

CHARACTERIZATION OF *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. II. SUBPOPULATIONS OBTAINED FROM WILD *Solanum* SPECIES

CHARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. II. SUBPOBLACIONES OBTENIDAS DE ESPECIES SILVESTRES DE *Solanum*

Héctor Lozoya-Saldaña¹, Daniel Perales-Rosas², Sylvia P. Fernández-Pavía³ and Niklaus J. Grünwald⁴

¹Departamento de Fitotecnia, ²Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 56230. (lozoya@correo.chapingo.mx). ³Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tarímbaro, Michoacán, México. ⁴U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. 3420 NW Orchard Avenue. Corvallis, Oregon. 97330. USA.

ABSTRACT

In the summer of 2000, isolates from natural infections of *P. infestans* (*P.i.*) were obtained from six wild species of *Solanum* planted *ex-profeso* under rainfed conditions in the Toluca Valley of México to determine possible host-pathogen specificity and for characterization regarding mating type (MT; A1, A2), sensitivity to metalaxyl, and the presence of allozymes of *glucose-6-phosphate-isomerase* (*Gpi*) and *peptidase* (*Pep*). *Solanum phureja* and *S. acaule* presented diverse degrees of severity of the disease among individuals of each population. The rest of the species was uniformly resistant to the pathogen. Of 24 isolates from *S. phureja*, 13 multilocus genotypes were detected, the most frequent of which was the A2 100/100 *Gpi* and 100/100 *Pep* (22%) and an A1:A2 ratio of 0.6:1. Nine multilocus genotypes were found in the population of *P.i.* obtained from *S. acaule*. The most common one was also A2, 100/100 *Gpi* and 100/100 *Pep* (22% of such population too), with a MT proportion of 1:1. In *S. bulbocastanum*, no particular genotype was more common, and the only MT was A1, nor was there a more frequent genotype found in *S. caripense*, where the proportion of MT A1:A2 was 0.25:1. The only genotype recovered from *S. muricatum* was A1 86/11, 92/100 (*Gpi*, *Pep*), corresponding to US1. The two isolates from *S. andreaeanum* were A1, 86/100 *Gpi* and 100/100 *Pep*. *Solanum phureja* and *S. acaule* had the greatest frequency of isolates highly resistant to metalaxyl, and to a lesser degree of resistance those of *S. caripense* and *S. muricatum*. The isolates from *S. bulbocastanum* and *S. andreaeanum*, two species resistant to *P.i.*, were A1 and susceptible to metalaxyl. All of the homothallic isolates were highly resistant to metalaxyl, and host-pathogen specificity was observed only in *S. muricatum*.

Key words: Isozymes, mating type, metalaxyl resistance.

INTRODUCTION

Phytophthora *infestans* (*P.i.*), the oomycete responsible for the potato and tomato late blight disease, is a heterothallic species suggested to

Recibido: Enero, 2005. Aprobado: Febrero, 2006.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 40: 325-333. 2006.

RESUMEN

En el verano del 2000, se obtuvieron aislamientos de infecciones naturales de *P. infestans* (*P.i.*) de seis especies silvestres de *Solanum* plantadas *ex-profeso* bajo condiciones de temporal en el Valle de Toluca, México para determinar la posible especificidad hospedante-patógeno y la caracterización respecto al grupo de compatibilidad (GC; A1, A2), sensibilidad al metalaxil y la presencia de aloenzimas de *glucosa-6-fosfato-isomerasa* (*Gpi*) y *peptidasa* (*Pep*). *Solanum phureja* y *S. acaule* presentaron diversos grados de severidad de la enfermedad entre los individuos de cada población. El resto de las especies fue uniformemente resistente al patógeno. De los 24 aislamientos de *S. phureja*, se detectaron 13 genotipos multilocus, de los cuales, el más frecuente fue el A2 100/100 *Gpi* y 100/100 *Pep* (22%) y una proporción de A1:A2 de 0.6:1. Se encontraron nueve genotipos multilocus en la población de *P. i.* obtenidos de *S. acaule*. El más común fue también A2, 100/100 *Gpi* y 100/100 *Pep* (22% de cada población también), con una proporción GC de 1:1. En *S. bulbocastanum*, ningún genotipo particular fue más común, y el único GC fue el A1, ni hubo un genotipo más frecuente en *S. caripense* donde la proporción de GC A1:A2 fue de 0.25:1. El único genotipo recuperado de *S. muricatum* fue A1 86/11, 92/100 (*Gpi*, *Pep*), correspondiente al US1. Los dos aislamientos de *S. andreaeanum* fueron A1, 86/100 *Gpi* y 100/100 *Pep*. *Solanum phureja* y *S. acaule* tuvieron la frecuencia más alta de aislamientos resistentes al metalaxil, y con un grado de resistencia menor fueron los de *S. caripense* y *S. muricatum*. Los aislamientos de *S. bulbocastanum* y *S. andreaeanum*, dos especies resistentes a *P.i.*, fueron A1 y susceptibles al metalaxil. Todos los aislamientos homotállicos fueron altamente resistentes al metalaxil, y sólo se observó la especificidad hospedante-patógeno en *S. muricatum*.

Palabras claves: Isoenzimas, grupo de compatibilidad, resistencia al metalaxil.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora *infestans* (*P.i.*), el oomiceto responsable de la enfermedad del tizón tardío de la papa y el tomate, es una especie heterotállica

be originated from the Toluca Valley of México (Gallegly and Galindo, 1958; Goodwin, 1996). In recent years this pathogen has regained importance due to the outbreak of more aggressive strains resulting from the presence of the A2 mating type outside of the Toluca Valley (Fry *et al.*, 1992; Spielman *et al.*, 1991), some of which are resistant to metalaxyl (Davidse *et al.*, 1983). The Valley of Toluca is also considered to be a secondary center of origin of the genus *Solanum*, which has coevolved with the pathogen, living in equilibrium with it and possessing resistance genes, so that both plant and pathogen complete their life cycles (Niederhauser, 1991).

