

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary. I. HOST-PATHOGEN SPECIFICITY AND RESISTANCE COMPONENTS

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary. I. ESPECIFICIDAD HOSPEDERO-PATÓGENO Y COMPONENTES DE RESISTENCIA

Héctor Lozoya-Saldaña¹, Leonel Guzmán-Galindo², Sylvia Fernández-Pavía³,
Niklaus J. Grünwald⁴, and Elaine McElhinny⁵

¹Departamento de Fitotecnia. ²Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (lozoya@correo.chapingo.mx). ³Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tarímbaro, Michoacán. ⁴U. S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. 3420 NW Orchard Avenue, Corvallis, OR 97330, USA. ⁵College of Agriculture and Plant Sciences. Cornell University. 14853. Ithaca, N. Y. USA.

ABSTRACT

The molecular identity of *Phytophthora infestans* strains infecting potatoes in the Toluca Valley has been documented. Nevertheless, the relationship of the *P. infestans* genotypes to the host's genetic resistance is unclear. In order to identify potential host-pathogen specificity, isolates of the oomycete obtained from five potato varieties with differing levels of disease resistance were compared regarding mating type (MT), isozyme genotype for glucose-6-phosphate isomerase (Gpi) and peptidase (Pep), and sensitivity to metalaxyl. Also, host resistance components and specificity on the host-pathogen interaction were assessed twice in detached leaves in the laboratory and once in attached leaves in the greenhouse for three of the varieties. No mating type predominated relative to host genetic resistance (frequency of A1:A2; Alpha, susceptible: 1:1.6; Rosita, resistant: 1:0.75; Norteña, resistant: 1:0.9; Monserrat, resistant: 1:2; Michoacán, resistant: 1:0.20). Eighteen MT-isozyme combinations were identified from 97 isolates. All of them have been previously reported. The most common multilocus genotypes (MT, Gpi, and Pep) were A1, 86/100, 100/100 (37% of the whole population) and A2, 86/100, 100/100 (14%). Both genotypes represented 66% of the *P. infestans* population obtained from cvs. Michoacán and Monserrat. The level of metalaxyl sensitivity was lower relative to the levels reported in previous studies. A relationship between frequency of pathogen genotypes and level of host genetic resistance was not observed. The isolate from Rosita was the most aggressive. It resulted in the largest lesion area in the laboratory and in the greenhouse, and showed the highest sporulation in the greenhouse. The isolate from Alpha, which showed the highest sporulation in the laboratory, was second in sporulation under greenhouse conditions. Aggressiveness was higher in isolates obtained from resistant varieties and only limited host-pathogen specificity was observed in cvs. Alpha and Rosita. Suppression of lesion area and sporulation were the host resistance components identified only for the variety Norteña.

RESUMEN

La identidad molecular de aislamientos de *Phytophthora infestans* que infectan a la papa en el valle de Toluca, México, está documentada. No obstante, la relación de los genotipos de *P. infestans* con la resistencia genética del hospedante es incierta. Para identificar la potencial especificidad hospedero-patógeno, a cepas del oomiceto obtenidas de cinco variedades de papa con diferentes niveles de resistencia se les comparó respecto a su tipo de cruzamiento (TC), el genotipo para las isoenzimas glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi) y peptidasa (Pep), y su sensibilidad al metalaxil. También se evaluó la identidad de los componentes de resistencia del hospedante y la especificidad en la interacción hospedero-patógeno dos veces en hojas desprendidas en el laboratorio y una vez en hojas adheridas en el invernadero en tres de las variedades. No predominó algún tipo de cruzamiento en relación con el grado de resistencia genética de los hospedantes (frecuencia A1:A2; Alpha, susceptible: 1:1.6; Rosita, resistente: 1:0.75; Norteña, resistente: 1:0.9; Monserrat, resistente: 1:2; Michoacán, resistente: 1:0.20). Se identificaron 18 combinaciones de TC-isoenzimas de 97 aislamientos. Todos han sido previamente reportados. Los genotipos multilocus más comunes (TC, Gpi, Pep) fueron A1, 86/100, 100/100 (37% de la población total) y A2, 86/100, 100/100 (14%), que representaron 66% de la población de *P. infestans* obtenida de las variedades Michoacán y Monserrat. El grado de sensibilidad al metalaxil fue más bajo con respecto a estudios previos. No se encontró relación entre la frecuencia de genotipos del patógeno y el nivel de resistencia genética del hospedante. El aislamiento de Rosita fue el más agresivo, induciendo la mayor área foliar dañada, en laboratorio e invernadero, así como la mayor esporulación en invernadero. El aislamiento de Alpha, que produjo la mayor cantidad de esporangios en el laboratorio, fue el segundo en este aspecto en el invernadero. Hubo mayor agresividad de los aislamientos de las variedades resistentes y se observó limitada especificidad hospedero-patógeno en Alpha y Rosita. La supresión en el área de la lesión y en la esporulación fueron los componentes de resistencia del hospedante identificados solamente para la variedad Norteña.

Recibido: Enero, 2005. Aprobado: Octubre, 2005.

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 40: 205-217. 2006.

Key words: Compatibility, isozymes, metalaxyl resistance, genetic resistance, host-pathogen specificity.

INTRODUCTION

The potato and tomato late blight pathogen (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) (*P. i.*) is heterothallic (A1 and A2 mating types). Both types are present in a ratio close to 1:1 in the Toluca Valley of México. In this area the oomycete produces sexually derived progenies with a great genetic diversity. Almost every isolate is unique (Goodwin *et al.*, 1992; Tooley *et al.*, 1985) or one in every ten (Flier *et al.*, 2003; Grünwald *et al.*, 2001), depending on the variables observed. Metalaxyl is an acylalanine fungicide widely used against oomycetes, but subject to developing resistant strains (Thompson, 1985), and because of this, such resistance is also considered an additional variable for *P. i.* characterization (Kato *et al.*, 1997; Matuszak *et al.*, 1994), with high variability among *P. i.* populations from the Toluca Valley (Deahl *et al.*, 1995; Matuszak *et al.*, 1994). In other studies most of the isolates were sensitive (Grünwald *et al.*, 2001). These variables characterize the pathogen by region or by agroecological area, but do not relate specific *P. i.* genotypes to specific hosts or to the level of resistance of the crop.

Every genetically derived host factor that reduces the severity of the disease is considered a host resistance component, such as efficiency of infection, number and size of lesions, latent period or time between infection and sporulation, and sporulation capacity (number of sporangia in a given time and/or area). These variables are useful to measure the pathogenic fitness of the oomycete as well as the level of the host resistance (Birham and Sing, 1995; Kato *et al.*, 1997; Mizubuti and Fry, 1998; Tooley *et al.*, 1986). The importance of each element depends on the conditions of the assays as well as the cultivars and host species involved (Cañizales and Forbes, 1995; Colon *et al.*, 1995; Oijen, 1992). These studies did not consider the pathogen factor (origin, variability, and host/pathogen specificity of the isolate) that may alter the resistance components of the host in the field. It is not clear whether specific *P. i.* strains from a particular potato variety are more suited to the plants from which they were isolated or other host genotypes are equally or differently infected, or if the pathogen aggressiveness is linked to the genetic resistance of the host from which it was obtained. Previous reports on characterization of *P. i.* included large geographical areas or specific habitats, but the identity of the strains in relation to specific hosts plant is unclear.

Our paper deals with the study of *P. i.* isolated from potato varieties of known resistance to the pathogen (the

Palabras clave: Compatibilidad, isoenzimas, resistencia a metalaxil, resistencia genética, especificidad hospedero-patógeno.

INTRODUCCIÓN

El patógeno (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) (*P. i.*) del tizón tardío de la papa y el jitomate es heterotálico (tipos de compatibilidad A1 y A2). Ambos se presentan en una proporción cercana a 1:1 en el valle de Toluca, México. En esta área el oomiceto produce progenies derivadas sexualmente y con gran diversidad genética. Casi cada aislamiento es único (Goodwin *et al.*, 1992; Tooley *et al.*, 1985) o uno de cada diez (Flier *et al.*, 2003; Grünwald *et al.*, 2001), dependiendo de las variables observadas. Metalaxil es un fungicida de acilalanina ampliamente usado contra oomicetos, pero sujeto a desarrollar variantes resistentes (Thompson, 1985), y debido a esto, se considera a dicha resistencia como una variable adicional para caracterizar a *P. i.* (Kato *et al.*, 1997; Matuszak *et al.*, 1994), con alta variabilidad en poblaciones de *P. i.* del valle de Toluca (Deahl *et al.*, 1995; Matuszak *et al.*, 1994). En otros estudios la mayoría de los aislamientos fueron sensibles (Grünwald *et al.*, 2001). Estas variables caracterizan al patógeno por región o por área agroecológica, pero no relacionan a genotipos específicos de *P. i.* con hospedantes específicos o con el grado de resistencia del cultivo.

