

INCIDENCIA DE RAZAS FISIOLÓGICAS Y GENOTIPOS DE *Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO

Claudia Rocío Belmar-Díaz¹; Héctor Lozoya-Saldaña^{2*}

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas. Independencia Poniente s/n. El Cerrillo, Tlacholaya, Estado de México, MÉXICO. C.P. 50200.

²Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. km 38.5 Carretera México- Texcoco. Chapingo, Estado de México, MÉXICO. C.P. 56230.

Correo-e: picti87@gmail.com (*Autor para correspondencia).

RESUMEN

El tizón tardío de la papa y del jitomate (*Phytophthora infestans*) muestra consistentemente una gran diversidad genética en el valle de Toluca, México, mayormente debido a su reproducción sexual. Las razas fisiológicas se identifican comúnmente con plantas hospederas diferenciales, mientras que los genotipos son determinados por marcadores moleculares. El objetivo de este estudio trata sobre la incidencia de razas del patógeno del tizón tardío relacionada con la caracterización molecular, para identificar una posible conciliación de los dos conceptos (raza-genotipo). En 2006 y 2007 se obtuvieron aislamientos de hospederas diferenciales expuestas a la infección natural en campo. La secuencia de la incidencia de las razas en los ciclos de cultivo de los dos años fue similar. Las primeras en infectarse fueron las indicadoras con genes de susceptibilidad múltiple ($R_{1,2,3,4}$; $R_{1,2,3}$; $R_{2,3,4}$), y las razas 9, 5 y 2 fueron las últimas en mostrar lesiones. La proporción de los grupos de compatibilidad fue inconsistente a lo largo de los ciclos de cultivo. El genotipo 86/100; 100/100; A2 (GPI; PEP; grupo de compatibilidad) se identificó con mayor frecuencia (20 % de la población, equivalente al CDA 3 en la clasificación de EUA), seguido por 100/100; 100/100; A2 (19 % en 2006 y 13 % en 2007, US 13). Aún más, este genotipo fue el único asociado con las razas R_5 y R_8 en 2006 y con R_8 en 2007. La relación raza-genotipo fue limitada porque no coincidieron en los dos años del estudio. Se concluye que raza y genotipo son conceptos independientes.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Epidemiología, variabilidad genética.

INCIDENCE OF PHYSIOLOGICAL RACES AND GENOTYPES OF *Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY IN THE TOLUCA VALLEY, MÉXICO

ABSTRACT

Potato and tomato late blight (*Phytophthora infestans*) consistently shows great genetic diversity in the Toluca Valley, Mexico, mostly because of its sexual reproduction. Physiological races are commonly identified with differential host plants, while genotypes are determined by molecular markers. The objective of this study deals with the incidence of races of the late blight pathogen related to molecular characterization, to identify a possible conciliation of the two concepts (race-genotype). In 2006 and 2007, isolates of the pathogen were obtained from differential hosts exposed to natural infection in the field. Sequence of incidence of the races along the growth cycle in both years was similar. The indicator host plants with multiple susceptibility genes ($R_{1,2,3,4}$; $R_{1,2,3}$; $R_{2,3,4}$) were the first ones to become infected, and the ones for races 9, 5 and 2 were the last ones in showing lesions. Mating type ratio was inconsistent along the growing cycles. Genotype 86/100; 100/100; A2 (GPI; PEP; mating type), was the most frequently identified (20% of the population, equivalent to CDA 3 in the US classification), followed by 100/100; 100/100; A2 (19 % in 2006 and 13 % in 2007, US-13). Furthermore, this genotype was the only one associated with races R_5 and R_8 in 2006 and with R_8 in 2007. The race-genotype link was limited, for they did not match in the two years of the study. We conclude that race and genotype are independent concepts.

ADDITIONAL KEYWORDS: Epidemiology, genetic variability.

INTRODUCCIÓN

El tizón tardío (*Phytophthora infestans* [Mont.] de Bary) es la enfermedad más devastadora de papa y tomate en el mundo, y la mayor variabilidad de las razas fisiológicas de este oomiceto se presenta en el Valle de Toluca del altiplano mexicano (Goodwin, 1996). Esto es debido a las progenies derivadas sexualmente como consecuencia de la proporción 1:1 de los grupos de compatibilidad A1:A2 que se presenta en el valle (Flier *et al.*, 2003; Galindo y Gallegly, 1960; Grünwald y Flier, 2005; Rivera-Peña, 1995). En 1953 se reportó un juego de plantas diferenciales de papa para identificar los genes de virulencia de las razas patogénicas de *P. infestans* (Black *et al.*, 1953), pero descripciones moleculares recientes han reemplazado el concepto de razas por el de genotipos y se han sugerido otras clasificaciones (Goodwin *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Forbes *et al.*, 1998). No obstante, estas variaciones no han sido reportadas en una población sexual. Además, por muchos años se ha sabido que todas las razas están presentes en Toluca en cada ciclo de cultivo, pero no hay reportes en relación a las secuencias específicas o frecuencias. El objetivo del presente estudio fue dar seguimiento a la incidencia de *P. infestans* en el Valle de Toluca, mediante la determinación de secuencia y frecuencia de aparición de las razas, identificando genotipos y buscando una posible conciliación entre los dos conceptos (raza-genotipo), para identificarlos independientemente del sistema seguido.