The greatest species diversity of *Solanum* is found in the Andean region. Resistance to specific genotypes of *P. i.* has been identified in *S. andigenum*, *S. phureja*, *S. chiquidenum*, *S. piurea*, *S. irosinum*, and *S. andeanum*, as well as in other species (Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998). However, wild *Solanum* species of central México manifest a greater horizontal resistance to late blight as a result of the possible coevolution of the host due to a high selection pressure of the pathogen. An example is *S. demissum*, which has been widely used in breeding programs, and whose genes are found in more than 50% of the potato cultivars resistant to late blight in the world. *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum* and *S. iopetalum* are other Mexican species that also have resistance genes against the late blight pathogen (Flores-Crespo, 1969; Goodwin, 1996; Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997; Niederhauser, 1991).

In the host-pathogen interaction there are two aspects which were considered for justifying the present study: a) the identification of the resistance to the pathogen in wild species has been based on inoculations in artificial environments, or with exposure to limited genotypes of the oomycete (Colon *et al.*, 1995; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998), or through strict observation in the natural surroundings (Flores-Crespo, 1969); b) various characterization studies of *P. infestans* relate the variables to the agricultural region of sampling, the ecological niche, the potato production system, or to the origin and/or stability of the oomycete populations (Deahl *et al.*, 1995; Erselius *et al.*, 2000; Flier *et al.*, 2003; Grünwald *et al.*, 2001). However, it is not clear whether genetic resistance identified outside of México in South American *Solanum* species is maintained upon exposure to the numerous genotypes of the pathogen present in the Toluca Valley, and whether the profile of *P. infestans* isolated from these exposures is a result of host-pathogen specificity. In order to answer these questions, the objectives of this study were: a) to assess the genetic resistance of wild *Solanum* species to *P. i.* under natural conditions of the Toluca Valley of México,

que se propone originaria del Valle de Toluca de México (Gallegly y Galindo, 1958; Goodwin, 1996). En años recientes éste patógeno ha recobrado importancia debido al brote de variedades más resistentes que resultan de la presencia del grupo de compatibilidad A2 fuera del Valle de Toluca (Fry *et al.*, 1992; Spielman *et al.*, 1991), algunos de los cuales son resistentes al metalaxil (Davidse *et al.*, 1983). El Valle de Toluca es considerado también un centro de origen secundario del género *Solanum*, el cual ha coevolucionado con el patógeno, viviendo en equilibrio con él y conteniendo genes de resistencia, de manera que ambos, planta y patógeno, completan sus ciclos de vida (Niederhauser, 1991).

La mayor diversidad de especies de *Solanum* se encuentra en la región andina. Se ha identificado resistencia a genotipos específicos de *P. i.* en *S. andigenum*, *S. phureja*, *S. chiquidenum*, *S. piurea*, *S. irosinum*, y *S. andeanum*, así como en otras especies (Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998). Sin embargo, las especies silvestres de *Solanum* del centro de México manifiestan una gran resistencia horizontal al tizón tardío como resultado de la posible coevolución del hospedante debido a una alta presión de selección del patógeno. Un ejemplo es *S. demissum* el cual se ha usado ampliamente en programas de mejoramiento, y cuyos genes se encuentran en más del 50% de los cultivares de papa resistentes al tizón tardío en el mundo. *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum* y *S. iopetalum* son otras especies mexicanas que también tienen genes resistentes contra el patógeno del tizón tardío (Flores-Crespo, 1969; Goodwin, 1996; Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997; Niederhauser, 1991).

En la interacción entre patógenos y hospedantes hay dos factores a considerar: a) la identificación de la resistencia al patógeno en especies silvestres se ha basado sobre inoculaciones en ambientes artificiales, o con la exposición a genotipos limitados del oomiceto (Colon *et al.*, 1995; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998), o a través de observación estricta en ambientes naturales (Flores-Crespo, 1969); b) varios estudios de caracterización de *P. infestans* relacionan las variables al muestreo de la región agrícola, al nicho ecológico, al sistema de producción de la papa, o al origen y/o estabilidad de las poblaciones del oomiceto (Deahl *et al.*, 1995; Erselius *et al.*, 2000; Flier *et al.*, 2003; Grünwald *et al.*, 2001). Sin embargo, no está claro si la resistencia identificada fuera de México en especies sudamericanas de *Solanum* se mantiene con la exposición a los numerosos genotipos del patógeno presente en el Valle de Toluca, y si el perfil del aislamiento de *P. infestans* de estas exposiciones es un resultado de la especificidad hospedante-patógeno. Para responder estas preguntas, los objetivos de este estudio fueron: a)

b) to characterize the *P.i.* isolates obtained from such wild species; c) to identify host-pathogen specificities.

MATERIALS AND METHODS

Under a natural infection and rainfed environment, during the summer of 2000, as soon as the disease showed up, in a two month period (July-August) 58 *P.i.* isolates were obtained from single lesions from six wild *Solanum* species (*S. phureja*, n= 24; *S. acaule*, n= 18; *S. bulbocastanum*, n= 4; *S. caripense*, n= 5; *S. muricatum*, n= 5; *S. andreaeanum*, n= 2) planted *ex-profeso* in a plot with 100 plants/species at the PICTIPAPA-ICAMEX-INIFAP Experiment Station in the Toluca Valley. Pure culture was obtained by incubating surface-sterilized diseased foliage tissue in potato slices for two days, and transferred to selective rye-agar medium (Grünwald *et al.*, 2001).

Disease severity

The diseased foliar area with respect to the total of the foliage of all plants was monitored weekly, and evaluated according to Henfling's (1987) scale.

Mating type and allozyme analysis

To determine the mating types (MT), the isolates were paired with a known mating type (A1 and A2) in a rye agar medium. If after two weeks the presence of oospores was observed, then the unknown strain was identified as the opposite to the one to which it had been confronted, and if it produced oospores with both known types, it was classified as homothallic. This homothallic condition was later confirmed by pairing colonies of the same strain, so that the possibility of a mixed culture was rejected. The genotypes for the allozymes glucose-6-phosphate isomerase (*Gpi*) and peptidase (*Pep*) were identified in electrophoresis of cellulose acetate (Goodwin *et al.*, 1995). The genotypes of each isolate for *Pep* and *Gpi* were deduced according to the quantity, migration, and intensity of the bands. North American genotypes US-1, US-6, US-7 and US-8 were used as references.

