos presenten detección cruzada con micelio de *P. infestans*, demostrándose en las autorradiografías.

Podemos ver el caso del reporte de Amouzou – Alladaye *et al.* (1988), quienes al realizar pruebas de detección de diferentes especies de *Phytophthora* con suero policlonal que obtuvieron para detectar *P. fragariae* en plantas de fresa infectadas, encontraron reacción cruzada con tres aislados de *P. cactorum*, un aislado de *P. citrophthora*, *P. palmivora*, *P. syringae* y *Phytium middletonii*. Sin embargo, estos autores consideran que estos resultados no constituyen un impedimento para realizar una confiable detección de *P. fragariae* debido a que son parásitos que generalmente no se encuentran asociados con plantas de fresa.

De manera práctica, estos comentarios son aplicables a este trabajo, por que las especies de *Phytophthora* que fueron inmunodetectadas, no tienen relación alguna como patógenos de la planta de papa, con excepción de *P. parasitica*, que es un parásito de cuatro solanaceas, incluyendo *Solanum tuberosum* L. (papa), aunque es poco frecuente su infección a esta planta (Erwin y Ribeiro, 1996), por lo que no reviste ninguna importancia.

Una probable alternativa a este inconveniente es la elución del par de bandas proteicas que resultaron ser específicas para oosporas, inocularlas a nuevos conejos y volver a obtener anticuerpos policlonales, que con mayor seguridad serán específicos de oosporas.

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un método inmunolectroforético de detección de oosporas de *P. infestans*. En la inmunodetección, se detectaron en oosporas cuatro bandas proteicas de 106, 123.6, 33.2 y 26.9 kDa, de las cuales las dos primeras resultaron ser específicas a oosporas y las otras dos fueron comunes entre oosporas y el resto de las especies de *Phytophthora*, excepto para *P. infestans*.

## RESUMEN

Se desarrolló un método de inmunoelectroforesis para la detección *in vitro* de oosporas de *Phytophthora infestans* usando anticuerpos policlonales, con el fin de monitorear la especificidad de los anticuerpos; se realizaron inmunodetecciones usando la técnica “Western – blot”, con extractos proteicos totales de oosporas y micelio *P. infestans*, así como de otras cinco especies de *Phytophthora*; de esta manera fue posible detectar cuatro bandas proteicas de 106, 123.6, 33.2 y 26.9 kDa, de las cuales las dos primeras fueron específicas de oosporas y las otras dos las compartían con los micelios de diferentes especies de *Phytophthora* a excepción de *P. infestans*.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 1988. Plant pathology . third edition. Academic Press Inc. California. 19-36 y 317-324 pp.
- Alexopoulos. C. J; C.W. Mims; M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. 4<sup>th</sup> ed. 687-689, 717-723 pp.
- Alonso, A. F. 1996. El cultivo de la patata. Ed. Mundi - prensa. España. 13-18, 23,130-131, 151-154 pp.
- Ames, de I. T. 1980. Compendio de Enfermedades de la Papa (traducción) Centro Internacional de la Papa. 60 pp
- Amouzou-Alladaye, E., J. Dunez, y M. Clerjeau, 1988. Immunoenzymatic detection of *Phytophthora fragariae* in infected strawberry plants. *Phytopathology* 78: 1022 – 1026.
- Anderson, C.D. and H.L. Barnett. 1957. Variation in germination of isolates of *Phytophthora infestans*. *Am. Potato Journ.* 34, 56. New Brunswick, N.J., USA.
- Andrivon, D. 1995. Biology, ecology and epidemiology of potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* 85: 1053-1056.
- Apple, A. E., and Fry, W. E. 1983. Diseases of Potato , Potato late blight *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary . In : Vegetable crops published by the New York State Agricultural Experiment Station. USA.
- Aragones, A.M. 1984. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Control de plagas de plantas y animales. Vol.1 . Limusa. México. 1-5, 123-130, 204-207 pp.
- Barr, D.J.S. 1983. The zoosporic grouping of plant pathogens – Entity or non entity. In: Zoosporic Plant Pathogens, A Modern Prespective. Buczaki, S.T. Editor. Academic Press. 352 pp.
- Barnes, L. W. 1994. The role of plant clinics in diseases diagnosis and education. A North American Perspective. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 601-609.