MATERIALES Y MÉTODOS

A mediados de junio en 2006 y 2007, se establecieron 15 plantas de cada uno de los hospedantes diferenciales para las razas fisiológicas de *P. infestans* (cortesía del Banco de Germoplasma del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, USDA, de Sturgeon Bay, WI, EUA) bajo condiciones de campo y de temporal en la estación experimental ICAMEX-PICTIPAPA-INIFAP en el Valle de Toluca, México. Se expusieron las plantas a la infección natural del oomiceto sin la protección de fungicidas. Se hicieron lecturas semanales de la infección foliar (escala de Henfling, 1987) y se obtuvieron aislamientos de *P. infestans* de lesiones simples que se cultivaron en un medio de centeno agar (Grünwald *et al.*, 2001). Considerando que las fechas exactas entre los dos años no fueron coincidentes, por razones prácticas de comparación el tiempo se identificó en términos de semanas de lectura, empezando con la primera semana de agosto. Los grupos de compatibilidad y los perfiles aloenzimáticos de glucosa fosfato isomerasa (GPI) y peptidasa (PEP) se caracterizaron siguiendo la metodología reportada por Goodwin *et al.* (1995), y Grünwald *et al.* (2001). La relación entre subpoblaciones se estableció de acuerdo a las distancias genéticas de los agrupamientos a través de una matriz binaria de datos, agrupando a las razas de *P. infestans* por el método de pares de grupos no ponderados con aritmética (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic, UPGMA, por sus siglas en inglés), y por el coeficiente de similitud de Jaccard en el programa estadístico NTSYS 2.2.

INTRODUCTION

Late blight (*Phytophthora infestans* [Mont.] de Bary) is the most devastating disease of potato and tomato worldwide, and the highest variability of the physiological races of the oomycete is present at the Toluca Valley of the Mexican highlands (Goodwin, 1996). This is so due to the sexually derived progenies as a consequence of the 1:1 A1:A2 mating type ratio present in the valley (Flier *et al.*, 2003; Galindo and Gallegly, 1960; Grünwald and Flier, 2005; Rivera-Peña, 1995). In 1953 a set of differential potato host plants was reported to identify the virulence genes of the pathogenic races of *P. infestans* (Black *et al.*, 1953), but recent molecular descriptions have replaced the concept of races by that of genotypes, suggesting other classifications (Goodwin *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Forbes *et al.*, 1998). In fact, a number of studies show that within one clonal, asexual lineage, there is a lot of race diversity (Forbes *et al.*, 1998). Nevertheless, these variations have not been reported in a sexual population. In addition, for many years it has been known that all races are present in Toluca every growing season, but there are no reports regarding specific sequences or frequencies. The objective of the present study was to follow up the incidence of *P. infestans* in the Valley, by determining the sequence and frequency of appearance of the races, identifying genotypes, and searching for a possible conciliation between the two concepts (race-genotype), as to identify them regardless of the system followed.

MATERIALS AND METHODS

In mid June, 2006 and 2007, a set of 15 plants each of the potato differential hosts for the physiological races of *P. infestans* (courtesy of the USDA germplasm bank, Sturgeon Bay, WI, USA) were established under field conditions in a rainfed regime in the ICAMEX-PICTAPAPA-INIFAP experiment station, in the Toluca Valley, Mexico. The plants were exposed to natural infection of the oomycete without protection of fungicides. Weekly readings of the foliar infection were recorded (Henfling's scale, 1987), and isolates of *P. infestans* from single lesions were obtained and grown in a rye-agar medium (Grünwald *et al.*, 2001). Considering that the exact dates between the two years were not coincident, for practical comparison purposes time was identified in terms of reading weeks, starting with the first week in August. Mating types and aloenzymatic profiles of glucose phosphate isomerase (GPI) and peptidase (PEP), were characterized following the methodology reported by Goodwin *et al.*, (1995) and Grünwald *et al.*, (2001). The relationship between subpopulations was established according to the estimator of the genetic distances of the groupings through a binary matrix of data, grouping the races of *P. infestans* by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) and the Jaccard coefficient of similarity in the statistical program NTSYS 2.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTS AND DISCUSSION

Razas

La secuencia de incidencia de las razas fue muy similar en ambos años, empezando con la infección de hospedantes diferenciales con múltiples genes de susceptibilidad ($R_{1,2,3,4}$; $R_{1,2,3}$; $R_{2,3,4}$). Estas plantas murieron por el tizón tardío a la mitad del ciclo de cultivo. Por otro lado, las razas fisiológicas que se presentaron al final del ciclo fueron las de los genes de virulencia 9, 5 y 2 (Figura 1). El hecho de

Races

The sequence of incidence of the races was very similar in both years, starting with the infection of differential hosts with multiple susceptibility genes ($R_{1,2,3,4}$; $R_{1,2,3}$; $R_{2,3,4}$). These plants died to late blight halfway through the cycle. On the other hand, the physiological races that appeared at the end of the growing season were those with the virulence genes 9, 5 and 2 (Figure 1). The fact