Cada factor genético derivado del hospedante que reduce la severidad de la enfermedad es considerado un componente de resistencia, como la eficiencia de la infección, número y tamaño de lesiones, período latente o lapso entre infección y esporulación, y capacidad esporulante (número de esporangios por tiempo o área). Estas variables son útiles para medir la adaptabilidad patogénica del oomiceto, así como el nivel de resistencia del hospedero (Birham y Sing, 1995; Kato *et al.*, 1997; Mizubuty y Fry, 1998; Tooley *et al.*, 1986). La importancia de cada elemento depende de las condiciones de los ensayos, así como de las variedades y las especies de plantas involucradas (Cañizales y Forbes, 1985; Colon *et al.*, 1995; Oijen, 1992). Estos estudios no consideraron al factor patógeno (origen, variabilidad y la especificidad hospedero/patógeno del aislamiento) que pudiera alterar los componentes de resistencia del hospedante en el campo. No está claro si variantes específicas de *P. i.* obtenidas de una variedad de papa en particular se adaptan mejor a las plantas de donde se aislaron, o si otros genotipos del hospedante son igual o diferentemente infectados, o si la agresividad del patógeno está ligada a la resistencia genética del hospedante del que se obtuvo. Reportes previos sobre caracterización de *P. i.* incluyeron grandes áreas geográficas o habitats específicos, pero no

infection took place under natural conditions in the Toluca Valley, México). The objectives were to: a) characterize the *P. i.* genotypes; b) identify host-pathogen specificity; c) clarify whether this specificity, if any, is or is not linked to the levels of resistance of the plant; d) assess incubation conditions (detached leaves in laboratory vs attached leaves in greenhouse) for identification of host resistance components, as potential tools for early plant genetic resistance detection.

MATERIALS AND METHODS

P. infestans was isolated from single foliage lesions by natural infection during the summer of 1998 in experimental plots in the Toluca Valley, where no fungicides were applied, and maintained on a modified rye agar medium (Grünwald *et al.*, 2001). The oomycete was collected from the varieties Alpha, susceptible (n=21); Rosita, resistant (n=21); Norteña, resistant (n=19); Monserrat, resistant (n=12); and Michoacán, resistant (n=23) (Grünwald *et al.*, 2002a; Flores-Gutierrez and Cadena-Hinojosa, 1996). Population characterization included the identification and analysis of:

- Mating type, identified by challenging the cultures to a previously known type (A1 or A2). After 15 d at room temperature the presence of oospores in the interconnecting mycelia zone indicated that the unknown isolate belonged to the opposite type of the one to which it was challenged (Daayf *et al.*, 2001). The probability of the distance from the 1:1 ratio was calculated with a chi-square analysis.
- Allozyme analysis, by multilocus genotype frequencies for glucose-6-phosphate isomerase (Gpi, EC 5.3.1.9.) and peptidase (Pep, EC 3.4.3.1), conducted on cellulose acetate gel electrophoresis (CAGE). *In vitro* grown micelia was macerated in 30 μL^{-1} of distilled water and centrifuged at 14 000 rpm for 1 min. The supernatant was placed in the middle of the CAGE plate (Titan III, Helena laboratories, Beaumont, TX) and exposed to 180 volts for 15 min for Pep and 20 min for Gpi, and stained according to Goodwin *et al.* (1995), Hebert and Beaton (1989), and Lozoya-Saldaña *et al.* (1997). The relationship among subpopulations was inferred with the estimation of the Roger's modified genetic distance. The A1 mating type was considered as heterozygote and A2 as homozygote (Grünwald *et al.*, 2001; Judelson, 1996).
- Sensitivity to metalaxyl, determined by plating the microorganism in rye-agar medium amended with 100, 10, 1, or 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the fungicide. After 10 d at 15 °C the average growth of two plates was estimated as percentage of the control, which was considered as 100% growth in absence of the fungicide.

Host resistance components

Isolates with high sporulation from the varieties Alpha (mating type, Gpi, Pep: A1, 86/86, 100/100), Rosita (A1, 86/100, 100/100), and Norteña (A1, 100/122, 100/100) were selected as inoculum for two trials of assessment resistance components in detached leaves in

queda clara la identidad de los aislamientos en relación con plantas hospedantes específicas.

El presente estudio es acerca *P. i.* aislados de variedades de papa de conocida resistencia al patógeno (de infecciones naturales del valle de Toluca, México), con los objetivos de: a) caracterizar los genotipos de *P. i.*; b) identificar la especificidad hospedero-patógeno; c) aclarar si esta especificidad, de haberla, está o no ligada al grado de resistencia de la planta; d) analizar las condiciones de incubación (hojas desprendidas en el laboratorio vs hojas adheridas a la planta en el invernadero) para identificar los componentes de resistencia del hospedante, como herramientas potenciales para detección temprana de resistencia genética de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aisló *P. infestans* de lesiones foliares simples por infección natural durante el verano de 1998 en lotes experimentales en el valle de Toluca, México, donde no se aplicaron fungicidas, y se mantuvieron en un medio modificado de centeno-agar (Grünwald *et al.*, 2001). El oomiceto se recolectó de las variedades Alpha, susceptible (n=21); Rosita, resistente (n=21); Norteña, resistente (n=19); Monserrat, resistente (n=12); y Michoacán, resistente (n=23) (Grünwald *et al.*, 2002a; Flores-Gutierrez y Cadena-Hinojosa, 1996). La caracterización de la población incluyó la identificación y análisis de:

- Tipo de cruzamiento, que se identificó al desafiar los cultivos con un tipo conocido (A1 o A2). Después de 15 d a temperatura ambiente, la presencia de oosporas en la zona de interconexión de micelios indicó que el aislamiento desconocido pertenecía al grupo opuesto al que se desafió (Daayf *et al.*, 2001). La probabilidad del alejamiento de la relación 1:1 se calculó con un análisis de Ji cuadrada.
- Análisis de aloenzimas, mediante frecuencias de genotipos multilocus para glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi, EC 5.3.1.9) y peptidasa (Pep, EC 3.4.3.1) en electroforesis de gel de acetato de celulosa (CAGE). El micelio crecido *in vitro* se maceró en 30 μL^{-1} de agua destilada y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min. El sobrenadante se colocó en medio de la placa de CAGE (Titan III, Helena Laboratorios, Beaumont, TX) y se expuso a 180 volts por 15 min para Pep y por 20 min para Gpi, y se tiñó de acuerdo con Goodwin *et al.* (1995), Hebert y Beaton (1989), y Lozoya-Saldaña *et al.* (1997). Se infirió la relación entre subpoblaciones con el estimador de distancia genética modificada de Roger. El tipo de cruzamiento A1 se consideró como heterocigote y el A2 como homocigote (Grünwald *et al.*, 2001; Judelson, 1996).
- Sensibilidad al metalaxil, determinada mediante la exposición del microorganismo a un medio de centeno-agar con 100, 10, 1, o 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del fungicida. Después de 10 d a 15 °C el crecimiento promedio de dos cajas se calculó como el porcentaje del testigo, cuyo crecimiento se consideró como el 100% en ausencia del fungicida.

the laboratory and one assay in attached leaves in the greenhouse. The three varieties were also considered as hosts to be infected with their own isolate (homologous) or with the strains obtained from the other varieties (heterologous), for nine combinations (3 isolates $\times$ 3 host varieties). Inoculum was prepared by growing it in detached leaves of the same varieties they were collected from, in moist chambers consisting of inverted 9 cm diameter Petri dishes with 0.8% water agar. After 7 d mycelia was transferred to rye agar medium and incubated for 10-14 d at room temperature (18 °C in darkness) also in 9 cm diameter Petri plates. Sporangial suspensions were adjusted to 10 000 sporangia mL^{-1} of distilled, sterile water, with a hemacytometer. The inoculum was exposed to 4°C for 2 h to induce zoospore differentiation prior to inoculation of the tissue for the assays. Six detached leaflets per inoculum/variety in the laboratory, abaxial side up, and two attached leaflets from three plants each in the greenhouse were inoculated with 20 μL^{-1} of the corresponding suspension. Droplets were removed with tissue paper 24 h after inoculation to prevent bacterial growth. In the laboratory, the detached leaflets were incubated in Petri plates at 18 °C, 14 h d^{-1} photoperiod and relative humidity (RH) close to 100% (Mizubuty and Fry, 1998; Colon *et al.*, 1995). In the greenhouse, the selected leaflets for inoculation were located at the third node of well developed leaves from the apex of the main stem down on eight week old plants in pots in tunnels, with sprayers in the benches, at 90-100% RH and 25-15 °C day/night temperature.