- Bartnicki-García, S., and Wang, M.C. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In. *Phytophthora : Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. Erwin, D.C., Bartnicki-García, S., and Tsao, P.H. Editores. APS PRESS. USA. 121-137 pp.
- Bauer, L.I. 1991. Fitpatología. Noriega Limusa. México. 9-11, 26-29, 44-49 pp.
- Beakes, G.W., Burr, A.W., Wood, S.E., y Hardham, A. R. 1995. The application of spore surface features in defining taxonomic versus ecological grouping in Oomycete fungi. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 73 supplement 1. S701-S7011.
- Bimpong, C.E., and Clerk, G.C. 1970. Motility and chemotaxis in zoospores of *Phytophthora palmivora* (Butl.). *Butl. Ann. Bot.* 34: 617-624.
- Bourke, A. 1991. Potato late blight in Europe in 1845; the scientific controversy. En: *Phytophthora infestans*. Lucas, J.A., Shuttock, R.C., Shaw, D.S. R. Editores. Cambridge Univ. Press. Cambridge, U.K. 12-24 pp.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248- 254.
- Brasier, C..M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: Genetic system, sexuality and the germination of variation. *Annu. Rev. Phytopathology*. 30: 153-171. Palo Alto California, USA.
- Cantino, E.C. and G.F. Turian. 1959. Physiology and development of lower fungi (Phycomycetes). *Annu. Rev. Microbiol.* 13:97-124. California, USA.
- Caten, C.E.1970. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. II Pathogenic variation. *Can. J. Bot.* 48: 897-905. Canada
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1993. Informe anual 10-14 pp.
- Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.
- Clinton, G.P. 1911. Oospores of potato blight, *Science* 33: 744-47. USA.
- Cohen, Y., Farkash, S., Reshit, Z., and Baider, A. 1997. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology* 87: 191-196.
- Crisp. S.J., y M.J. Dunn, 1994. Detection of proteins on protein blots using chemiluminescent systems. In: *Methods in molecular biology*, vol. 32.

Basic protein and peptide protocols. J.M. Walter, Human Press Inc. USA. 233-237 pp.

- Daggett, S.S. and E. Gotz. 1991. *Phytophthora infestans* in Eastern Germany from 1976-1990: analysis of mating type, allozyme phenotype, and metalaxyl sensitivity. *Phytopathology* 81: 1180-1181. St. Paul, Mn., USA.
- Deahl, K. 1996. Life history of the fungus. In: North American potato late blight workshop. Tucson, Arizona. USA. 30-33 pp.
- Draper, M.A *et al* ., 1994. Leaf Blight Diseases of potato . Extension Service, North Dakota State University of Agriculture and Applied Science and U.S departament of Agriculture Cooperating. 1084 pp.
- Duvauchelle, S., y Andrivon, D. 1999. El mildiu y su agente *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. En: La patata. Rousselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J. C. Editores. Ed. Mundi-Prensa. España. 289-296 pp.
- Erselius, L. j., y C. Vallavicille, 1984. Variation in protein profiles of *Phytophthora*: comparison of six species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83 (3):463-472.
- Erwin, D.C., and O. K. Ribeiro, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minesota. USA. xi-xii, 3-7, 9-18, 25-26, 30-44, 50-54, 60-66, 84-85, 92, 346-353 pp.
- Flewelling, F. 1996. What the growers needs. En: North American Potato Late Blight Workshop. Tucson, Arizona. USA. 18-21 pp.
- Flores Olivas, A. 1999. Manejo integrado de tizón tardío en papas. En: Memorias del IX Congreso Nacional de Productores de Papa. León Guanajuato México.
- Flores- Olivas, A., Martínez- Soriano, J.P., y Martínez- Espinoza, A. D. 1997. Uso de nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *Fitopatología* 32(2): 11-96.
- Franc, G.D. 1996. Potato late blight management through cultural practices in: North American potato late blight workshop. Tucson, Arizona. USA. pp 61-64.
- Fry, W.E. 1975. Integrated effects of polygenic resistance and a protective fungicide on delopement of potato late blight. *Phytopathology* 65: 908-911.
- Fry, W.E., Apple, A. E., y Bruhn, J.A. 1983. Evaluation of potato late blight forecasts modified to incorporate host resistance and fungicide weathering. *Phytopathology*. 73: 1054- 1059.