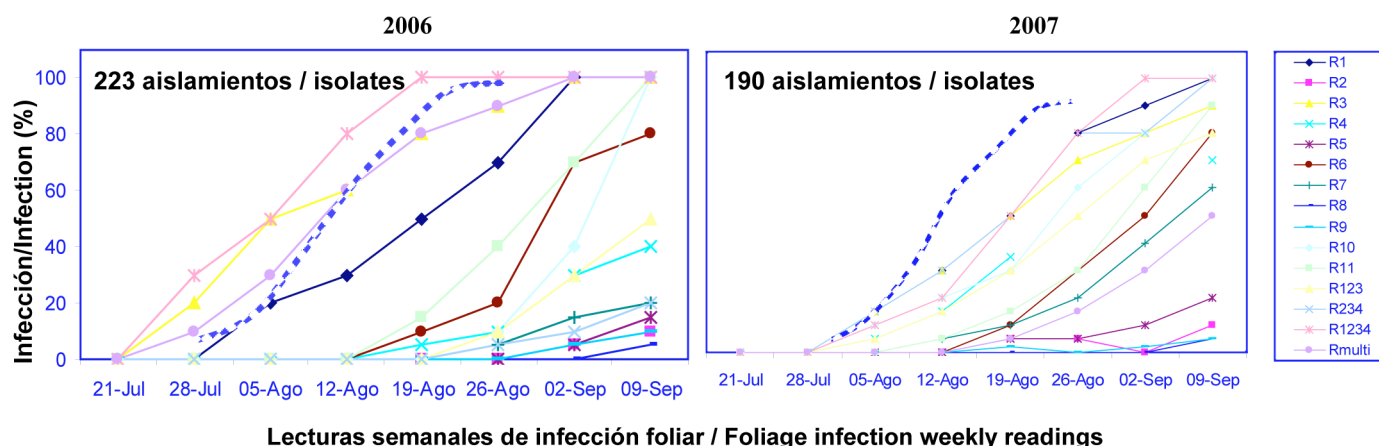


FIGURA 1. Curva de progreso de la enfermedad del tizón tardío. Secuencia de la incidencia de aparición y severidad de las razas patogénicas de *P. infestans* durante los dos ciclos de cultivo. La curva no identificada corresponde a la variedad Alpha, como referencia susceptible.

FIGURE 1. Late blight disease progress curve. Sequence of incidence and severity of the physiological races of *P. infestans* during the two crop cycles. The unidentified curve corresponds to the variety Alpha, as susceptible reference.

que razas múltiples aparecieran en secuencias similares en los dos años del estudio demuestra la consistencia y uniformidad de esta incidencia, así como la persistente y prevaiente variabilidad del patógeno en el Valle de Toluca. La identificación de razas en la década de 1950 se hizo en orden progresivo de aparición, lo que concuerda con las observaciones presentes, excepto por la raza 2, que no se presentó temprano en la epidemia. La relación genética entre subpoblaciones fue muy cercana entre las razas 1 y 11 en los dos años (Figura 2). Se observó lo mismo con las razas 5 y 8, pero sólo el primer año, pues al siguiente se separaron por aproximadamente un 10 %. Otras razas relacionadas genéticamente que mantuvieron sus distancias fueron la 7, la 12 ($R_{1,2,3}$) y la 6.

La continua variabilidad del oomiceto en el valle es un reto en la obtención de variedades de papa con resistencia genética durable. Esta resistencia se rompe por las múltiples razas existentes o emergentes del patógeno, mayormente derivadas sexualmente. Tal plasticidad genética es un requerimiento para la diversidad de *P. infestans* (McDonald y Linde, 2002), y es mayor que la generada por reproducción asexual (Galindo y Gallegly, 1960; Goodwin *et al.*, 1994; Tooley *et al.*, 1986). La variabilidad podría ser de origen trisómico con rearrreglos cromosomales que conducen a mapas de ligamientos de alta densidad, con alto

that multiple races show up in similar sequences in the two years of the study demonstrates the consistency and uniformity of this incidence, as well as the persistent and prevailing variability of the pathogen in the Toluca valley. The identification of races in the 1950's was made in progressive order of appearance, which concurs with the present observations, except for race 2, which did not appear early in the epidemic. Genetic relationship among subpopulations was very close between races 1 and 11 in the two years (Figure 2). The same was observed with races 5 and 8, but only the first year, as in the following year they were separated by approximately 10 %. Other genetically related races that maintained their distancing were 7, 12 ($R_{1,2,3}$) and 6.

Continuous variability of the oomycete in the valley is a challenge for the generation of potato varieties with durable genetic resistance. This resistance is broken by the existing and/or emerging multiple races of the pathogen, mostly sexually derived. Such genetic plasticity is a requirement for the *P. infestans* diversity (McDonald and Linde, 2002) and is greater than that generated by asexual reproduction (Galindo and Gallegly, 1960; Goodwin *et al.*, 1994; Tooley *et al.*, 1986). Variability may be of trisomic origin with chromosomal rearrangements that lead to high density ligaments maps, with a high degree of genomic

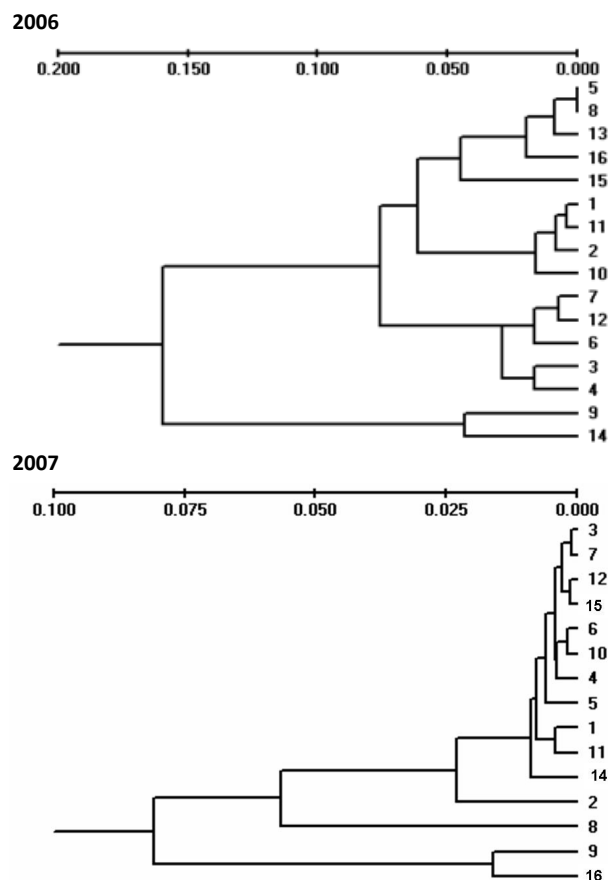


FIGURA 2. Relación entre subpoblaciones bajo la estimación de distancias genéticas de los agrupamientos, de acuerdo al análisis estadístico con el método de pares de grupos no ponderados con aritmética (Unweighted Pair Group Method with Arithmetics, UPGMA, por sus siglas en inglés), y por el coeficiente de similitud de Jaccard en el programa estadístico NTSYS 2.2. El número de identificación de la raza es como en el Cuadro 1.