The variables quantified for the laboratory assays were: a) latent period, which was the time between inoculation and the differentiation of the first sporangia; b) inoculum efficiency, or capacity to colonize the inoculated tissue, measured as proportion of infected tissue over the inoculum suspension area; c) percentage of lesion area, measured 2 d after the sporangia were visible or before the most affected leaflet was completely covered by sporangia; this variable was obtained by cutting and photocopying both the whole leaflet and the lesion, and passing the paper copy through a leaf area reader Licor, LI13100; the data were double checked from the scanned images using ScionImage software (<http://www.scioncorp.com>); d) sporulation capacity, determined by immersing the infected tissue in 1 or 2 mL^{-1} water and vortexed for 15-30 s, depending on lesion size, immediately after tracing the lesion area (Mizubuty and Fry, 1998). The average of two hemacytometer counts per suspension-lesion was divided by the lesion area to obtain the final sporangia per unit area of lesion. Viability of sporangia was also assessed for the first trial in the laboratory. 40 μL^{-1} droplets of the sporangia suspension from the sporulation count were plated on 0.8% water agar at 12 °C for 24 h; 300 sporangia were examined for germination for each isolate-variety combination with no distinction between direct (germ tube) or indirect (zoospore) germination. The analysis of variance was a factorial combination of the three isolates by the three varieties, with six replicates per variable (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS AND DISCUSSION

Mating type and allozyme profiles

Eighteen multilocus *P. infestans* genotypes were identified (Table 1): Eight were from isolates

Componentes de resistencia del hospedante

Los aislamientos con alta esporulación de las variedades Alpha (tipo de cruzamiento, Gpi, Pep: A1, 86/86, 100/100), Rosita (A1, 86/100, 100/100) y Norteña (A1, 100/122, 100/100) se seleccionaron como inóculo para dos ensayos de análisis de componentes de resistencia en hojas desprendidas en laboratorio y uno en hojas adheridas a la planta en invernadero. Las mismas tres variedades fueron consideradas como hospedantes para inoculaciones con su propio aislamiento (homólogas) o con las variantes obtenidas de las otras variedades (heterólogas), para nueve combinaciones (3 aislamientos $\times$ 3 variedades del hospedante). El inóculo se preparó cultivándolo en hojas desprendidas de las mismas variedades de donde se recolectaron, en cámara húmeda consistente en cajas Petri (9 cm diámetro) invertidas, con 0.8% agua-agar. Después de siete d el micelio se transfirió a un medio de centeno-agar y se incubó por 10-14 d a temperatura ambiente (18 °C en oscuridad) también en cajas Petri (9 cm diámetro). La suspensión de esporangios se ajustó, con un hemacitómetro, a 10 000 esporangios mL^{-1} de agua destilada estéril. Se expuso al inóculo a 4 °C por 2 h para inducir la diferenciación de zoosporas antes de inocular al tejido para los ensayos. Se inocularon seis hojas desprendidas por inóculo/variedad en el laboratorio, con el envés hacia arriba, y dos hojas adheridas en cada una de tres plantas en el invernadero, con 20 μL^{-1} de la suspensión correspondiente. Las gotas se removieron con papel absorbente 24 h después de la inoculación para prevenir crecimiento bacteriano. En el laboratorio, las hojas desprendidas se incubaron en cajas Petri a 18 °C, con un fotoperiodo de 14 h d^{-1} y humedad relativa (HR) cercana al 100% (Mizubuty y Fry, 1998; Colon *et al.*, 1995). En el invernadero, los folíolos seleccionados para la inoculación se localizaron en el tercer nudo de hojas completamente desarrolladas, contadas del ápice del tallo principal hacia abajo, en plantas de ocho semanas, en macetas, en túneles, con aspersores en los bancales, a 90-100% HR y 25-15 °C de temperatura día/noche.

Las variables cuantificadas para los ensayos en el laboratorio fueron: a) periodo de latencia, que fue el lapso entre la inoculación y la diferenciación de los primeros esporangios; b) eficiencia del inóculo, o su capacidad para colonizar al tejido inoculado, medida como la proporción de tejido infectado sobre el área de la suspensión del inóculo; c) porcentaje de área lesionada, medida 2 d después de que los esporangios fueron visibles o antes de que el folíolo mas afectado se cubriera completamente de esporangios; esta variable se obtuvo cortando y fotocopiando al folíolo completo y a la lesión, pasando la copia por un medidor de área foliar Licor, LI13100; los datos de las imágenes se cotejaron por duplicado usando el programa ScionImage (<http://www.scioncorp.com>); d) capacidad de esporulación, determinada por inmersión del tejido infectado en 1 o 2 mL^{-1} de agua y agitado por 15-30 s, según el tamaño de la lesión, inmediatamente después de medir el área de la lesión (Mizubuty y Fry, 1998). El número de esporangios por unidad de área se obtuvo con el promedio de dos conteos en hemacitómetro por suspensión por lesión, dividido por el área afectada. También se analizó la viabilidad de los esporangios en el primer ensayo del laboratorio. Se colocaron gotas de 40 μL^{-1} de la suspensión de esporangios de los conteos en 0.8% de agua-agar a 12 °C por 24 h. Después se examinó la germinación de

Table 1. Number of multilocus *P. infestans* genotypes isolated per variety. MT, mating type; Gpi, glucose-6-phosphate isomerase; Pep, peptidase; A, Alpha; R, Rosita; N, Norteña; Mo, Monserrat; Mi, Michoacán.**Cuadro 1. Número de genotipos multilocus de *P. infestans* aislados por variedad. MT, tipo de cruzamiento; Gpi, glucosa-6-fosfato isomerasa; Pep, peptidasa; A, Alpha; R, Rosita; N, Norteña; Mo, Monserrat; Mi, Michoacán.**

Genotype	MT	Gpi	Pep	A n=21	R n=21	N n=19	Mo n=12	Mi n=24
1	A1	86/86	100/100	-	-	-	-	1
2	A1	86/100	100/100	6	6	5	3	16
3	A1	86/122	100/100	2	5	4	-	-
4	A1	100/100	100/100	-	-	1	-	3
5	A1	100/122	100/100	-	-	-	1	-
6	A1	122/122	100/100	-	1	-	-	-
7	A2	78/100	100/100	-	2	3	-	-
8	A2	78/122	100/100	-	1	-	-	-
9	A2	86/86	92/100	-	1	-	-	-
10	A2	86/86	96/100	2	-	-	-	-
11	A2	86/86	100/100	-	1	1	-	-
12	A2	86/100	92/100	1	1	-	-	-
13	A2	86/100	96/100	2	-	-	-	-
14	A2	86/100	100/100	1	1	1	8	2
15	A2	86/122	100/100	-	1	-	-	-
16	A2	100/100	100/100	2	-	-	-	2
17	A2	100/122	100/100	5	1	3	-	-
18	A2	122/122	100/100	-	-	1	-	-

n = Number of isolates per variety.

- = Not detected.

obtained from Alpha and Norteña, 11 from Rosita, five from Michoacán, and three from Monserrat. The most frequent genotypes within the subgroup from Alpha (n=21) were A1, 86/100, 100/100 (six isolates, 28.5% of the subgroup) and A2, 100/122, 100/100 (five isolates, 23.8%). Eight of these were A1 and 13 were A2, with a 1:1.6 ratio. There were also two predominant genotypes in the subgroup from Rosita (n=21): A1, 86/100, 100/100 (28.5%), and A2, 86/122, 100/100 (24%), with a A1:A2 ratio of 1:0.75. A1, 86/100, 100/100 was the most frequent (23%) in the subgroup from Norteña (n=19), followed by A1, 86/122, 100/100 (21%), with 1:0.9 A1:A2 ratio. Only three different *P. infestans* genotypes were observed within the 12 isolates from Monserrat, with a high predominance of A2, 86/100, 100/100 (67%) and a 1:2 A1:A2 ratio. Also, a high frequency of A1, 86/100, 100/100 (66%) was identified from the 24 isolates obtained from the variety Michoacán, with a 1:0.20 A1:A2 ratio. The *P. infestans* subpopulations from Rosita and Norteña were close to the 1:1 A1:A2 ratio, but the oomycete obtained from the other varieties was far from this ratio, with no specific trend. For instance, the A2 mating type was more frequent in the isolates from Alpha and Monserrat (0.619 and 0.667, susceptible and resistant), while A1 predominated in the *P. i.* population obtained from the cv. Michoacán, resistant (0.833). An average of 0.557:0.443 frequencies was estimated for A1:A2, in the entire population of this study (n=97, Table 2).