- Fry, W. E., Goodwin, S.B., 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 Dis.* 77:653-661
- Fry, W.E., A. Drenth, J.L. Spielman, B.C. Mantel, L.C. Davidse and S.B. Goodwin. 1991. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology* 81: 1330-1336. St. Paul, Mn., USA.
- Fry, W.E., P.W. Tooley and L.J. Spielman. 1989. The importance of the perfect stage of *Phytophthora infestans* from the standpoint of epidemiology and adaptation. In: *Fungal Diseases of the Potato Report of the Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato*. Held at CIP, Lima, September 21-25, 1987.
- Galindo, J. 1958. Razas fisiológicas de *Phytophthora infestans* (Mont) DBY. Memoria del Primer Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología, celebrado del 15 al 21 de noviembre de 1958 en la Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- Galindo A.J. y M.E. Gallegly. 1958. Sexualidad en *Phytophthora infestans*. II Grupos de compatibilidad, Grados sexuales y determinación del sexo. Memoria del primer Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología, celebrado del 15 al 21 de noviembre de 1958 en la Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- Galindo A.J. and M.E. Gallegly. 1960. The Nature of Sexuality in *Phytophthora infestans* *Phytopathology* 50: 123-128. St. Paul, Mn., USA.
- Galindo. A.J. y S. Romero C. 1958. Sexualidad en *Phytophthora infestans* I. Grupos sexuales complementarios, oosporas en la naturaleza y heterotalismo. Memoria del Primer Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología, celebrado del 15 al 21 de noviembre de 1958 en la Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- Gallegly, M.E. and J.J. Eichenmuller. 1959. The spontaneous appearance of the potato race 4 character in cultures of *Phytophthora infestans*. *Am. Potato Journ.* 36, 45-51. New Brunswick, N.J., USA.
- Gallegly, M.E. and Galindo. 1957. The sexual stage of *Phytophthora infestans* in México. *Am. Potato Journ.* 34: 58 New Brunswick, N.J., USA.
- Gallegly, M.E. and Galindo. 1958. Mating Types and Oospores of *Phytophthora infestans* in nature in México. *Phytopathology* 48: 274-277. St. Paul, Mn., USA.
- Giddings, N.J. and A. Berg. 1919. A comparison of late blight of tomato and potato. A preliminary report. *Phytopathology* 9: 209-210. St. Paul, Mn., USA.

- Gregory, P.H. 1983. Some major epidemics caused by *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Erwin, D.C. Bartnicki-García, S., and Tsao, P.H. Editores. APS, PRESS.USA. 109-119 pp.
- Goodwin, S.B., L.J. Spielman, J.M., Matuszak, S.N. Bergeron and W.E. Fry. 1992. Clonal Diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central México. *Phytopathology* 82:955-961. St. Paul, Mn., USA.
- Goodwin S.B; Brak A.Cohen, Kenneth L. Deahl, and William E. Fry. 1994 Migration from Northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the united states and Canada. *Phytopathology* 84:553-558.
- Goodwin, S.B., Cohen, B.A., and Fry, W.E.1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish Potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11591-11595.
- Goodwin, S.B., and Drenth, A. 1997. Origin of the A2 Mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology*. Vol. 8, N° 10:992-999.
- Gough, F.J. J.J. Smoot, H.A. Lamey and J.J. Eichenmuller. 1957. Germination of oospores of *Phytophthora* Am. Potato Journ. 34, 58. NEW Brunswick, N.J., USA.
- Graham, K., y Sebastian Romero Cova. 1958. Sexualidad en *Phytophthora infestans* (Mont) de By. III. Homotalismo y su discusión. Memoria del Primer Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología, celebrado del 15 al 21 de noviembre de 1958 en la Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- Griffith, G.W., Snell, R., and Shaw, D.S. 1995. Late blight (*Phytophthora infestans*) on tomato in the tropics. *The mycologist.* 9: 87-89.
- Grogan, R.G. 1981. The science and art of plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:333.
- Grunwald, N.J., Rubio-Covarrubias, O.A., and Fry, W.E. 2000. Potato late-blight management in the Toluca Valley: Forecasts and resistant cultivars. *Plant Dis.* 84:410-416.
- Hemmes, D.E. 1983. Cytology of *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. Erwin, D.C., Bartnicki - García, S., y Tsao, P.H. Editores. APS PRESS. USA. 9-40 pp.