FIGURE 2. Relationship among subpopulations under the estimator of the genetic distances of the groupings, according to the statistical analysis with the method UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) with the Jaccard coefficient of similarity in the statistical program NTSYS 2.2. Race identity number as in Table 1.

grado de flexibilidad genómica y, consecuentemente, con el surgimiento de las razas (Van der Lee *et al.*, 2004).

Grupos de compatibilidad

La proporción de los grupos de compatibilidad varió a lo largo de cada ciclo (Cuadro 1). No obstante, predominó el A2. En 2006, la proporción A1: A2 fue de 1:1.7 (79 aislamientos de A1 y 134 de A2), y en 2007 fue de 1:1.4 (79:111, Figura 3). Las razas no se identificaron específicamente con algún grupo de compatibilidad en particular (A1 o A2). Ambos tipos estuvieron presentes a lo largo de los dos ciclos en todas las razas, aunque en diferentes proporciones, sin ninguna relación específica de raza-tipo de compatibilidad, ni del tipo en el tiempo. El grupo de compatibilidad en *P. infestans* está determinado por un locus simple con segregaciones más o menos consistentes con progenies autofértiles a

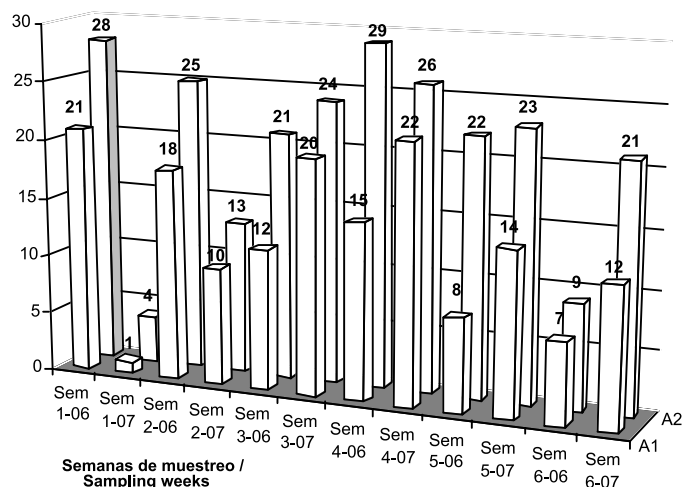


FIGURA 3. Número de aislamientos de cada grupo de compatibilidad por muestreo (Sem: semana 1, 2, 3, etc. 06 y 07, año 2006 y 2007, respectivamente) del total de la población en los dos años.

FIGURE 3. Number of isolates of each mating type per sampling (Sem: Week 1,2,3.) of the total of the population in the two years (2006 and 2007).

flexibility, and consequently, the emergence of the races (Van der Lee *et al.*, 2004).

Mating types

Mating type ratio varied throughout the cycle (Table 1). However, A2 predominated. In 2006 the A1: A2 ratio was 1:1.7 (79 isolates of A1, and 134 of A2), and in 2007 it was 1:1.4 (79:111, Figure 3). Races were not specifically identified with any particular mating group (A1, A2). Both types were present throughout the two cycles in all races, although in different ratio, without any specific relationship of race-mating type, nor of type in time. The mating type in *P. infestans* is determined by a simple locus with segregations more or less consistent with autofertile progenies, through the synthesis of a mating hormone (α -1) which induces the formation of oospores, but this does not explain their ratio (Harutyunyan *et al.*, 2008; Judelson, 1996).

Genotypes

The multilocus genotypes (MG) were ordered the same way both years, it is, every genotype kept the same identity number in both cycles. Twenty genotypes were found in 2006 (Table 2), and 29 in 2007 (Table 3). All of them were numbered from one to 31, although # 9 and # 10 from 2006 were not present in 2007. Genotype 6 was identified with the highest frequency the first year (20 % of the total of the population), but was fifth in 2007, with similar frequency to genotype 1 (7%), whereas genotype 2, which was second in 2006 (19 %), was first in 2007 with 13 %, whose presence being the most consistent in both years. Genotype 1 was third in frequency the first year (11%), and fifth the second year (7 %). Genotype 5 remained in fourth place both years,

CUADRO 1. Secuencia de aparición y proporción A1:A2 a lo largo de los ciclos.

TABLE 1. Sequence of appearance and A1:A2 ratio throughout the cycles.