300 esporangios por cada combinación de aislamiento-variedad, sin distinguir entre germinación directa (tubo germinativo) o indirecta (zoospora). El análisis de varianza fue una combinación factorial de los tres aislamientos por las tres variedades, con seis repeticiones por variable (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tipo de cruzamiento y perfiles aloenzimáticos

Se identificaron 18 genotipos multilocus (Cuadro 1); ocho fueron de los aislamientos obtenidos de Alpha y Norteña, 11 de Rosita, cinco de Michoacán y tres de Monserrat. Dentro del subgrupo de Alpha (n=21) los genotipos mas frecuentes fueron A1, 86/100, 100/100 (seis aislamientos, 28.5% del subgrupo) y A2, 100/122, 100/100 (cinco aislamientos, 23.8%). Ocho fueron A1 y 13 fueron A2, en una relación 1:1.6. También hubo dos genotipos predominantes en el subgrupo de Rosita (n=21); A1, 86/100, 100/100 (28.5%), y A2, 86/122, 100/100 (24%), con una relación A1:A2 de 1:0.75. A1, 86/100, 100/100 fue el mas frecuente (23%) en el subgrupo de Norteña (n=19), seguido por A1, 86/122, 100/100 (21%), con proporción 1:0.9 de A1:A2. De los 12 aislamientos de Monserrat, se observaron sólo tres genotipos diferentes de *P. infestans*, con alta predominancia de A2, 86/100, 100/100 (67%) y una relación 1:2 de A1:A2. También se identificó alta frecuencia de A1, 86/100, 100/100 (66%) de los 24 aislamientos obtenidos de la variedad Michoacán, con proporción

Table 2. Frequency of mating type, glucose-6-phosphate isomerase (Gpi), and peptidase (Pep) alleles per variety.**Cuadro 2. Frecuencia de alelos por variedad por tipo de cruzamiento, glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi), y peptidasa (Pep).**

Variety	N	Mating type			Gpi								Pep		
		A1	A2	P>X ²	78/100	78/122	86/86	86/100	86/122	100/100	100/122	122/122	92/100	96/100	100/100
Alpha	21	0.381	0.619	0.28	-	-	0.095	0.476	0.095	0.095	0.238	-	0.047	0.190	0.762
Rosita	21	0.571	0.429	0.51	0.095	0.047	0.095	0.381	0.285	-	0.047	0.047	0.095	-	0.905
Norteña	19	0.526	0.474	0.82	0.158	-	0.052	0.315	0.210	0.052	0.158	0.052	-	-	1.000
Montserrat	12	0.333	0.667	0.25	-	-	-	0.917	-	-	0.083	-	-	-	1.000
Michoacán	24	0.833	0.167	0.00	-	-	0.041	0.750	-	0.208	-	-	-	-	1.000
Average		0.557	0.443	0.26	0.126	0.047	0.070	0.568	0.197	0.118	0.131	0.049	0.071	0.190	0.933

Host/pathogen specificity was observed in the *P. infestans* genotypes A2, 86/100, 100/100, and A1, 86/100, 100/100, both found in 66% of the isolates from the varieties Monserrat and Michoacán, respectively. It implies that Monserrat, which was more susceptible to the A2 mating group than to A1, may be exerting selection pressure for the rise of A2's, while the opposite could be happening for the variety Michoacán. The field resistance/susceptibility of the other varieties included in this study did not delimit any host specificity of the variants of the pathogen that attacked them. Alpha, susceptible, and Rosita and Norteña, resistant to the oomycete, hosted eight to eleven different *P. infestans* genotypes, four of which were common for the three varieties.

Genetic grouping

Roger's genetic distances identified three *P. infestans* subgroups (Figure 1). The first one comprised the strains obtained from Rosita and Norteña, with a similarity coefficient of 0.07 and an identity value of 0.989. The second included the pathogen populations obtained from Alpha and Monserrat, with a similarity coefficient also of 0.07 and an identity value of 0.993. The third was only for the isolates from Michoacán, which were more genetically distant from the rest, with a similarity coefficient of 0.11 and an identity value of 0.95. This subgrouping division is explained by the lack of specificity of most strains. The greater genetic distance of the subpopulation obtained from cv. Michoacán is due to the higher frequency (66%) of the most common genotype (A1, 86/100, 100/100) from this variety with respect to the rest of the isolates (Table 1).

Metalaxyl resistance

In the medium with 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the fungicide all the cultures grew, some of them almost as much as the control, such as those of the variety Michoacán. However, with the exception of the strains from this variety, general frequencies of growth decrease were

A1:A2 de 1:0.2. Las subpoblaciones de *P. infestans* de Rosita y Norteña fueron cercanas a 1:1 en la relación A1:A2, pero el oomiceto obtenido de las otras variedades estuvo alejado de esta proporción sin tendencia específica. Por ejemplo, el tipo de cruzamiento A2 fue más frecuente en los aislamientos de Alpha y Monserrat (0.619 y 0.667, susceptible y resistente), mientras que A1 predominó en la población *P. i.* obtenida del cv. Michoacán, resistente (0.833). En toda la población de este estudio se estimó un promedio de frecuencias de 0.557:0.443 para A1:A2 (n=97, Cuadro 2).

Se observó especificidad hospedero-patógeno en los genotipos *P. infestans* A2, 86/100, 100/100, y A1, 86/100, 100/100, ambos constituyendo 66% de los aislamientos de las variedades Monserrat y Michoacán. Esto implica que Monserrat, que fue más susceptible al grupo de cruzamiento A2 que al A1, pudo ejercer presión de selección para que afloraran A2's, mientras que lo opuesto pudo suceder para la variedad Michoacán. La resistencia/susceptibilidad de campo de las otras

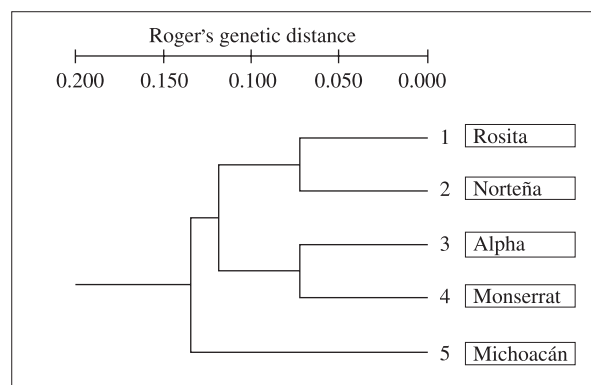
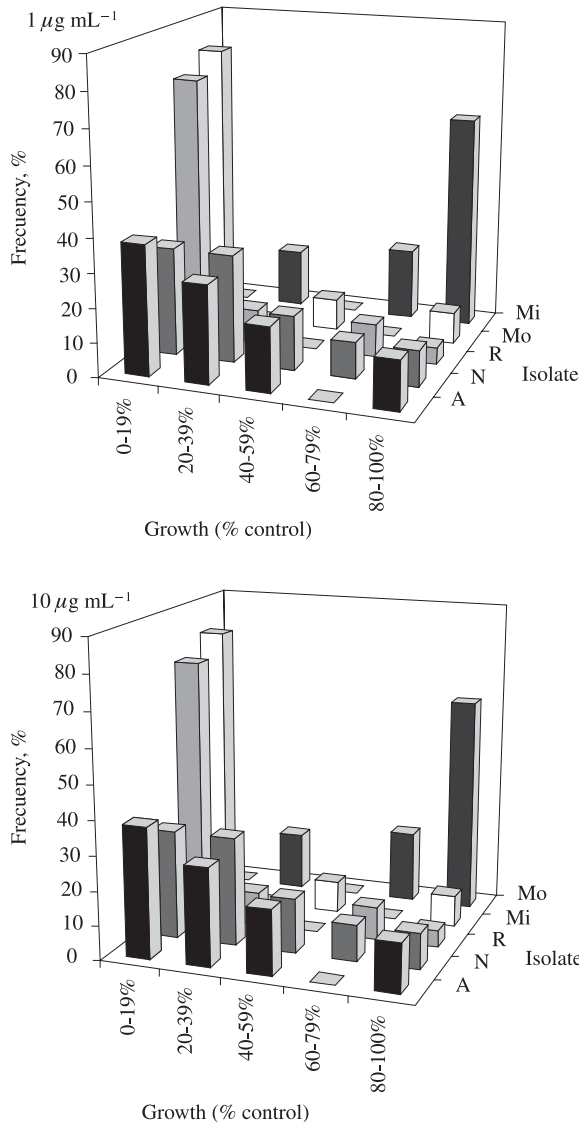


Figure 1. Cluster analysis of five subpopulations of *Phytophthora infestans* supported by the modified Rogers' genetic distance of mating type, glucose-6-phosphate isomerase and peptidase allozyme loci.