Sensitivity to metalaxyl

The response of the isolates to metalaxyl was evaluated according to the criteria of Shattock (1998), based on the relative mycelial growth in the presence of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of active ingredient (*a.i.*), considering the growth of a control (without the fungicide) as 100%. The isolates were classified as sensitive to metalaxyl (S), moderately resistant (MR) and highly resistant (HR) if their diameter of radial growth was < 10%, 10 to 60% and > 60% of the control.

Genetic distances

A Rogers' modified analysis of genetic distances was made to estimate the similarity coefficient and identity index of the populations of the pathogen. The genetic differentiation was constructed with a

evaluar la resistencia genética de especies silvestres de *Solanum* a *P.i.* bajo condiciones naturales en el Valle de Toluca de México; b) caracterizar los aislamientos de *P.i.* obtenidos de tales especies silvestres; c) identificar las especificidades hospedante-patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Bajo una infección natural y un ambiente de temporal, durante el verano del 2000, tan pronto como se manifestó la enfermedad, en un periodo de dos meses (julio-agosto) se obtuvieron 58 aislamientos de *P.i.* de lesiones simples de seis especies silvestres de *Solanum* (*S. phureja*, n= 24; *S. acaule*, n= 18; *S. bulbocastanum*, n= 4; *S. caripense*, n= 5; *S. muricatum*, n= 5; *S. andreaeanum*, n= 2) plantadas *ex-profeso* en una parcela con 100 plantas/especie en la Estación Experimental PICTIPAPA-ICAMEX-INIFAP en el Valle de Toluca. Se obtuvo cultivo puro incubando la superficie esterilizada del tejido foliar enfermo en rebanadas de papa por dos días, y transfiriéndolo al medio selectivo agar-centeno (Grünwald *et al.*, 2001).

Severidad de la enfermedad

Se monitoreó semanalmente el área foliar enferma con respecto al total del follaje de todas las plantas, y se evaluó de acuerdo con la escala de Henfling (1987).

Grupo de compatibilidad y análisis de aloenzimas

Para determinar los grupos de compatibilidad (GC), se aparearon los aislamientos con un tipo conocido de compatibilidad (A1 y A2) en un medio de agar centeno. Si se observaron oosporas después de dos semanas, entonces la variedad desconocida se identificó como la opuesta a cual se había sido confrontado, y si producía oosporas con ambos tipos conocidos, se clasificó como homotático. Esta condición homotática se confirmó después por colonias apareadas de la misma variedad, y así se rechazó la posibilidad de un cultivo mezclado. Los genotipos para las aloenzimas glucosa-6-fosfato-isomerasa (*Gpi*) y peptidasa (*Pep*) se identificaron en electroforesis de acetato de celulosa (Goodwin *et al.*, 1995). Los genotipos de cada aislamiento para *Pep* y *Gpi* se dedujeron de acuerdo con la cantidad, migración e intensidad de las bandas. Los genotipos norteamericanos US-1, US-6, US-7 y US-8 se usaron como referencias.

Sensibilidad al metalaxil

Se evaluó la respuesta de los aislamientos al metalaxil de acuerdo al criterio de Shattock (1998), basado sobre el crecimiento micelial relativo en la presencia de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente activo (*i.a.*), considerando el crecimiento de un testigo (sin el fungicida) como 100%. Los aislamientos se clasificaron como sensibles al metalaxil (S), moderadamente resistente (MR) y altamente resistente (AR) si el diámetro del crecimiento radial era < 10%, 10 al 60% y > 60% del testigo.

combination of mating type, *Gpi* and *Pep* loci for the *P.i.* population from every *Solanum* host. The A1 mating type was considered as heterozygous, and A2 homozygous (Fabritius and Judelson, 1997; Judelson, 1996)

RESULTS AND DISCUSSION

Disease severity

Although *S. phureja* and *S. acaule* have been reported as resistant to *P. infestans* (Hawkes, 1994; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998), these species were susceptible to the pathogen under natural infection in the Toluca Valley, due perhaps to a great diversity of the oomycete not available outside the Valley (Figure 1a, b). However, this variation in the severity of the infection by *P. infestans* among individuals of a clone is typical of the wild species, independently of their level of resistance to the pathogen (Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997). Even so, their use in breeding programs should not be overlooked in those regions where the oomycete is not as variable and aggressive as in the Mexican High Plateau. The clones of *S. bulbocastanum*, *S. caripense*, *S. andreanum* and *S. muricatum* can be considered highly resistant to *P. infestans* because of the low attack severity in these species (Figure 1 c). This resistance confirms previous reports (Flores-Crespo, 1969; Goodwin, 1996; Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998).

Mating type (MT) and allozyme genotype profile

From a total of 58 isolates, 19 different multilocus genotypes were identified according to mating type and allozyme profiles (Table 1), all of which had been previously reported (Grünwald *et al.*, 2001). Two North American genotypes were detected: US-1, with a frequency of 10.3% in *S. phureja* and *S. muricatum*; US-8, considered a highly aggressive genotype in the United States, with a frequency of 1.7% in *S. phureja* (genotype 6, Table 1). If the designation of US groups is based only on the *Gpi* profile (Larkin and Groves, 2003), then the US-8 was also identified in genotypes number 13 and 16 (Table 1) in *S. phureja* and *S. caripense*, in frequencies of 3.4% and 1.7%, respectively. Excluding the homothallic isolates, the proportion found for the mating types A1:A2 for the whole population was 1:0.9 ($p > \chi^2 = 0.68$), close to the 1:1 reported by many authors. Homothallic isolates made up 8% of the population. In *S. phureja* an A1:A2 proportion of 0.6:1 was present. In *S. acaule* it was 1:1 and in *S. caripense*, 0.25:1. *S. bulbocastanum*, *S. muricatum* and *S. andreanum* were infected only by