NR (*)	R	Semana 1 / Week 1		Semana 2 / Week 2		Semana 3 / Week 3		Semana 4 / Week 4		Semana 5 / Week 5		Semana 6 / Week 6	
		06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07
1	R ₁	1:0.5		1:0.9	1:2	1:1	1:0.5	1:1	1:0.6	1:1	1:0	1:0	
2	R ₂						0:1		1:0	1:1			
3	R ₃			1:1	1:0.3	0:1		0:1	1:1		1:1		1:0.5
4	R ₄	1:0.6		1:2	1:0.5	1:1.5	1:3	0:1	1:0	0:1	0:1		1:0
5	R ₅	1:0.7					1:1.5	0:1		0:1	1:0		0:1
6	R ₆					1:2	1:0.5	1:0.6	1:1	0:1	1:1		1:2
7	R ₇				1:2	0:1	1:0	0:1	0:1	0:1	1:0		1:0
8	R ₈							0:1	1:0	0:1			
9	R ₉						0:1				0:1	1:0	
10	R ₁₀			1:1	1:0	1:0.5	1:1	1:0.6	1:0.5	1:1	1:0.5		
11	R ₁₁			1:1	1:0.5	1:0	1:1	1:0.5	1:0.5	1:1	1:0.2		1:1
12	R _{1,2,3}		1:1		1:1		1:2		1:2		1:0.5		1:1
13	R _{1,2,4}	1:0.7						0:1		0:1		1:1	
14	R _{1,3,4}							0:1		0:1		0:1	
15	R _{2,3,4}		1:0		0:1	1:2	1:0.5	1:0.2	1:2	1:1	1:0.5	1:0	1:1
16	R _{1,2,3,4}	1:0.7	1:0	1:0.7	1:0		1:1		1:0.6		1:2		1:0
	R _{MU}						0:1	1:0		1:1	0:1	0:1	1:1

NR: Número de raza como se identifica en la Figura 2. 06, 07, años 2006 y 2007.

(*) Race number as identified in Figure 2. 06, 07, years 2006 and 2007.

CUADRO 2. Genotipos Multilocus (GM) identificados en toda la población de los aislamientos de *P. infestans* en 2006.TABLE 2. Multilocus genotypes (MG) in the population of the isolates of *P. infestans* in 2006.

GM / MG	GPI	PEP	GC / MT	US #	f
1	100/100	100/100	A1	6.4	0.11
2	100/100	100/100	A2	13	0.19
3	100/122	100/100	A1	17	0.04
4	100/122	100/100	A2	14	0.03
5	86/100	100/100	A1	1.1	0.08
6	86/100	100/100	A2	CDA 3	0.2
7	86/122	100/100	A1	---	0.04
8	86/86	100/100	A1	---	0.009
9	83/86	100/100	A1	---	0.004
10	83/100	100/100	A2	CDA 3	0.004
11	122/122	100/100	A1	---	0.04
12	122/122	100/100	A2	---	0.05
13	100/100	92/100	A2	15	0.01
14	100/100	96/100	A1	1.7	0.01
15	100/122	92/100	A2	---	0.05
16	100/122	96/100	A2	---	0.01
17	86/100	92/100	A1	1	0.009
18	86/100	96/100	A1	---	0.01
19	86/100	96/100	A2	---	0.02
20	86/86	96/100	A2	---	0.004

GPI: glucosa-fosfo-isomerasa; PEP: peptidasa; GC: grupo de compatibilidad; US#: tipo US; f: frecuencia de aparición (% del total).

GPI: glucose-phosphate-isomerase; PEP: peptidase; MT: mating type; US#: US type; f: frequency of appearance (% of the total).

través de la síntesis de una hormona de apareamiento (α -1), que induce la formación de oosporas, pero esto no explica su proporción (Harutyunyan *et al.*, 2008; Judelson, 1996).

Genotipos

Los genotipos multilocus (MG) se ordenaron de la misma manera en ambos años: cada genotipo mantuvo

and 15, which was fifth in 2006, did not figure among the most frequent ones the following year. Similarly, MG 3 and 4, which were the second and third most abundant in 2007, did not figure among the first five the previous year. Thus, the most frequent multilocus genotypes the two years were 2, 1, 6, and 5, which had also been reported previously as in a high frequency (Grünwald *et al.*, 2001). Genotypes 9 and 10 of 2006 did not appear in 2007 (Tables 2, 3).

CUADRO 3. Genotipos Multilocus (GM) identificados en toda la población de los aislamientos de *P. infestans* en 2007.**TABLE 3. Multilocus genotypes (MG) in the population of the isolates of *P. infestans* in 2007.**

GM / MG	GPI	PEP	GC / MT	US #	f
1	100/100	100/100	A1	6.4	0.07
2	100/100	100/100	A2	13	0.13
3	100/122	100/100	A1	17	0.1
4	100/122	100/100	A2	14	0.11
5	86/100	100/100	A1	1.1	0.08
6	86/100	100/100	A2	CDA 3	0.07
7	86/122	100/100	A2	---	0.06
8	86/86	100/100	A1	---	0.005
11	122/122	100/100	A1	---	0.005
12	122/122	100/100	A2	---	0.02
13	100/100	92/100	A2	15	0.01
14	100/100	96/100	A1	1.7	0.03
15	100/122	92/100	A2	---	0.02
16	100/122	96/100	A2	---	0.03
17	86/100	92/100	A1	1	0.01
18	86/100	96/100	A1	---	0.02
19	86/100	96/100	A2	---	0.02
20	86/86	96/100	A2	---	0.005
21	100/100	92/100	A1	5	0.01
22	100/100	96/100	A2	---	0.05
23	100/111	100/100	A2	7	0.005
24	100/122	96/100	A1	---	0.01
25	122/122	92/100	A2	---	0.005
26	86/122	100/100	A1	---	0.03
27	86/122	92/100	A2	---	0.005
28	86/122	92/100	A1	---	0.01
29	86/122	96/100	A1	---	0.01
30	86/86	100/100	A2	---	0.005
31	90/100	100/100	A2	---	0.005

GPI: glucosa-fosfato-isomerasa; PEP: peptidasa; GC: grupo de compatibilidad; US#: tipo US; f: frecuencia de aparición (% del total).