Figura 1. Análisis de agrupamiento de cinco subpoblaciones de *Phytophthora infestans* respaldado por la distancia genética de Roger por tipo de cruzamiento y loci de aloenzimas de glucosa-6-fosfato isomerasa y peptidasa.

concordant with the dosages (Figure 2). Considering that a strain is resistant when it grows 40% or more of the control in $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of the product (Matuszak *et al.*, 1994), there were resistant isolates in the collection included in this study, especially from the varieties Monserrat and Michoacán, and to a lesser extent from Alpha and Nortaña. They grew well in the presence of 10 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Similar results have been reported with 1 and $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Grünwald *et al.*, 2001; Matuszak *et al.*, 1994). However, with higher dosages the increase of resistant strains was more evident in our study than in previous reports. Such resistance was variety dependent, particularly the cultivar Michoacán, from which a higher frequency of isolates grew well in the presence of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ metalaxyl. Aggressiveness of the pathogen in this resistant host could be linked either to its resistance to the fungicide or to random sampling.



variedades incluidas en este estudio no delimitaron especificidad del hospedante para las variantes del patógeno que las atacaron. Alpha, susceptible, y Rosita y Nortaña, resistentes al oomiceto, hospedaron ocho a once genotipos diferentes de *P. infestans*, de los cuales cuatro fueron comunes para las tres variedades.

Agrupamiento genético

Las distancias genéticas de Roger identificaron tres subgrupos de *P. infestans* (Figura 1). El primero comprendió las variantes obtenidas de Rosita y Nortaña, con un coeficiente de similaridad de 0.07 y un valor de identidad de 0.989. El segundo incluyó las poblaciones del patógeno obtenidas de Alpha y Monserrat, con un coeficiente de similaridad también de 0.07 y un valor de identidad de 0.993. El tercer grupo fue sólo para los aislamientos de Michoacán, los cuales se distanciaron genéticamente más del resto, con un coeficiente de similaridad de 0.11 y un valor de identidad de 0.95. Esta división de subgrupos se explica por la carencia de especificidad de la mayoría de los aislamientos. La mayor distancia genética de la subpoblación del cv. Michoacán se debió a la mayor frecuencia (66%) del genotipo más común (A1, 86/100, 100,100) de esta variedad con respecto al resto de los aislamientos (Cuadro 1).

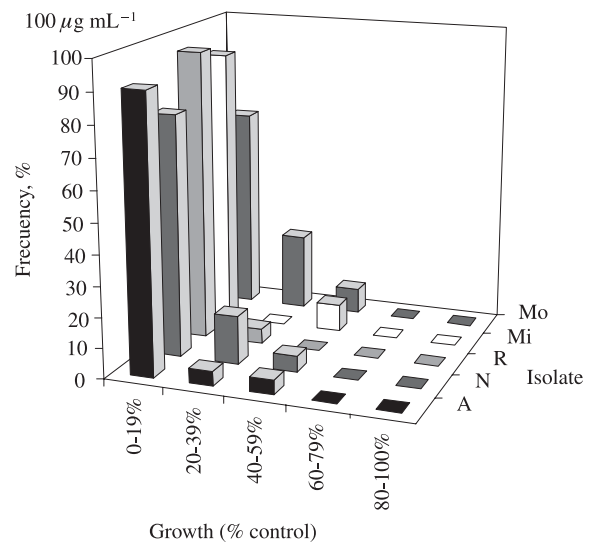
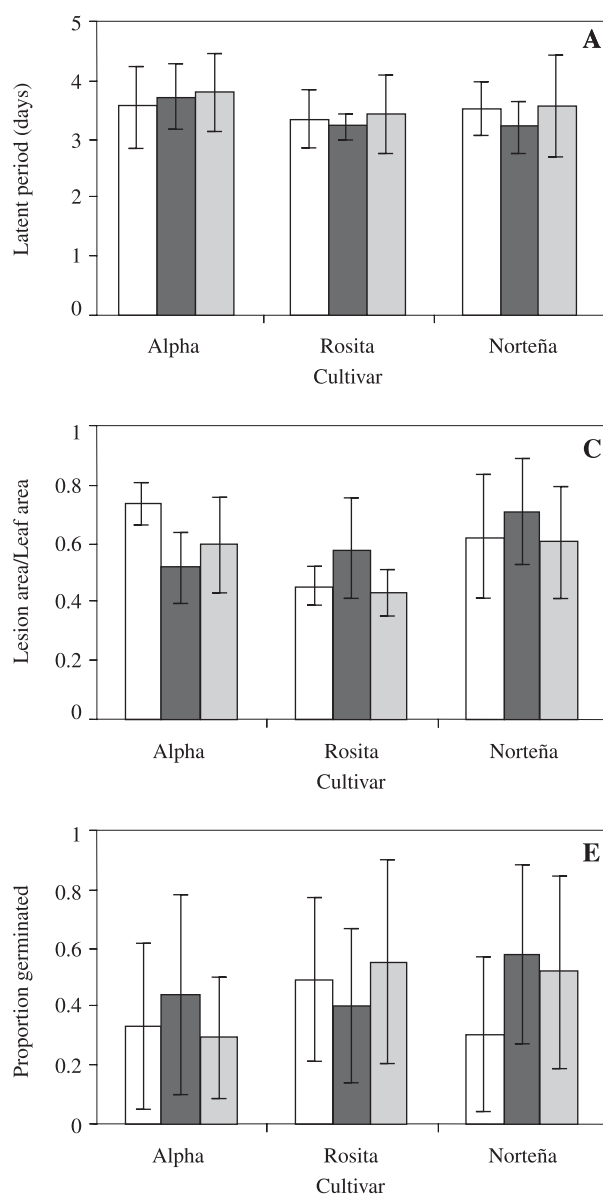


Figure 2. Frequency of relative growth of *Phytophthora infestans* on rye-agar medium amended with three dosages of metalaxyl. A = Alpha; N = Nortaña; R = Rosita; Mi = Michoacán; Mo = Monserrat.

Figura 2. Frecuencia de crecimiento relativo de *Phytophthora infestans* en medio de centeno-agar con tres dosis de metalaxil. A = Alpha; N = Nortaña; R = Rosita; MI = Michoacán; Mo = Monserrat.

Host resistance components

There were no statistical differences among isolate-variety combinations on fitness parameters in the first trial of detached leaves in the laboratory. Under these conditions no isolate was found to be more fit on the variety from which it was isolated than from or on the other varieties. It took 3-4 d to all combinations to sporulate (latent period), with a high infecting efficiency (90-100%) and a lesion area of 40 to 70% of the leaflet. Although sporangia density was not significantly different, the isolate from the variety Alpha sporulated better in such cultivar than in the other two, and so did the isolate from Norteña in Norteña. Sporangia germination was also statistically similar when averaged across isolate-cultivar (Figure 3).



Resistencia a metalaxil

En el medio con 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ del fungicida crecieron todos los cultivos, algunos de ellos casi tanto como el testigo, como los de la variedad Michoacán. No obstante, con excepción de las variantes de esta variedad, las frecuencias generales en la disminución del crecimiento estuvieron de acuerdo con las dosis (Figura 2). Considerando que una cepa es resistente cuando crece 40% o más del testigo en 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ del producto (Matuszak *et al.*, 1994), hubo aislamientos resistentes en la colección incluida en este estudio, especialmente de las variedades Monserrat y Michoacán, y en menor grado de Alpha y Norteña, que crecieron bien en presencia de 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se han reportado resultados similares con 1 y 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Grünwald *et al.*, 2001; Matuszak *et al.*, 1994). Sin embargo, con dosis mayores fue más evidente el incremento de cepas resistentes en nuestro estudio que en reportes previos. Tal resistencia fue dependiente de la variedad, particularmente para el cultivar Michoacán, del cual creció bien una alta frecuencia de aislamientos en presencia de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metalaxil.