Distancias genéticas

Se hizo un análisis modificado de distancias genéticas de Rogers para estimar el coeficiente de similaridad y el índice de identidad de las poblaciones del patógeno. La diferenciación genética fue construida con una combinación del grupo de compatibilidad, los loci *Gpi* y *Pep* para la población *P.i.* de cada hospedante de *Solanum*. El grupo de compatibilidad A1 fue considerado como heterocigoto, y el A2 homocigoto (Fabritius y Judelson, 1997; Judelson, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Severidad de la enfermedad

Aunque se ha reportado *S. phureja* y *S. acaule* como resistentes a *P. infestans* (Hawkes, 1994; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998), estas especies fueron susceptibles al patógeno bajo infección natural en el Valle de Toluca, debido quizás a una gran diversidad del oomiceto no disponible fuera del Valle (Figura 1a, b). Sin embargo, esta variación en la severidad de la infección por *P. infestans* entre individuos de un clon es típica de las especies silvestres, independientemente de su nivel de resistencia al patógeno (Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997). Aun así, su uso en programas de mejoramiento no se debería pasar por alto en aquellas regiones donde el oomiceto no es tan variable y agresivo como en el altiplano mexicano. Los clones de *S. bulbocastanum*, *S. caripense*, *S. andreanum* y *S. muricatum* se pueden considerar altamente resistentes a *P. infestans* debido a la baja severidad de ataque en estas especies (Figura 1 c). Esta resistencia confirma reportes anteriores (Flores-Crespo, 1969; Goodwin, 1996; Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997; Ruiz de Galarreta *et al.*, 1998).

Grupo de compatibilidad (GC) y perfil del genotipo de la aloenzima

De un total de 58 aislamientos se identificaron 19 diferentes genotipos multilocus de acuerdo al grupo de compatibilidad y al perfil de aloenzimas (Cuadro 1), todos previamente reportados (Grünwald *et al.*, 2001). Se detectaron dos genotipos norteamericanos; US-1, con una frecuencia de 10.3% en *S. phureja* y *S. muricatum*; US-8, considerado un genotipo altamente agresivo en EE.UU., con una frecuencia de 1.7% en *S. phureja* (genotipo 6, Cuadro 1). Si la designación del grupo US se basa sólo en el perfil de *Gpi* (Larkin y Groves, 2003), entonces el US-8 también se identificó en los genotipos número 13 y 16 (Cuadro 1) en *S. phureja* y *S. caripense*, en frecuencias de 3.4% y 1.7%, respectivamente. Excluyendo los aislamientos homotalicos, la proporción encontrada para los grupos

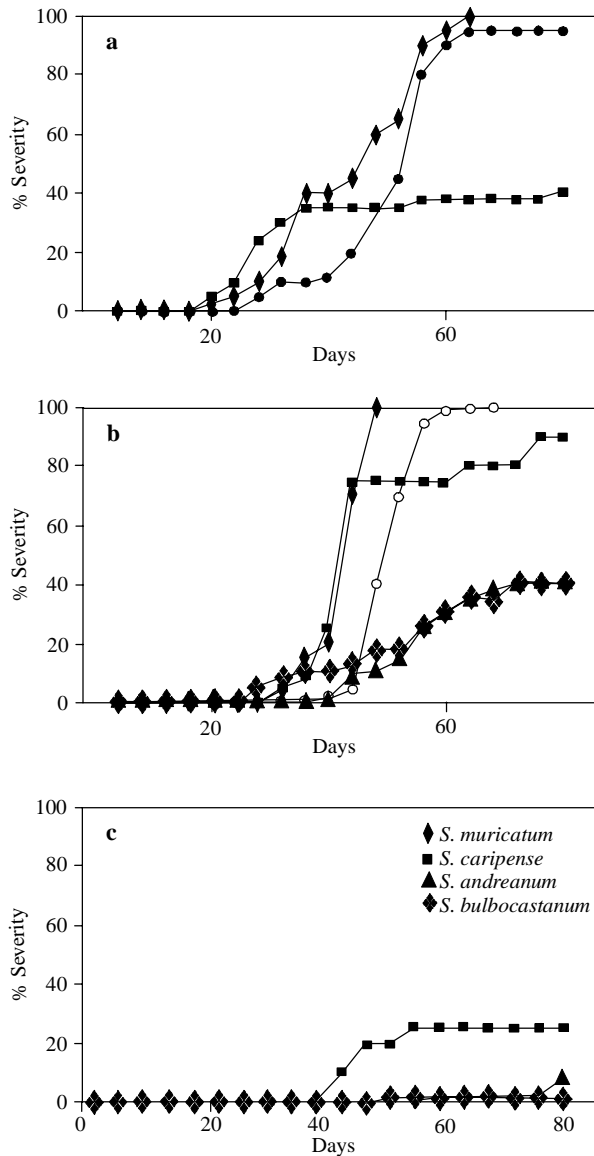


Figure 1. Disease progress by *P. infestans*: a) *S. phureja*, four clones; b). *S. acaule*, four clones; c) other species.

Figura 1. Progreso de la enfermedad por *P. infestans*. a) *S. phureja*, cuatro clones; b). *S. acaule*, cuatro clones; c) otras especies.

A1 strains. Of the 24 isolates obtained from *S. phureja*, 13 genotypes were identified, practically a different type for every two isolates. Of the A2 mating type, 100/100, 100/100 (*Gpi*, *Pep*) was dominant, with a frequency of 22%, and also included US-8, which is aggressive in the United States, and is common in northern México (Goodwin *et al.*, 1994a). In *S. acaule*, nine multilocus genotypes were found in the *P. infestans* population, of which 22% was A2, 100/100, 100/100. In *S. bulbocastanum* and *S. caripense*, no genotype in particular was