GPI: glucose-phosphate-isomerase; PEP: peptidase; MT: mating type; US#: US type; f: frequency of appearance (% of the total).

CUADRO 4. Secuencia de aparición de los genotipos.**TABLE 4. Sequence of appearance of the genotypes.**

	Genotipos 2006 (Cuadro 2) / Genotypes 2006 (Table 2)	Genotipos 2007 (Cuadro 3) / Genotypes 2007 (Table 3)
Semana 1 / Week 1	1,2,5,6,3,7,11,12,13,15,16	4, 6*, 7*, 12*, 29
Semana 2 / Week 2	1,2,5,6,3,4,7,11,12,13,15,16,17,20	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 12*, 14, 16*, 18, 22, 24, 26
Semana 3 / Week 3	1,2,5,6,4,7,8,11,12,15,19	1*, 2*, 3, 4*, 5*, 6*, 7*, 8*, 14, 15*, 16, 18, 20, 22, 29
Semana 4 / Week 4	1,2,5,6,3,4,7,8,9,10,11,12,18,19	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 11*, 12*, 13, 14, 15, 18*, 19*, 22, 25, 26
Semana 5 / Week 5	1,2,5,6,4,12,14,15,18,19	1*, 2*, 3, 4*, 5*, 6*, 7, 12*, 14*, 16, 17, 19*, 21, 22, 23, 26, 27, 30, 31
Semana 6 / Week 6	1,2,5,11,14,18	1*, 2*, 3, 4, 5*, 6, 7, 16, 17, 18*, 22, 24, 28, 31

* Repetición de genotipos en ambos años.

* Repeating genotypes the second year.

el mismo número de identidad en ambos ciclos. Se encontraron 20 genotipos en 2006 (Cuadro 2), y 29 en 2007 (Cuadro 3). Todos se numeraron del uno al 31, aunque los genotipos 9 y 10 de 2006 no se presentaron en 2007. Se identificó al genotipo 6 con la mayor frecuencia el primer año (20 % del total de la población), pero fue el quinto en 2007, con frecuencia similar al genotipo 1 (7 %), mientras que el genotipo 2, que fue el segundo en 2006 (19 %), fue el primero en 2007 con 13 %, cuya presencia fue la más consistente en ambos años. El genotipo 1 fue el tercero en

During the two years of the study, the classification of the genotypes was made according to previous ordering on the basis of the complexity and sequence of appearance of the profiles, which sometimes also coincided with their frequency (Table 4). In general, the first genotypes of tables 2 and 3 were also the first ones to appear (genotypes 1 to 7, Table 4), and the last of the classification of tables 2 and 3 also appeared at the end of the cycle. In the first sampling there were few genotypes because there were also just few isolates (data not shown), early at the onset of the epidemic.

CUADRO 5. Genotipos incluidos dentro de cada raza de *P. infestans* durante los dos ciclos de cultivo.TABLE 5. Genotypes included within each race of *P. infestans* during two crop cycles.

RAZA / RACE	GENOTIPO 2006 / GENOTYPE 2006	GENOTIPO 2007 / GENOTYPE 2007
R ₁	2,5,6,7	1, 2*, 3, 5*, 7*, 13, 16, 18, 19, 23
R ₂	1.6	2, 3
R ₃	2,7,12,15,16,17	2*, 3, 4, 5, 6, 7*, 16*, 18, 21, 26
R ₄	4,6,11,12,15	1, 2, 4*, 5, 6*, 16, 18, 26
R ₅	2	1, 3, 4, 8, 14, 15, 16
R ₆	1,6,7,10,11,12	1*, 2, 3, 4, 6*, 7*, 14, 16, 22, 26, 28
R ₇	2,6,12	2*, 3, 4, 20, 24, 26, 30
R ₈	2	2*
R ₉	14,18	5
R ₁₀	1,3,5,6,9,19,20	1*, 2, 3*, 4, 5*, 6*, 12, 14, 17, 22, 27, 29
R ₁₁	1,3,5,6,8	1*, 2, 3*, 4, 5*, 6*, 12, 13, 14, 16, 18, 22
R ₁₂₃		1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 22, 24, 26, 28,29
R ₁₂₄	2,6,11,12	Sin plantas en el campo
R ₁₃₄	2.6	Sin plantas en el campo
R ₂₃₄	1,18,19	2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 22, 26, 31
R ₁₂₃₄	1,2,3,12,13	1*, 3*, 4, 5, 6, 15, 16, 18, 19, 25
Rmulti	1,2,14	4, 5

*Repetición de genotipos en ambos años.

*.- Repeating genotypes in both years.

frecuencia el primer año (11 %) y quinto al año siguiente (7 %). El genotipo 5 permaneció en cuarto lugar en ambos años, mientras que el genotipo 15, que fue el quinto en 2006, no figuró entre los más frecuentes al siguiente año. De igual manera, MG 3 y MG 4, que fueron el segundo y tercero más abundantes en 2007, no figuraron entre los primeros cinco el año previo. Por lo tanto, los genotipos multilocus más frecuentes en los dos años fueron el 2, 6 y 5, que había sido previamente reportado como de alta frecuencia (Grünwald *et al.*, 2001).