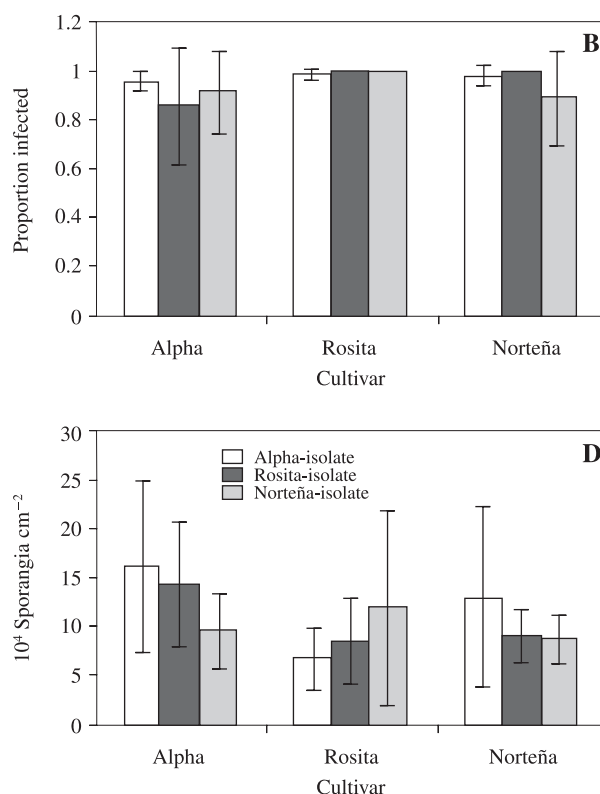


Figure 3. Mean and standard deviation of fitness parameters for each factorial combination of isolate-variety. First trial in the laboratory.

Figura 3. Media y desviación estándar de parámetros de adaptabilidad para cada combinación factorial de aislamiento-variedad. Primer ensayo en laboratorio.

The isolate from the susceptible cultivar Alpha did not infect Norteña (resistant), either in the second trial in the laboratory or in the greenhouse. This is an example of a gene-for-gene interaction, where cv. Norteña has major or vertical resistance genes for corresponding virulence genes of the pathogen (Robinson, 1996). In the second trial in the laboratory the period from inoculation to first sporulation fluctuated from 68 h, when the isolate from Rosita was inoculated to leaflets of Norteña, to 84 h when in the combinations (inoculum-host) of Alpha-Alpha, Rosita-Alpha, and Norteña-Norteña (Table 3).

The largest damaged area was also induced by the isolate from Rosita when inoculated in Rosita (91.7%), followed by the inoculum from Alpha in the same host (86.9%) and the strain from Rosita in Alpha (74.6%). However, the least damage was observed in tissue from Norteña inoculated with its own isolate (29.0%). The highest sporulation was observed in the isolate from Alpha in leaflets of Alpha and Rosita. The strain from Rosita was also prolific but intermediate, and again, in concordance to the limited damaged area, the inoculum from Norteña was relatively short in sporulation. Latent period in the greenhouse could not be estimated, as it requires destructive sampling, and the rest of the variables can not be quantified in the same tissue under the same conditions (attached leaves). The largest visible damaged area in the greenhouse was again induced by the isolate from Rosita in attached leaflets of Norteña and Alpha, but with no statistical significance between them and the isolate from Norteña in the three hosts (Table 4); similar behavior as in detached leaves, although to a lesser extent. However, there were differences in spore production. The highest number of

La agresividad del patógeno en este hospedero resistente pudo ligarse ya sea a su resistencia al fungicida o al muestreo al azar.

Componentes de resistencia del hospedante

No hubo diferencia estadística en las combinaciones aislamiento-variedad en los parámetros de adaptabilidad en el primer ensayo de hojas desprendidas en el laboratorio. Bajo estas condiciones no se encontró alguna cepa que estuviera más adaptada en la variedad de donde se obtuvo que de o en otras variedades. La esporulación para todas las combinaciones tomó 3-4 d (periodo de latencia) con alta eficiencia de infección (90-100%) y de 40 a 70% de área lesionada por folíolo. Aunque la densidad de esporangios no fue diferente, el aislamiento de la variedad Alpha esporuló mejor en ese cultivar que en los otros dos, y lo mismo sucedió con el aislamiento de Norteña en Norteña. También hubo similitud estadística en germinación de esporangios cuando se promediaron cepa-cultivar (Figura 3).

El aislamiento de la variedad susceptible Alpha no infectó a Norteña (resistente) en el segundo ensayo en el laboratorio o en el invernadero. Esto es un ejemplo de interacción gen-por-gen donde el cv. Norteña tiene genes mayores o de resistencia vertical para los correspondientes genes de virulencia del patógeno (Robinson, 1996). En el segundo ensayo en el laboratorio el período desde inoculación a la primera esporulación fluctuó de 68 h cuando la cepa de Rosita se inoculó en folíolos de Norteña, a 84 h en las siguientes combinaciones (inóculo-hospedante) Alpha-Alpha, Rosita-Alpha, y Norteña-Norteña (Cuadro 3).

Table 3. Latent period (LP), damaged area, and sporulation density. Second trial, detached leaves in the laboratory.

Cuadro 3. Período de latencia (LP), área dañada y densidad de esporulación. Segundo ensayo, hojas desprendidas en el laboratorio.

Inoculated host	Isolate								
	From Alpha			From Rosita			From Norteña		
	LP (h)	Damaged area (%)	Number of sporangia (cm ⁻²)	LP (h)	Damaged area (%)	Number of sporangia (cm ⁻²)	LP (h)	Damaged area (%)	Number of sporangia (cm ⁻²)
Alpha	84 a*	62.7 b	168 170 a	84 a	74.6 b	73 500 a	80 a	51.0 ab	20 667 a
Rosita	80 a	86.9 a	101 000 a	74 ab	91.7 a	46 167 b	78 a	56.1 a	22 333 a
Norteña	00 b	0.00 c	0 b	68 b	51.4 c	37 167 b	84 a	29.0 b	5667 b

Table 4. Damaged area and sporulation density. Attached leaves in the greenhouse.

Cuadro 4. Área dañada y densidad de esporulación. Hojas adheridas en invernadero.

Inoculated host	Isolate					
	From Alpha		From Rosita		From Norteña	
	Damaged area (%)	Number of sporangia (cm ⁻²)	Damaged area (%)	Number of sporangia (cm ⁻²)	Damaged area (%)	Number of sporangia (cm ⁻²)
Alpha	28.2 a*	110 830 a	37.2 a	151 500 a	36.1 a	45 000 a
Rosita	18.9 b	21 170 b	19.9 b	33 000 b	35.6 a	20 500 b
Norteña	0 c	0 c	39.3 c	75 000 ab	31.5 a	13 667 b

sporangia was observed when the isolate from Rosita infected Alpha, followed by the strain of Alpha in the same host and the one from Rosita in Norteña, and again, as in detached leaves, the least prolific isolate was the one from Norteña in tissue of Norteña and Rosita. The variety Alpha, susceptible, was the host with the highest sporulation for the three inocula.

Additional remarks

Most of the host genotypes included in this study, and from which the *P. infestans* isolates were obtained, have demonstrated stable, durable resistance to the pathogen over the years (Flores-Gutiérrez and Cadena-Hinojosa, 1996; Grünwald *et al.*, 2002a). Nevertheless, the barrier of their resistance was overcome by the oomycete to some extent.

The major resistance genes (R) of these varieties exert selection pressure over the *P. infestans* population, which may imply the expression of more virulent genes on the oomycete to be able to infect these varieties. Cultivar Alpha does not have R genes and could be infected by wild type, virulent and avirulent pathogen genotypes alike. The overall A1:A2 ratio was 1:0.8 (0.55:0.44), but the assumption of the 1:1 ratio in the 97 isolates was dependent on the variety and was not statistically supported because $p > \chi^2$ values fluctuated from 0.00 in the *P. i.* population obtained from the cv. Michoacán to 0.82 in the population from Norteña, (Table 2). No relationship between a specific mating type of the pathogen and the level of genetic resistance of the hosts was observed. Isolates from the resistant cultivar Michoacán, for instance, were predominantly A1 (5:1 ratio), while the opposite was true for the strains from Monserrat, also resistant, and from Alpha, susceptible.