de compatibilidad A1:A2 para la población entera fue 1:0.9 ($p > \chi^2 = 0.68$), cercana a la 1:1 reportada por muchos autores. Los aislamientos homotáticos constituyeron 8% de la población. En *S. phureja* se presentó una proporción A1:A2 de 0.6:1. En *S. acaule* esta fue 1:1 y en *S. caripense*, 0.25:1. *S. bulbocastanum*, *S. muricatum* y *S. andreanum* fueron infectados sólo por las variedades A1. De los 24 aislamientos obtenidos de *S. phureja*, se identificaron 13 genotipos, prácticamente un tipo diferente por cada dos aislamientos. Del tipo de compatibilidad A2, 100/100, 100/100 (*Gpi*, *Pep*) fue dominante, con una frecuencia del 22% e incluido también el US-8, el cual es agresivo en EE.UU. y es común en el norte de México (Goodwin *et al.*, 1994a). En *S. acaule* se encontraron nueve genotipos multilocus en la población *P. infestans*, de los cuales 22% fue A2, 100/100, 100/100. En *S. bulbocastanum* y *S. caripense*, ningún genotipo en particular fue predominante. En *S. muricatum*, el único genotipo obtenido fue A1 86/100, 92/100, correspondiente al genotipo US-1, considerada la variante del patógeno extraída de México en los años de 1840 y diseminada alrededor del mundo (Goodwin *et al.*, 1994a; Goodwin *et al.*, 1994b).

Los dos aislamientos de *S. andreanum* obtenidos en este trabajo fueron A1, 86/100, 100/100. Este perfil fue el genotipo dominante para la población total del oomiceto en este estudio, de acuerdo con reportes para *S. tuberosum* (Grünwald *et al.*, 2001; Lozoya-saldaña *et al.*, 2003; Tooley *et al.*, 1985).

Resistencia al metalaxil

Según Shattock (1998) y basado en el porcentaje de crecimiento micelial en la presencia de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil, la mayoría de las variedades de *P.i.* fueron de moderada a altamente resistentes al fungicida, aunque *S. bulbocastanum* y *S. andreanum* fueron infectadas sólo por aislamientos moderadamente resistentes (Figura 2).

Relaciones entre el grupo de compatibilidad (GC) y la respuesta al metalaxil

En *S. phureja*, 29% de los aislamientos del GC A1 fue moderadamente resistente, donde 9% de los aislamientos fue altamente resistente al metalaxil. En el grupo del tipo de apareamiento A2, 34% de los aislamientos fue altamente resistente al fungicida, así como a un aislamiento homotático (Figura 3a). La población de *S. acaule* se caracterizó por presentar más del 34% de los aislamientos moderadamente resistentes al metalaxil en el grupo A1. Además, 6% de los aislamientos de este mismo tipo de compatibilidad fue

Table 1. Frequencies of genotypes of *P. infestans* per *Solanum* host.
Cuadro 1. Frecuencia de genotipos de *P. infestans* por hospedante *Solanum*.

Genotype	MT	Gpi	Pep	Number	Frequency (%)	Host species
1	A2	100/100	100/100	9	15.5	<i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i>
2	A2	86/100	92/100	4	6.8	<i>S. phureja</i> , <i>S. caripense</i>
3	A2	86/122	92/100	4	6.8	<i>S. phureja</i> , <i>S. caripense</i>
4	A2	86/100	100/100	4	6.8	<i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i> , <i>S. caripense</i>
5	A2	86/122	96/100	2	3.4	<i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i>
6 [†]	A2	100/111/122	100/100	1	1.7	<i>S. phureja</i>
7	A2	86/86	100/100	1	1.7	<i>S. acaule</i>
8	A1	86/100	100/100	6	10.3	<i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i> , <i>S. bulbocastanum</i> , <i>S. andreanum</i>
9 [‡]	A1	86/100	92/100	6	10.3	<i>S. phureja</i> , <i>S. muricatum</i>
10	A1	100/100	100/100	4	6.8	<i>S. acaule</i>
11	A1	86/122	96/100	4	6.8	<i>S. acaule</i> , <i>S. bulbocastanum</i>
12	A1	86/122	100/100	3	5.1	<i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i>
13 [†]	A1	100/111/122	100/100	2	3.4	<i>S. phureja</i>
14	A1	83/100	100/100	1	1.7	<i>S. phureja</i>
15	A1	86/100	96/100	1	1.7	<i>S. bulbocastanum</i>
16 [†]	A1	100/111/122	92/100	1	1.7	<i>S. caripense</i>
17	Hom	86/122	100/100	2	3.4	<i>S. phureja</i>
18	Hom	83/100	100/100	2	3.4	<i>S. acaule</i>
19	Hom	86/86	100/100	1	1.7	<i>S. phureja</i>

[†] US-8.

[‡] US-1.

Hom: homothallic.

predominant. In *S. muricatum*, the only genotype obtained was A1 86/100, 92/100, corresponding to the genotype US-1, considered to be the variant of the pathogen extracted from México in the 1840s and disseminated around the world (Goodwin *et al.*, 1994a; Goodwin *et al.*, 1994b).

The two isolates from *S. andreanum* obtained in this work were A1, 86/100, 100/100. This profile was the dominant genotype for the total population of the oomycete in this study, in agreement with reports for *S. tuberosum* (Grünwald *et al.*, 2001; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2003; Tooley *et al.*, 1985).

Resistance to metalaxyl

Following Shattock (1998) and based on the percentage of mycelial growth in the presence of 10 µg mL⁻¹ of metalaxyl, most of the *P.i.* strains were moderately to highly resistant to the fungicide, although *S. bulbocastanum* and *S. andreanum* were infected only by moderately resistant isolates (Figure 2).

Relationship between mating type (MT) and the response to metalaxyl

In *S. phureja*, 29% of the isolates of the A1 mating type was moderately resistant, where 9% of these isolates was highly resistant to metalaxyl. In the A2

susceptible, mientras en el grupo A2 23% fue moderadamente resistente y 18% altamente resistente, como la mayoría de los aislamientos homotálicos (Figura 3b). En *S. muricatum*, el 100% de sus aislamientos fue A1, del cual 60% fue moderadamente susceptible al metalaxil y 40% altamente resistente (Figura 3c). Los aislamientos de *S. bulbocastanum* y *S. andreanum* fueron todos A1 y moderadamente resistentes al metalaxil (Figura 3d, e). Veinte por ciento de los aislamientos de *S. caripense* fueron A1. Esta población fue moderadamente resistente al metalaxil, mientras el aislamiento A2 no mostró la misma respuesta (Figura 3f). La resistencia al metalaxil fue alta en poblaciones *P.i.* de *S. phureja*, *S. acaule*, *S. muricatum* y *S. caripense*, principalmente en los aislamientos homotálicos, seguida por los A2 y en un alcance menor en los A1, como lo reportado por Deahl *et al.* (1995), pero no por Hermansen *et al.* (2000), quienes encontraron una mayor resistencia al metalaxil en los aislamientos A1. En *S. bulbocastanum* y *S. andreanum*, todos los aislamientos fueron A1 y moderadamente resistentes al metaxil.