- Holh, H.R. 1991. Nutrition in *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Advances in Plant Pathology. Eds. D .S. Ingram y P.H. William. Academic Press. Pp 53-84. San Diego, CA, USA.
- Holh, H.R. and K. Iselin. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. Transactions of the British Mycological Society 83, 529-531. Great Britain.
- Holliday, P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University. 354-355 pp
- Hooker, W. J. 1990. Compendium of Potato Diseases. APS PRESS. USA. 1-4, 40-42 pp.
- Howatt, J.L. and P.N. Grainer. 1955. Some new findings concerning *Phytophthora infestans* (Mont) de By. American Potato Journal. 32: 180-188. New Brunswick, N.J, USA.
- Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: Evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. J. Gen. Microbiol. 107:15-18.
- Ko, W. H., and R. K. Kunimoto, 1981. Hormone production and reception among different isolates of *Phytophthora parasitica* and *P. palmivora*. Mycology. 73:440-444.
- Kruger, N. J. 1994. The Bradford Method for Protein Quantitation. Capítulo 3. In: Methods in Molecular Biology, vol. 32. Basic protein and peptide protocols. Walker, J. M. Editor. Humana Press. USA. 9-15 pp.
- Landegren, U., R. Kaiser, C. T. Caskey, and L. Hood. 1988. DNA diagnosis molecular techniques and automation. Science 242: 229-237.
- Leach, S.S and A.E. Rich. 1969. The posible role of parasexuality and cytoplasmic variation in race differentiation in *Phytophthora infestans*. Phytopathol. 59: 1360-1365. St. Paul, Mn., USA.
- Lewin, B. 1994. Genes V. Oxford University Press and Cell Press. New York. p. 81-106
- Malcolmson, J.F. 1970. Vegetative hybridity in *Phytophthora infestans*. Nature (London) 225: 971-972.
- McDonald, B.A. 1989. The population biology of host-pathogen interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 27:77-94. Palo Alto, California, USA.
- Michelmore, R. W and S.H. Hulbert. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 25. 383-404.

- Miller, S. A. and R. R. Martin. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 409-432.
- Miller, S.A. 1996. Detecting plant pathogenic fungi. In: *Advances in Botanical Research*. De Boer, H. S., Tommerup, C. I., Andrews, H. J., y Callow, A. J. Editores. 23: 74-102.
- Mills, W. R. and L. C. Peterson. 1952. The development of races of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary on potato hybrids. (Abstr.) *Phytopathol* 42:26. St Paul, Mn., USA.
- Mosa, A.A., K. Kobayashi and A. Ogoshi. 1993. Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathology*, 42:26-34.
- Niederhauser, J.S. and J. Cervantes. 1959. Anita, Bertita y Cochita, three new blight-resistant potato varieties developed in central México. *Am. Potato Journ.* 36, 301. New Brunswick, N.J., USA.
- Niederhauser, J.S. 1991. *Phytophthora infestans*: The Mexican Connection. Pp. 25-45. In: *Phytophthora* Eds. J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw, and L.R. Cooke. Cambridge University Press, Cambridge.
- Niederhauser, J.S. 1993. International cooperation in potato research and development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:1-21. Palo Alto, California, USA.
- Ramos C.P 1991 Diagnóstico sobre el Cultivo de la Papa (*Solanum tuberosum*) en el área de influencia de la UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Reddick, D. 1943. Development of blight immune varieties. *Am. Potato Journ.* 20, 118-126. New Brunswick, N.J., USA.
- Ritch, D.L. 1990. The nuclear DNA content, mating type and metalaxyl sensitivity of fifty three isolates of *Phytophthora infestans* from Poland. *Phytopathology* 80: 123. St. Paul, Mn., USA.
- Ritch, D.L. 1991. *Phytophthora infestans* in Poland from 1987-1989. Nuclear DNA content, mating type and response to metalaxyl. *Phytopathology* 81: 1190. St. Paul, Mn., USA.
- Robertson, N.F. 1991. The challenge of *Phytophthora infestans*. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Eds. D.S. Ingram and P.H. Williams. *Advances in Plant Pathology*, Vol. 7. Academic Press. Pp. 1-30. San Diego, CA, USA.
- Rocha, R.R. 1985 Guía para cultivar papa en el bajío. SARH, INIA, CIAB, CAEB Celaya Guanajuato, México. Pp 14