None of the *P. i.* genotypes characterized in this study fitted the US-1, US-6, US-7, or US-8 profiles reported by Goodwin *et al.* (1995), and two variants were particularly frequent, aggressive, and common to the five potato varieties; A1, 86/86, 100/100, and A2, 86/100, 100/100. As a consequence, no host-pathogen specificity was observed. The most common genotype in our study, A1, 86/100, 100/100, was not present in the wild species sampled in 1988-1989, but it was the fifth most frequent among more than 500 isolates obtained in 1988-1989 and 1997-1998 from wild and domesticated species (Grünwald *et al.*, 2001). In another report this genotype was the second most frequent (16%) in a population of strains from resistant North American clones (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2003). In the present study, this genotype was the most common in Mexican resistant varieties (37% of the samples). The increase of the population of this strain in time is evident, regardless of the host from which it was obtained.

El área con mayor daño también fue inducida por el aislamiento de Rosita cuando se inoculó en Rosita (91.7%), seguida por el inóculo de Alpha en el mismo hospedante (86.9%) y por la cepa de Rosita en Alpha (74.6%). Sin embargo, se observó el menor daño en tejido de Norteña inoculado con su propio aislamiento (29%). Se observó la mayor esporulación en la cepa de Alpha en folíolos de Alpha y Rosita. La variante de Rosita también fue prolífica pero intermedia, y otra vez, en concordancia con la limitada área dañada, el inóculo de Norteña tuvo esporulación limitada. No se estimó el período de latencia en el invernadero por requerir muestreo destructivo, y el resto de las variables no podrían cuantificarse en el mismo tejido bajo las mismas condiciones (hojas adheridas). La mayor área con daño visible en invernadero la indujo nuevamente el aislamiento de Rosita en hojas adheridas de Norteña y Alpha, aunque sin significancia estadística entre ellas y el aislamiento de Norteña en los tres hospedantes (Cuadro 4), que fue el mismo comportamiento que en hojas desprendidas, aunque menor. No obstante, hubo diferencias en la producción de esporas. El mayor número de esporangios se observó cuando el aislamiento de Rosita infectó a Alpha, seguido por la variante de Alpha en el mismo hospedante y el de Rosita en Norteña, y nuevamente, como en las hojas desprendidas, el aislamiento menos prolífico fue el de Norteña en tejido de Norteña y Rosita. La variedad Alpha, susceptible, fue el hospedante con mayor esporulación para los tres inóculos.

Consideraciones adicionales

La mayoría de los genotipos del hospedante incluidos en este estudio y de los cuales se obtuvieron los aislamientos de *P. infestans*, han demostrado resistencia estable y durable al patógeno durante años (Flores-Gutiérrez y Cadena-Hinojosa, 1996; Grünwald *et al.*, 2002a). No obstante, hasta cierto punto se superó la barrera de la resistencia por el oomiceto.

Los genes mayores de resistencia (R) de estas variedades ejercen presión de selección sobre la población de *P. infestans*, lo que implicaría la expresión de genes más virulentos del oomiceto para poder infectar a estas variedades. El cultivar Alpha no tiene genes R y puede infectarse con el tipo silvestre del patógeno, indistintamente de su virulencia. La proporción general de A1:A2 fue 1:0.8 (0.55:0.44) pero el supuesto de la relación 1:1 en los 97 aislamientos dependió de la variedad y no se respaldó estadísticamente porque los valores de $p > \chi^2$ fluctuaron de 0.00 en la población de *P. i.* obtenida del cv. Michoacán a 0.82 en la población de Norteña (Cuadro 2). No se observó una relación entre el tipo de cruzamiento específico del patógeno y el grado de resistencia genética del hospedante. Por

Mating types of the isolates from cv. Michoacán maintained a 5:1 A1:A2 ratio with a high predominance of genotype 2 (Table 1). This was reflected in its location at a greater genetic distance from the rest (Figure 1). Also, the frequency of A1 and the resistance to metalaxyl was higher in the isolates from this variety than in those from the rest. Two observations are derived; first, the resistance to the fungicide in A1 disproves the idea that such resistance is more closely associated to A2 than to A1; and second, such resistance is more host dependent than mating type dependent. Consequently, field plots with the variety Michoacán without chemical protection in the Toluca Valley may exert selection pressure for the outbreak of fungicide resistant strains that attack other resistant hosts. This assumption justifies the host and disease handling by combining resistant varieties and chemical control (Grünwald *et al.*, 2002b).

Regarding host disease resistance components, the widely known field resistance of the varieties Rosita and Norteña was lost in attached leaves in the greenhouse. The tissue of these varieties was as damaged as that of the susceptible cultivar Alpha (except when the inoculation of the isolate from this variety failed to infect detached leaves of Norteña), which was not expected, suggesting the exclusion of this component (damaged area) as discriminatory factor between resistance and susceptibility. The latent or incubation period under these conditions was short (68-84 h), which implies that a life cycle of the pathogen is completed in about 3 d. But the sporulation factor did induce differences. The highest sporulation was observed when the isolate from the susceptible variety Alpha was inoculated in the same variety, and resistant hosts inhibited sporangia differentiation to some extent, regardless of the origin of the strains, which shows the value of this variable in detached leaves. Sporangia inhibition is, then, a host resistant component identified in the Mexican resistant variety Norteña. Also, under these conditions, relative host specificity was observed in two host-pathogen combinations, Rosita-Rosita, with 91.7% damaged area, and Alpha-Alpha, with the highest sporulation of all. However, the isolate from Alpha showed limited virulence under greenhouse conditions in spite of the high sporulation in cv. Alpha. In this case, the susceptible host is not selective for the pathotypes that infect it while the resistant plant may discriminate for more aggressive variants of the pathogen. Inhibition of sporulation was the only host disease resistance component identified in the greenhouse for the varieties with field resistance.

There are two more aspects to highlight; a) the larger lesion area in detached leaflets in the laboratory (29-92%) with respect to attached leaflets in the greenhouse (19-39%) excluding the strain from Alpha inoculated in

ejemplo, las cepas del cultivar resistente Michoacán fueron predominantemente A1 (relación 5:1), mientras que lo opuesto se presentó para las variantes de Monserrat, también resistente, y de Alpha, susceptible.

Ninguno de los genotipos de *P. i.* caracterizados en este estudio se ajusta a los perfiles de US-1, US-6, US-7, o US-8 reportados por Goodwin *et al.* (1995), y dos variantes fueron particularmente frecuentes, agresivas y comunes a las cinco variedades de papa; A1, 86/86, 100/100 y A2, 86/100, 100/100. Como consecuencia, no se observó especificidad hospedero-patógeno. El genotipo más común en nuestro estudio, A1, 86/100, 100/100, no se presentó en las especies silvestres muestreadas en 1988-1989, pero fue el quinto más frecuente entre más de 500 aislamientos obtenidos de especies silvestres y domesticadas en 1988-1989 y 1997-1998 (Grünwald *et al.*, 2001). En otro reporte este genotipo fue el segundo más frecuente (16%) en una población de cepas de clones norteamericanos (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2003). En el presente estudio este genotipo fue el más común en las variedades mexicanas resistentes (37% de las muestras). Es evidente el aumento en la población de esta variante en el tiempo, independientemente del hospedante del que se obtuvo.

Los tipos de cruzamiento del cultivar Michoacán mantuvieron una relación 5:1 de A1:A2 con alta predominancia del genotipo 2 (Cuadro 1), que se reflejó en su ubicación a una distancia genética mayor que el resto (Figura 1). Además, la frecuencia de A1 y la resistencia a metalaxil fueron mayores en los aislamientos de esta variedad que en los del resto, de lo que se derivan dos observaciones: primera, la resistencia al fungicida de A1 rechaza la idea que tal resistencia está más estrechamente asociada a A2 que a A1; segunda, tal resistencia es más dependiente del hospedante que del tipo de cruzamiento. Consecuentemente, los lotes en el campo de la variedad Michoacán sin protección química en el valle de Toluca pudieran ejercer presión de selección para el afloramiento de cepas resistentes al fungicida que ataquen a otros hospedantes resistentes. Este supuesto justifica el manejo del hospedante y de la enfermedad mediante la combinación de variedades resistentes y control químico (Grünwald *et al.*, 2002b).