Agrupamiento genético

Las poblaciones de *P. infestans* aisladas de *S. phureja* y *S. acaule* (ambas especies de origen andino) estuvieron estrechamente relacionadas, con un coeficiente de similaridad de 0.0183 y un índice de identidad de 0.98. Además, sus proporciones de poblaciones

mating type group, 34% of the isolates was highly resistant to the fungicide, so as a homothallic isolate (Figure 3a). The *S. acaule* population was characterized by presenting more than 34% of the isolates moderately resistant to metalaxyl in the A1 group. Furthermore, 6% of the isolates of this same mating type was susceptible, whereas in the A2 group 23% was moderately resistant and 18% was highly resistant, as most of the homothallic isolates (Figure 3b). In *S. muricatum*, 100% of its isolates was A1, of which 60% was moderately susceptible to metalaxyl and 40% highly resistant (Figure 3c). The isolates of *S. bulbocastanum* and *S. andreaeanum* were all A1 and moderately resistant to metalaxyl (Figure 3 d,e). Twenty percent of the *S. caripense* isolates was A1. This population was moderately resistant to metalaxyl, whereas the A2 isolates did not show the same response (Figure 3f). Resistance to metalaxyl was high in *P. i.* populations from *S. phureja*, *S. acaule*, *S. muricatum* and *S. caripense*, mainly in the homothallic isolates, followed by A2's and to a lesser extent in A1's, as reported by Deahl *et al.* (1995), but not by Hermansen *et al.* (2000), who found a greater resistance to metalaxyl in A1 isolates. In *S. bulbocastanum* and *S. andreaeanum*, all of the isolates were A1 and moderately resistant to metalaxyl.

Genetic clustering

P. infestans populations isolated from *S. phureja* and *S. acaule* (both species of Andean origin) were closely related, with a similarity coefficient of 0.0183 and an identity index of 0.98. Furthermore, their proportions of MT populations were close to 1:1, in both groups showed resistance to metalaxyl, and their more frequent multilocus genotype was A2, 100/100, 100/100. *P. i.* isolated from *S. bulbocastanum* (line 3 in Figure 4), of Mexican origin, and *S. andreaeanum* (line 4) from South America, had a similarity coefficient of 0.0638 and an identity index of 0.9382. All of the isolates of these species were A1 and moderately resistant to metalaxyl. Provided these species were resistant to the pathogen, they would be good sources of resistance to *P. infestans*. The point of intersection between populations 1, 2, 3 and 4 presents a similarity coefficient of 0.0949. The similarity coefficient between these populations and the population of the South American species *S. muricatum* is 0.1684, which is due to the fact that the isolates of *S. muricatum* were 100% A1 with multilocus genotype 86/100, 92/100, and resistant to metalaxyl. The population of *S. caripense*, also South American, presents a similarity coefficient of 0.1835 with the rest of the populations.

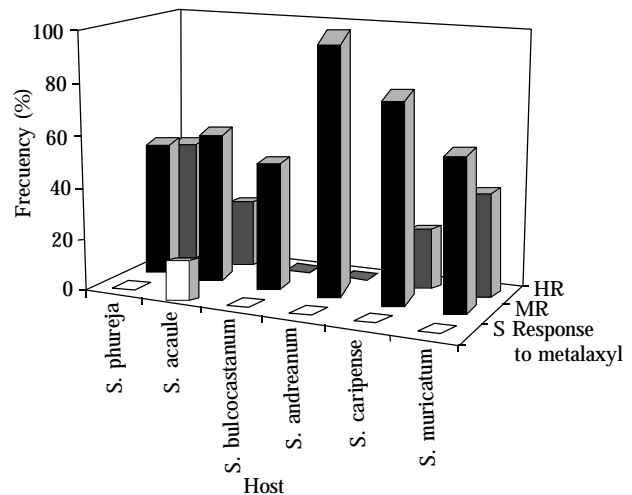


Figure 2. Distribution frequency of growth of *P. infestans* in the presence of metalaxil at 10 µg mL⁻¹ a. i.: S, susceptible; MR, moderately resistant; HR, highly resistant.

Figura 2. Distribución de la frecuencia del crecimiento de *P. infestans* en la presencia de metalaxil a 10 µg mL⁻¹ i.a.: S, susceptible; MR, moderadamente resistente; HR, altamente resistente.

GC fueron cercanas a 1:1, en ambos grupos se mostró resistencia al metalaxil, y su genotipo multilocus más frecuente fue A2, 100/100, 100/100. *P. i.* aislado de *S. bulbocastanum* (línea 3 Figura 4), de origen mexicano, y *S. andreaeanum* (línea 4) de América del Sur, tuvieron un coeficiente de similaridad de 0.0638 y un índice de identidad de 0.9382. Todos los aislamientos de estas especies fueron A1 y moderadamente resistentes al metalaxil. Si estas especies fueran resistentes al patógeno, serían buenas fuentes de resistencia a *P. infestans*. El punto de intersección entre poblaciones 1, 2, 3 y 4 presenta un coeficiente de similaridad de 0.0949. El coeficiente de similaridad entre estas poblaciones y las de la especie *S. muricatum* de América del Sur es 0.1684, lo cual se debe a que los aislamientos de *S. muricatum* fueron 100% A1 con genotipo multilocus 86/100, 92/100, y resistente al metalaxil. La población de *S. caripense*, también sudamericana, presenta un coeficiente de similaridad de 0.1835 con el resto de las poblaciones.