Durante los dos años del estudio, la clasificación de los genotipos se hizo acorde a un ordenamiento previo con base en la complejidad y secuencia de aparición de los perfiles, lo cual a veces coincidió con su frecuencia (Cuadro 4). En general, los primeros genotipos de los Cuadros 2 y 3 también fueron los primeros en aparecer (genotipos 1 al 7, Cuadro 4), y los últimos de la clasificación de los Cuadros 2 y 3 también se presentaron hasta el final del ciclo. En el primer muestreo había pocos genotipos porque también había pocos aislamientos al inicio de la epidemia (datos no incluidos). Algo similar se presentó al final, con menos genotipos que los que hubo a la mitad del ciclo, debido a que muchas plantas ya habían muerto por tizón. Sin tejido vivo disponible en el campo no se pudieron obtener aislamientos. Es importante recalcar que el genotipo 20 se identificó sólo en el segundo muestreo de 2006 y en el tercero de 2007, y no se observó nuevamente en muestreos posteriores en ambos años. En 2007, con la excepción del genotipo 29, que se obtuvo en la primera semana, los genotipos “nuevos” identificados ese año y ausentes en 2006,

The same occurred at the end, with fewer genotypes than halfway through the cycle, because many plants had already died to blight, and without live tissue available in the field isolates could not be obtained. It is important to point out that genotype 20 was identified only in the second sampling of 2006 and in the third of 2007, and was not observed again in later samplings in both years. In 2007, with the exception of genotype 29, which was obtained the first week, the “new” genotypes identified in that year and absent in 2006, also appeared in chronological sequence, as genotypes 22, 24 and 26 were obtained in the second sampling, while 30 and 31 were only identified in the two final dates (Table 4).

Races vs genotypes

The genotypes identified within each race were repeated from one year to the next with a frequency that was lower than expected. From R₁ three of the four genotypes of 2006 were repeated (genotypes 2, 5 and 7, Table 5), but there were seven new genotypes for 2007; the same occurred with R₃, where three of the six previous genotypes were repeated and there were seven new ones. Of R₄ only two of five were repeated, and so on successively (Table 5). In races R₂, R₅, R₉, R_{2,3,4}, and R multi, the genotypes were completely different in the two years. Considering the higher amount of genotypes the second year and their differences with respect to the first year (20 in 2006 against 29 in 2007, if it is considered that in the second year, of the 31 recorded, 9 and 10 did not appear, Table 3), segregation is demonstrated, and it is independent of the two concepts (race-genotype).

también aparecieron en secuencia cronológica, como los genotipos 22, 24 y 26, que se obtuvieron en el segundo muestreo, mientras que el 30 y el 31 se identificaron en las últimas dos fechas (Cuadro 4).

Razas vs genotipos

Los genotipos identificados dentro de cada raza se repitieron de un año al otro con una frecuencia más baja de lo esperado. De la R_1 en el 2007 se repitieron tres de los cuatro genotipos del 2006 (G 2, G 5, y G 7, Cuadro 5), pero hubo siete nuevos genotipos para el 2007; lo mismo ocurrió con la R_3 , donde tres de los seis genotipos previos se repitieron, y hubo siete nuevos. En la R_4 sólo dos de los cinco se repitieron, y así sucesivamente (Cuadro 5). En las razas R_2 , R_5 , R_9 , $R_{2,3,4}$, y R multi, los genotipos fueron completamente diferentes en los dos años. Considerando la mayor cantidad de genotipos el segundo año y sus diferencias respecto del primero, se demuestra la segregación que es independiente de los dos conceptos que nos ocupan: raza y genotipo (se identificaron 20 genotipos en 2006 y 29 en 2007, pero si se toma en cuenta que en el segundo año, de los 31 registrados, el G 9 y el G 10 no aparecieron [Cuadro 3]).

Discusión general

Las razas fisiológicas de *P. infestans* en el Valle de Toluca (altiplano mexicano) estuvieron presentes continuamente infectando a las plantas hospedantes diferenciales durante la época de lluvias, y su gran amplitud de variabilidad genética no permite altas frecuencias. Si solamente se observa el parámetro de raza, casi cada aislamiento podría ser una de por sí en el altiplano del centro de México (Rivera-Peña, 1995), mientras que si se considera al genotipo, su frecuencia podría ser más baja, aproximadamente uno de cada diez aislamientos en México (Goodwin *et al.*, 2001, 56 genotipos de 572 aislamientos) o diferentes, pero igualmente de baja frecuencia también en otras partes del mundo (Blandón-Díaz *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2009). No obstante, los estudios previos no consideran la secuencia de aparición de las razas, ni la dinámica de las proporciones de los grupos de compatibilidad a lo largo del ciclo, ni la presencia de genotipos en años consecutivos. Otro punto importante que surge de los resultados del presente estudio es la coincidencia de algunos genotipos identificados en este trabajo con los reportados en el sistema US en Norteamérica. Este hecho respalda la idea de la migración desde México y la recombinación de variantes de *P. infestans* hacia esta región (Grünwald *et al.*, 1998) así como a otras partes del mundo (Guo *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

La presencia de las razas patógenas de *P. infestans* en el Valle de Toluca fue continua y similar durante los dos ciclos de cultivo en estudio. La incidencia de genotipos se

General discussion

Physiological races of *P. infestans* in the Toluca Valley (Mexican highlands) were continuously present by infecting differential host plants during the rainy season, and their wide genetic variability does not allow high frequencies. If only the parameter of race is observed, nearly every isolate may be a race or its own in the highlands of central México (Rivera-Peña, 1995), whereas when genotype is considered, its frequency could be lower, approximately one in ten isolates in México (Grünwald *et al.*, 2001, 56 genotypes of 572 isolates) or different, but low frequency as well, in other parts of the world (Blandón-Díaz *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2009). However, previous studies do not consider the sequence of appearance of races, nor the dynamic of the proportions of mating types throughout the cycle, nor the presence of genotypes in consecutive years. Another important point emerging from our results is the coincidence of some genotypes found in the present work with those reported under the US system in North America. This fact supports the idea of the migration from México and recombination of the variants of *P. infestans* towards this region (Goodwin *et al.*, 1998) as well as to other parts of the world (Guo *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

The presence of the pathogenic races of *P. infestans* in the valley of Toluca was continuous along the rainy seasons and constant and similar during the two years of the study. The genotypes incidence was randomly present in a high number of variants. Races varied independently from genotypes and from mating types. The concepts of race and genotype are independent.