- Romero, C.S. 1988. Hongos Fitopatógenos . Universidad Autónoma Chapingo. México. 19, 64-65, 74-79 pp.
- Romero, S., y Erwin, D. C. 1969. Variation in pathogenicity among single oospore cultures of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 59: 1310-1317.
- Rosell, D.F., y E.H. White. 1978. *Methods enzymol.* 57: 409. (citado en Tijssen, 1993).
- Shaad, N. W., S.S. Cheong, S. Tamaki, E. Hatziloukas, and N. J. Panopoulos. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Shattock, R.C., D.S. Shaw, A.M. Fyfe, J.R. Dunn, K.H. Loney and J.A. Shattock. 1990. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988: mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. *Plant Pathology* 39, 242-248. Oxford, Great Britain.
- Shaw, D. S. 1991. Genetics. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Eds. D.S. Ingram and P.H. Williams. *Advances in Plant Pathology* Vol. 7 Academic Press pp. 131-170. San Diego, CA, USA.
- Smoot, J.J., F.J. Gough, H.A. Lamey, J.J. Eichenmuller, and M.E. Gallegly. 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathol.* 48: 165-171. St. Paul, Mn., USA.
- Smoot, J.J., F.J. Gough and M.E. Gallegly. 1957. Oospore formation in *Phytophthora infestans* (Abstr) *Phytopathol.* 47:33. St. Paul, Mn., USA.
- Spielman, L.J., W.K. Gu and W.E. Fry. 1990. Genetic relationships among *Phytophthora infestans* populations from Europe, North America and Japan. (Abstract) *Phytopathology* 80:1006. St. Paul, Mn., USA.
- Spielman, L. J., B. J., McMaster, and W. E Fry., 1989. Dominance and recessiveness at loci for virulence against potato and tomato in *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* 77:832-838.
- Stack, J. P., and Millar, R.L. 1985. Relative survival potential of propagules of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Phytopathology*. 75: 1398-1404.
- Staub, T., H. Dahmen, P. Urech and F. Schwinn. 1979. Failure to select for in vivo *Phytophthora infestans* to acylalanine fungicides. *Plant Dis. Rep.* 63, 385-389. St. Paul, Mn., USA.

- Streets, R. B. SR. 1969. The diagnosis of plant diseases. Coop. Ext. Serv., Agric. Exp. Stn., Univ. Arizona, Tucson. 134 p.
- Sujkowsky, L.S. 1991. Variability in virulence and the race concept in *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Acta Mycol.* 25: 145-157.
- Sujkowsky, L.S., S.B. Goodwin, A.T. Dyer, and W.E. Fry. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84: 201-207. St. Paul, Mn., USA.
- Therrien, C.D., D.L. Ritch, L.C. Davidse, B.K. Jespers and L.J. Spielman. 1989. Nuclear DNA content, mating type and metalaxyl sensitivity of eighty- three isolates of *Phytophthora infestans* from Netherlands. *Mycol. Res.* 92: 140-146.
- Therrien, C.D., and S.S. Daggett. 1990. Mating type, nuclear DNA content and isozyme composition of thirty- three isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. (Abstract) *Phytopathology* 80: 124. St. Paul, Mn., USA.
- Tijssen, P. 1993. Practice and theory of enzyme immunoassays. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol.15 Burdon, R.H., y V. Knippenberg, P.H. General editors. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Tivoli, B., y Bedin, P. 1999. Enfermedades fúngicas. En: La patata. Rousselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. Editores. Ed. Mundi-Prensa. España. 286-289 pp.
- Tooley, P. W., W.E. Fry, and Villarreal-Gonzalez, M.J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *J. Heredity* 76, 431-435.
- Tooley, P. W., Sweigard, J. A., and Fry, W. E. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Phytopathology* 76: 1209-1212.
- Tucker, C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. *Univ. Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 153-207 pp. (Citado por Erwin y Ribeiro, 1996).
- Van der Plank, J.E. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press. New York, USA.
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Pap. UK.* 22-92 pp.
- Weingartner, P. 1996. Identification of late blight and *Phytophthora infestans*. In: North American Potato Late Blight Workshop. Tucson, Arizona. USA. 22-25.

## PAGINAS WEB CONSULTADAS

[www.ppathw3.cals.cornell.edu/fry/protocols.htm](http://www.ppathw3.cals.cornell.edu/fry/protocols.htm)

[www.gene.com/ac/wn/su/greatfamine.html](http://www.gene.com/ac/wn/su/greatfamine.html).