CONCLUSIONES

No se expresó resistencia a *P. i.* para especies de *Solanum* incluidas en este estudio bajo condiciones naturales en el Valle de Toluca, ni fue uniforme entre clones de una misma especie. *S. phureja* y *S. acaule* mostraron variación en su resistencia al oomiceto. *S. andreaeanum*, *S. muricatum*, *S. caripense* y *S. bulbocastanum* fueron resistentes. Se identificó la

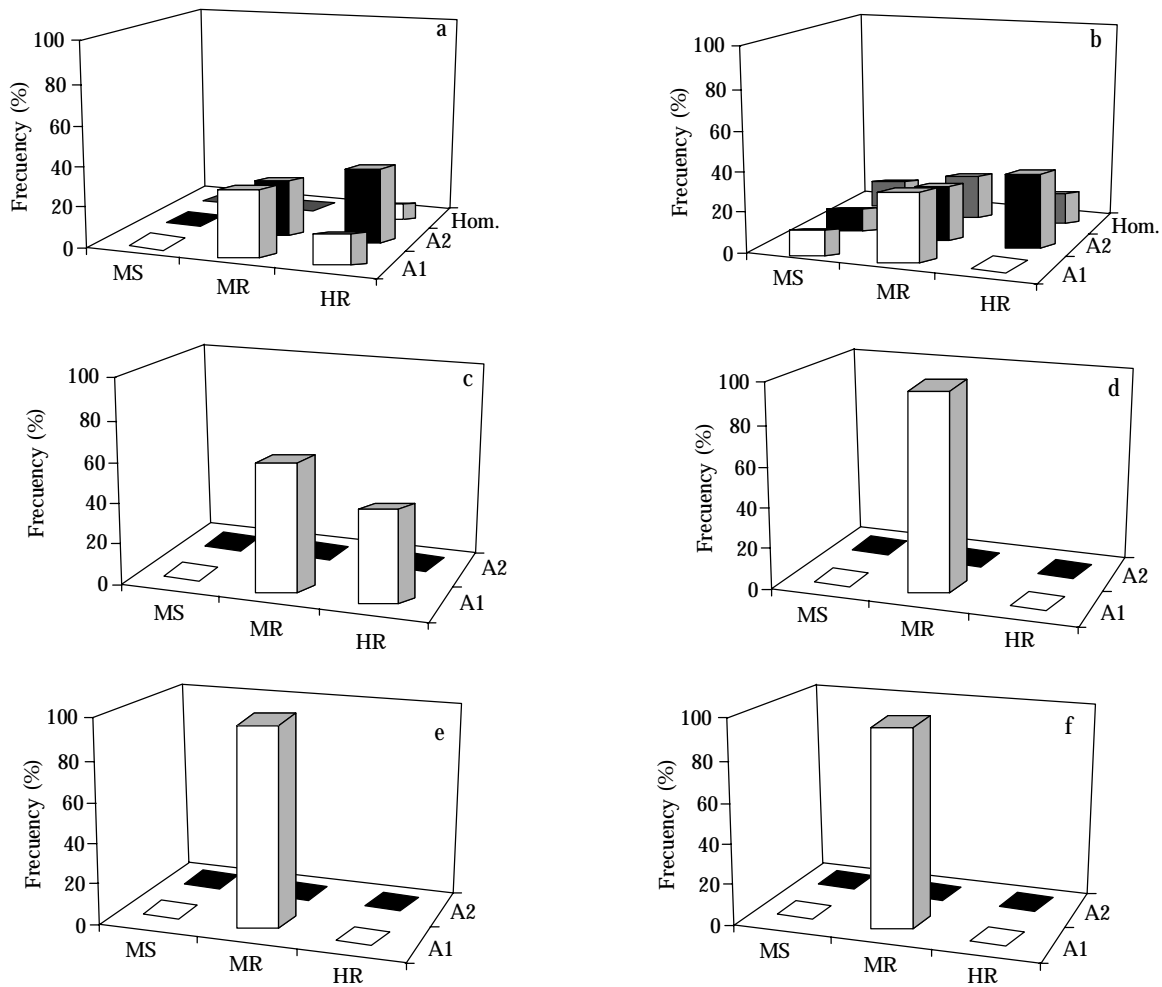


Figure 3. *P.i.* mating type and response to metalaxyl, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a.i.: a) from *S. phureja*; b) from *S. acaule*; c) from *S. muricatum*; d) from *S. bulbocastanum*; e) from *S. andreanum*; f) from *S. caripense*. MS, metalaxyl susceptible; MR moderately resistant; HR, highly resistant.

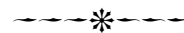
Figura 3. Grupo de compatibilidad de *P.i.* y respuesta al metalaxil, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ i.a.: a) de *S. phureja*; b) de *S. acaule*; c) de *S. muricatum*; d) de *S. bulbocastanum*; e) de *S. andreanum*; f) de *S. caripense*. MS, susceptible al metalaxil; MR, moderadamente resistente; HR, altamente resistente.

CONCLUSIONS

Resistance to *P. i.* for the *Solanum* species included in this study was not expressed under the natural conditions of the Toluca Valley, nor it was uniform among clones of a same species. *S. phureja* and *S. acaule* showed variation in their resistance to the oomycete. *S. andreanum*, *S. muricatum*, *S. caripense* and *S. bulbocastanum* were resistant. Host-pathogen specificity was identified only in the isolates from *S. muricatum*. The *P.i.* population under study, mostly of sexual origin, showed high genetic diversity and a close to 1:1 mating type ratio. Regardless the host from which the strains were obtained, the highest

especificidad hospedante-patógeno sólo en los aislamientos de *S. muricatum*. La población *P.i.* estudiada, mayormente de origen sexual, mostró alta diversidad genética y una proporción de grupos de compatibilidad cercana al 1:1. Cualquiera que sea el hospedante del cual se obtuvieron las variedades, la resistencia más alta al metalaxil se observó en poblaciones homotálicas, seguidas por las del tipo de compatibilidad A2.

—Fin de la versión en Español—



resistance to metalaxyl was observed in homothallic populations, followed by those of the A2 mating type.