En cuanto a los componentes de resistencia del hospedante, la resistencia de campo ampliamente conocida de Rosita y Norteña se perdió en hojas adheridas en el invernadero. El daño en el tejido de estas variedades fue tanto como el del cultivar susceptible Alpha (excepto cuando la inoculación del aislamiento de esta variedad falló en infectar hojas desprendidas de Norteña), que no se esperaba, lo que sugiere la eliminación de este componente (área dañada) como un factor discriminatorio entre resistencia y susceptibilidad. Bajo

Norteña in both cases; b) the difference of these results with respect to the infection observed in the field over the years. The varieties Rosita and Norteña have repeatedly proved to be resistant in the field under the natural conditions of the Toluca Valley (Flores-Gutierrez and Cadena-Hinojosa, 1996; Grünwald *et al.*, 2002a), but they were colonized by *P. i.* as much as the susceptible control Alpha in the laboratory. This behavior questions the validity of these tests as preliminary screening or prediction for potential field genetic resistance of the potato clones.

CONCLUSIONS

Eighteen multilocus *Phytophthora infestans* genotypes were identified, all of them already reported. Limited host-pathogen specificity was observed only in the cultivars Alpha (susceptible) and Rosita (resistant), and it was not linked to the levels of the host genetic resistance to the oomycete. The best incubation conditions were with detached leaves in the laboratory, and the host resistance components found in this study did not agree with the known field resistance of the hosts, for such variables are not potential tools for early clonal genetic resistance identification in breeding programs.

LITERATURE CITED

- Birham, R. K., and B. P. Singh. 1995. Path-coefficient analyses and genetic parameters of the components of field resistance of potatoes to late blight. *Ann. Appl. Biol.* 127: 353-362.
- Cañizales, C. A., and G. A. Forbes. 1995. Foliage resistance to *Phytophthora infestans* in Ecuadorian national collection of *Solanum phureja* ssp. *phureja*. *Pot. Res.* 38: 3-10.
- Colon, T. L., D. J. Budding, L. C. P. Keizer, and M. M. J. Pieters. 1995. Components of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in eight South American *Solanum* species. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 441-456.
- Daayf, H. W. F., G. Mahuku, and R. D. Peters. 2001. Relationships between pathotypes and RAPDs, Gpi-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. *Amer. J. Potato Res.* 78: 129-139.
- Deahl, K. L., S. P. Demuth, S. L. Sinden, and A. Rivera-Peña. 1995. Identification of mating types and metalaxyl resistance in north american populations of *Phytophthora infestans*. *Amer. Potato J.* 72: 35-49.
- Flier, W. G., N. J. Grünwald, L. P. N. M. Kroon, A. K. Sturbaum, T. B. M. van den Bosch, E. Garay-Serrano, H. Lozoya-Saldaña, W. E. Fry, and L. J. Turkensteen. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca valley of Central México suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* 93: 382-390.
- Flores-Gutierrez, F. X., and M. Cadena-Hinojosa. 1996. Evaluation of horizontal resistance and effects of R-Genes in ten Mexican cultivars against potato late blight (*Phytophthora infestans*) under natural conditions in the central plateau of México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14: 97-102.
- Goodwin, B. S., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron, and W. E. Fry. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of

estas condiciones el periodo de incubación fue corto (68-84 h) lo que implica que se completa el ciclo biológico del patógeno en cerca de 3 d. Pero el factor de esporulación sí indujo diferencias. Se observó la mayor esporulación cuando el aislamiento de la variedad susceptible Alpha se inoculó en la misma variedad, y los hospedantes resistentes inhibieron, hasta cierto punto, la diferenciación de esporangios, independientemente del origen de las cepas, lo que demuestra el valor de esta variable en hojas desprendidas. Entonces, la inhibición de esporangios se identifica como un componente de resistencia del hospedante en la variedad mexicana resistente Norteña. También en estas condiciones se observó relativa especificidad del hospedante en dos combinaciones hospedero-patógeno; Rosita-Rosita, con 91.7% de área dañada, y Alpha-Alpha, con la mayor esporulación de todas. No obstante, el aislamiento de Alpha tuvo virulencia limitada en condiciones de invernadero a pesar de la alta esporulación en el cv. Alpha. En este caso, el hospedero susceptible no fue selectivo respecto a los patotipos que lo infectaron, mientras que la planta resistente pudo discriminar para variantes más agresivas del patógeno. El único componente de resistencia identificado en el invernadero para las variedades con resistencia de campo fue la inhibición de la esporulación.

Hay dos aspectos más por resaltar: a) las mayores áreas lesionadas en hojas separadas en el laboratorio (29-92%) respecto a las hojas adheridas en el invernadero (1-37%) excluyendo la variante de Alpha inoculada en Norteña en ambos casos; b) la diferencia de estos resultados respecto a la infección observada en el campo durante años. Las variedades Rosita y Norteña han demostrado repetidamente su resistencia en el campo bajo las condiciones naturales del valle de Toluca (Flores-Gutierrez y Cadena Hinojosa, 1996; Grünwald *et al.*, 2002a) pero se colonizaron con *P. i.* tanto como el testigo susceptible Alpha en el laboratorio. Este comportamiento cuestiona la validez de estas pruebas como ensayos preliminares o predictivos para resistencia genética de campo de los clones de papa.

CONCLUSIONES

Se identificaron 18 genotipos multilocus de *Phytophthora infestans*, todos ya reportados. Se observó limitada especificidad hospedero-patógeno sólo en los cultivares Alpha (susceptible) y Rosita (resistente), sin ligarse a la resistencia genética del hospedante contra el oomiceto. Las mejores condiciones de incubación fueron con hojas desprendidas en el laboratorio, y los componentes de resistencia del hospedante encontrados en este estudio no coincidieron con la conocida resistencia de campo de los hospederos, por lo que tales variables

- Phytophthora infestans* populations in northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82: 955-961.
- Goodwin, B. S., E. R. Sneider, and W. E. Fry. 1995. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of alloenzyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 79: 1181-1185.
- Grünwald, N. J., W. G. Flier, A. K. Sturbaum, S. E. Garay, T. B. M. Van den Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, S. H. Lozoya, L. J. Turkensteen, and W. E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central Mexico. *Phytopathology* 91: 882-890.
- Grünwald, N. J., M. A. Cadena-Hinojosa, O. Rubio-Covarrubias, A. Rivera-Peña, J. S. Niederhauser, and W. E. Fry. 2002a. Potato cultivars from the Mexican National Program: Sources and durability of resistance against late blight. *Phytopathology* 92: 688-693.
- Grünwald, N. J., G. Romero-Montes, H. Lozoya-Saldaña, O. A. Rubio-Covarrubias, and W. E. Fry. 2002b. Potato late blight management in the Toluca Valley: Field validation of Sim Cast modified for cultivars with high field resistance. *Plant Dis.* 86: 1163-1168.
- Hebert, N. P. D., and J. M. Beaton. 1989. Methodologies for Alloenzyme Analysis using Cellulose Acetate Electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories. Guelph, Ontario. 32 p.
- Judelson, H. S. 1996. Genetic and physical variability at the mating type locus of the oomycete, *Pytophthora infestans*. *Genetics* 144: 1005-1013.
- Kato, M., E. S. Mizubuti, S. B. Goodwin, and W. E. Fry. 1997. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87: 973-980.
- Lozoya-Saldaña, H., M. T. Colinas-León, M. S. Cervantes-Ramírez, and J. García-Martínez. 1997. Potato tuber isozymes in cellulose acetate gel electrophoresis. *Agrociencia* 31: 339-343.
- no son herramientas potenciales para identificación temprana de resistencia genética de los clones en programas de mejoramiento.
- Fin de la versión en Español—
- ✱
- Lozoya-Saldaña, H., N. Grünwald, E. Garay-Serrano, A. Sturbaum-Abud, and Ch. Brown. 2003. Population substructuring of *Phytophthora infestans* on American potato clones in the Toluca Valley, México. *Acta Horticulturae* 619: 183-188.
- Matuszak, J. M., E. J. Fernández, W. K. Gu., G. M. Villarreal, and W. E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Dis.* 78: 911-916.
- Mizubuti, S. G. E., and W. E. Fry. 1998. Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 88: 837-843.
- Oijen, M. V. 1992. Selection and use of a mathematical model to evaluate components of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Neth. J. Plant Pathol.* 98: 192-202.
- Robinson, R. 1996. Return to Resistance: Breeding Crops to Reduce Pesticide Dependence. Ag. Access, Davis, CA, USA. 480 p.
- Thompson, W. T. 1985. Agricultural Chemicals. Book IV: Fungicides. Thompson Publications. Fresno, CA, USA. 181 p.
- Tooley, P. W., W. E. Fry, and G. M. J. Villarreal. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *J. Hered.* 76: 431-435.
- Tooley, P. W., J. A. Sweigard, and W. E. Fry. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Phytopathology* 76: 1209-1213.