End of English Version

presentó al azar en un alto número de variantes. Las razas variaron independientemente de los genotipos y de los grupos de compatibilidad. Los conceptos de raza y genotipo son independientes.

LITERATURA CITADA

- BLACK, W.; MASTENBROEK, C.; MILLS, W. R.; 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(3): 173-179. doi: 10.1007/BF00053724
- BLANDÓN-DÍAZ, J. U.; WIDMARK, A. K.; HANNUKKALA, A.; ANDERSON, B.; HÖGBERG, N.; YUEN, J. E. 2012. Phenotypic variation within a clonal lineage of *Phytophthora infestans* infecting both tomato and potato in Nicaragua. *Phytopathology* 102(3): 323-330. doi: 10.1094/PHYTO-02-11-0033.
- FLIER, W. G.; GRÜNWARD, N. J.; KROON, L. P.; STURBAUM, A. K.; VAN DEN BOSCH, T. B.; GARAY-SERRANO, E.; LOZOYA-SALDAÑA, H.; FRY, W. E.; TURKENSTEEN, L. J. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of Central México suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* 93(4): 382-390. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.4.382
- FORBES, G. A.; GOODWIN, S. B.; DRENTH, A.; OYARZUN, P.; ORDOÑEZ, M. E. 1998. A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 82(7): 811-818. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.7.811
- GALINDO, A.; GALLEGLY, M. E. 1960. The nature of sexuality of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50: 123-128.
- GOODWIN, S. B. 1996. Origin and ecology of *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14(2): 143-147.
- GOODWIN, S. B.; COHEN, B. A.; DEAHL, K. L.; FRY, W. E. 1994. Migration from northern México was the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84(6): 553-558. doi: 10.1094/Phyto-84-553
- GOODWIN, S. B.; SCHNEIDER, R. E.; FRY, W. E. 1995. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 79(11): 1181-1185. doi: 10.1094/PD-79-1181
- GOODWIN, S. B.; SMART, C. D.; SANDROCK, R. W.; DEAHL, K. L.; PUNJA, Z. K.; FRY, W. E. 1998. Genetic changes within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: role of migration and recombination. *Phytopathology* 88(9): 939-949. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.9.939
- GRÜNWARD, N. J.; FLIER, W. C.; STURBAUM, A. K.; GARAY-SERRANO, E.; VAN DE BOSCH, T. B. M.; SMART, C. D.; MATUSZAK, J. M.; LOZOYA-SALDAÑA, H.; TURKENSTEEN, L. J.; FRY, W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley region of central México. *Phytopathology* 91(9): 882-890. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.882
- GRÜNWARD, N. J.; FLIER, W. G. 2005. The Biology of *Phytophthora infestans* at its Center of Origin. *Annual Review of Phytopathology* 43: 171-190. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906
- GUO, L.; ZHU, X. Q.; HU, C. H.; RISTAINO, J. B. 2010. Genetic structure of *Phytophthora infestans* populations in China indicates multiple migration events. *Phytopathology* 100(10): 997-1006. doi: 10.1094/PHYTO-05-09-0126.
- HARUTYUNYAN, S. R.; ZHAO, Z.; DEN HARTOG, T.; BOUWMEESTER, K.; MINNAARD, A. J.; FERINGA, B. L.; GOVERS, F. 2008. Biologically active *Phytophthora* mating hormone prepared by catalytic asymmetric total synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(25): 8507-8512. doi: 10.1073/pnas.0709289105
- HENFLING, J. W. 1987. Late Blight of Potato. Technical Information Bulletin no. 4, International Potato Center, Lima, Perú. 25 p. <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/TIBen4979.pdf>
- JUDELSON, H. S. 1996. Genetic and physical variability at the mating type locus of the Oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 144(3): 1005-1013. <http://www.genetics.org/content/144/3/1005.full.pdf+html>
- MC DONALD, B. A.; LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40(1): 349-379. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443
- RIVERA-PEÑA, A. 1995. Racial composition in a population of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Toluca Valley and slopes of the volcano Nevado de Toluca over the period 1989-1994, pp 116-121. In: *Phytophthora infestans* 150. ed. DOWLEY, L. J.; BANNON, E.; COOKE, L. R.; KEANE, T.; AND O'SULLIVAN, E. Dublin, Ireland. Boole Press Ltd & Teagasc.
- TOOLEY, P. W.; SWEIGARD, J. A.; FRY, W. E. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Phytopathology* 76(11): 1209-1213. doi: 10.1094/Phyto-76-1209.
- VAN DER LEE, T.; TESTA, A.; ROBOLD, A.; VAN'T KLOOSTER, J.; GOVERS, F. 2004. High-density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements. *Genetics* 167(4): 1643-1661. doi: 10.1534/genetics.104.029652
- VARGAS, A. M.; QUEZADA O., L. M.; CÉSPEDES, M. C.; CARRERO, N.; GONZÁLEZ, A.; ROJAS, A.; ZULUAGA, A. P.; MYERS, K.; FRY, W. E.; JIMÉNEZ, P.; BERNAL, A. J.; RESTREPO, S. 2009. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Colombia: First report of the A2 mating type. *Phytopathology* 99(1): 82-88. doi: 10.1094/PHYTO-99-1-0082