LITERATURE CITED

- Colon, L. T., R. C. Jansen, and D. J. Budding. 1995. Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrid progenies of four South American *Solanum* species crossed with diploid *S. tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 691-698.
- Davidse, L. C., D. L. Danial, and C. J. Van Westen. 1983. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 1-20.
- Deahl, K. L., S. P. DeMuth, and A. Rivera-Peña. 1995. Identification of mating types and metalaxyl resistance in North American population of *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.* 72: 35-49.
- Erselius, L. J., M. E. Vega-Sánchez, and G. A. Forbes. 2000. Stability in population of *Phytophthora infestans* attacking tomato in Ecuador demonstrated by cellulose acetate assessment of glucose-6-phosphate isomerase. *Plant Dis.* 84: 325-327.
- Fabritius, A. L., and H. S. Judelson. 1997. Mating type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normal in *Phytophthora parasitica*: Implications for models of mating type determination. *Curr. Genet.* 32: 60-65.
- Flier, W. G., N. J. Grünwald, 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-Crespo, R. 1969. Taxonomía, distribución y potencial de los *Solanum* tuberíferos silvestres de México. *Inst. Nal. de Investigaciones Agrícolas, SAG, México.* 33 p.
- Fry, W. E., S. B. Goodwin, J. M. Matuszak, L. J. Spielman, and M. G. Milgroom. 1992. Population genetics and intercontinental migration of *Phytophthora infestans*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 107-129.
- Gallegly, M. E., and J. A. Galindo. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in México. *Phytopathology* 48: 274-276.
- Goodwin, S. B., B. A. Cohen, K. L. Deahl, and Fry, W. E. 1994 a. Migration from northern México as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84: 553-558.
- Goodwin, S. B., B. A. Cohen, and W. E. Fry. 1994 b. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:11591-11595.
- Goodwin, S. B., R. E. Schneider, and W. E. Fry. 1995. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of alloenzyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 79: 1181-1185.
- Goodwin, S. B. 1996. Origin and Ecology of *Phytophthora infestans*. *Rev. Mex. Fitopatol* 14: 143-147.
- Grünwald, N. J., W. C. Flier, A. K. Strurbaum, E. Garay-Serrano, T. B. M. van de Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, H. Lozoya-Saldaña, L. J. Turkensteen, and W. E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central México. *Phytopathology* 91: 882-890.
- Hawkes, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationship. *In: Potato Genetics.* Bradshaw, J. E., and G. R. Mackay. (eds). Cab International. U. K. pp: 3-42.
- Henfling, J. W. 1987. Late blight of potato. Technical information bulletin 4. International Potato Center (CIP). Lima Perú. 25 p.
- Hermansen, A., A. Hannukkala, N. R. Hafskjold, and M. B. Brurberg. 2000. Variation in population of *Phytophthora infestans*

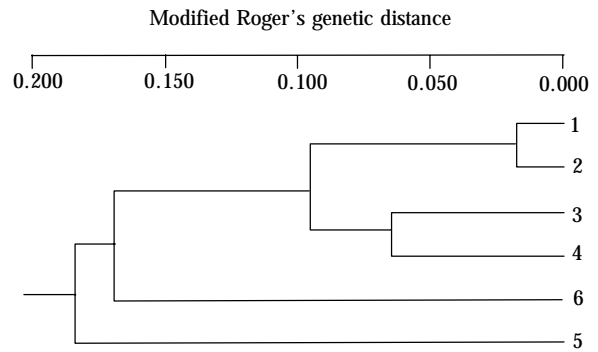


Figure 4. Unweighted pair-group method with arithmetic cluster analysis of six subpopulations of *P. infestans* based on Roger's genetic distance: 1) from *S. phureja*, 2) from *S. acaule*, 3) from *S. bulbocastanum*, 4) from *S. andreamum*, 5) from *S. caripense*, 6) from *S. muricatum*.

Figura 4. Método de grupo de pares no ponderados con un análisis de agrupamiento aritmético de seis subpoblaciones de *P. infestans* basadas sobre la distancia genética de Roger: 1) de *S. phureja*, 2) de *S. acaule*, 3) de *S. bulbocastanum*, 4) de *S. andreamum*, 5) de *S. caripense*, 6) de *S. muricatum*.

in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathol.* 49: 11-22.

- Judelson, H. S. 1996. Genetic and physical variability at the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Genetics* 144: 1005-1013.
- Larkin, R. P., and C. L. Groves. 2003. Identification and characterization of isolates of *Phytophthora infestans* using fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Plant Dis.* 87: 1233-1243.
- Lozoya-Saldaña, H., A. Hernández, R. Flores, and J. Bamberg. 1997. Late blight on wild *Solanum* species in the Toluca Valley in 1996. Abstract, 81 Annual Meeting of the Potato Association of America, Prince Edward Island. Canada.
- Lozoya-Saldaña, H., N. J. Grünwald, E. Garay-Serrano, A. K. Sturbaum-Abud, and C. Brown. 2003. Population substructuring of *Phytophthora infestans* on American potato clones in the Toluca Valley, México. *Acta Hort.* 619: 183-188.
- Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans*, the Mexican connection. *In: Symposium of the British Micological Society, the British Society for Plant Pathology, and the Society of Irish Plant Pathologist.* Lucas, J. A., R. C. Shattock., D. S. Shaw., and L. R. Cooke (eds). Cambridge University Press. United Kingdom. 447 p.
- Ruiz de Galarreta, J. L., A. Carrasco, A. Salazar, I. Barrena, E. Iturrirxa, R. Marquínez, F. J. Gorburu, and E. Ritter. 1998. Wild *Solanum* species as resistance sources against different pathogens of potato. *Potato Res* 41: 57-68.
- Shattock, R. C. 1998. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 37: 4-11.
- Spielman, L. J., A. Drenth, L. C. Davidse L. J. Sjukowskis, W. Gu, P. W. Tooley, and W. E. Fry. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*?. *Plant Pathol.* 40: 422-430.
- Tooley, P. W., W. E. Fry, and M. J. Villareal. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* population. *J. Hered.* 76: 431-435.