

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

## INFORME FINAL

Mejoramiento genético de tomate para resistencia al tizón tardío causado por genotipos de  
*Phytophthora infestans* colectados en Guatemala.

### **Equipo de investigación**

**Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez**

**Coordinador**

**M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután**

**Investigador**

**Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval**

**Investigador**

Guatemala marzo de 2018

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales  
Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
Coordinador del Programa de Ciencias Básicas

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez  
Coordinador del Proyecto

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután  
Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval  
Investigador

Partida presupuestaria

4.8.63.4.09

Año de ejecución: 2017

## Índice

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Introducción .....  | 3  |
| 2     | Objetivos .....   | 4  |
| 2.1   | General .....   | 4  |
| 2.2   | Específicos .....   | 4  |
| 3     | Marco teórico y estado del arte .....   | 5  |
| 3.1   | Tipos de apareamiento .....   | 5  |
| 3.2   | Patogenicidad.....  | 7  |
| 3.3   | Control del tizón tardío .....  | 7  |
| 3.4   | Fungicidas de contacto.....   | 8  |
| 3.5   | Mejoramiento genético para resistencia al tizón tardío del tomate .....   | 8  |
| 3.6   | Genes de resistencia al tizón tardío .....  | 8  |
| 3.7   | Métodos de selección de plantas resistentes.....  | 9  |
| 4     | Materiales y métodos.....   | 10 |
| 4.1   | Descripción y delimitación en tiempo y espacio de la investigación .....  | 10 |
| 4.2   | Tipo de investigación .....   | 10 |
| 4.3   | Materiales de tomate .....  | 11 |
| 5     | Técnicas e instrumentos .....   | 11 |
| 5.1   | Aislamiento de <i>P. infestans</i> , proveniente de las zonas productoras de<br>tomate y papa en Guatemala.....   | 11 |
| 5.2   | Extracción de ADN .....   | 12 |
| 5.3   | Determinación del tipo de apareamiento (A1 o A2) en los aislados de<br><i>P. infestans</i> .....  | 13 |
| 5.4   | Caracterización genotípica por medio de polimorfismo en la longitud de los<br>fragmentos amplificados (AFLP) de los aislados de <i>P. infestans</i> ..... | 14 |
| 5.5   | Análisis de datos moleculares .....   | 15 |
| 5.6   | Generación de inóculo de cada genotipo <i>P. infestans</i> , para inoculación<br>de plantas .....   | 15 |
| 5.7   | Selección de genotipos de tomate para evaluación de resistencia al tizón tardío<br>causado por genotipos de <i>P. infestans</i> .....                     | 15 |
| 5.8   | Ensayo para evaluación de resistencia al tizón tardío causado por genotipos<br>de <i>P. infestans</i> .....   | 16 |
| 5.9   | Generación de híbridos .....  | 17 |
| 5.10  | Evaluación de resistencia de los híbridos generados al tizón tardío .....   | 17 |
| 6     | Resultados .....  | 17 |
| 6.1   | Aislamiento de <i>P. infestans</i> provenientes de algunas zonas productoras de<br>tomate y papa en Guatemala.....  | 17 |
| 6.2   | Determinación del tipo de apareamiento (A1 o A2) en los aislados de<br><i>P. infestans</i> .....  | 19 |
| 6.2.1 | Determinación por el método molecular .....   | 19 |
| 6.2.2 | Determinación por método de apareamiento <i>in vitro</i> de aislamientos vivos.....   | 20 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 6.3 | Caracterización genotípica por medio de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) de los aislados de <i>P. infestans</i> ..... | 22 |
| 6.4 | Evaluación de resistencia genética de diferentes materiales de tomate .....  | 23 |
| 6.5 | Generación de híbridos de tomate .....   | 27 |
| 6.6 | Matriz de resultados .....   | 30 |
| 6.7 | Impacto esperado .....   | 31 |
| 7   | Análisis y discusión de resultados .....   | 32 |
| 7.1 | Aislamiento de <i>P. infestans</i> provenientes de algunas zonas productoras de tomate y papa en Guatemala .....                                       | 32 |
| 7.2 | Determinación del tipo de apareamiento (A1 o A2) en los aislados de <i>P. infestans</i> por apareamiento in vitro y método molecular .....             | 32 |
| 7.3 | Caracterización genotípica por medio de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) de los aislados de <i>P. infestans</i> ..... | 34 |
| 7.4 | Evaluación de resistencia genética de diferentes materiales de tomate .....  | 36 |
| 7.5 | Generación de híbridos de tomate .....   | 37 |
| 8   | Conclusiones .....   | 38 |
| 9   | Referencias .....  | 39 |
| 10  | Apéndices .....  | 46 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Electroforesis en gel de agarosa con los segmentos de ADN de <i>P. infestans</i> amplificados con los cebadores S1a y S1b.....                | 19 |
| Figura 2 Dendograma (UPGMA) generado a partir de 22 aislamiento de <i>P. infestans</i> mediante el marcador molecular AFLP.....                        | 22 |
| Figura 3. Área foliar afectada de cada material de tomate inoculado con 3 aislados de <i>P. infestans</i> .....  | 25 |
| Figura 4. Prueba de Tukey para evaluación de la resistencia genética de 14 materiales de tomate inoculados con 3 aislados de <i>P. infestans</i> ..... | 26 |
| Figura 5 Prueba de Tukey para evaluación de la agresividad de 3 aislados de <i>P. infestans</i> sobre 14 materiales de tomate.....                     | 27 |
| Figura 6 Área foliar afectada de cada híbrido de tomate inoculado con 3 aislados de <i>P. infestans</i> .....  | 28 |
| Figura 7 Prueba de Tukey para evaluación de la resistencia genética de 4 híbridos de tomate inoculados con 3 aislados de <i>P. infestans</i> .....     | 29 |
| Figura 8 Prueba de Tukey para evaluación de la agresividad de 3 aislados de <i>P. infestans</i> sobre 4 híbridos de tomate.....                        | 29 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 Materiales de tomate utilizados para pruebas de resistencia genética y generación de híbridos.....  | 12 |
| Tabla 2 Lista de aislados de <i>P. infestans</i> obtenidos en diferentes regiones productoras de tomate y papa de Guatemala.....  | 18 |
| Tabla 3 Determinación del tipo de apareamiento de los aislados de <i>P. infestans</i> a través de la amplificación del locus S1.....  | 20 |
| Tabla 4 Resumen de prueba de apareamiento in vitro con cepas control A1 y A2 para la determinación del tipo de apareamiento de los aislados de <i>P. infestans</i> .....                        | 21 |
| Tabla 5 Híbridos generados a partir de líneas puras, con características agronómicas deseables y resistencia genética a <i>P. infestans</i> .....   | 27 |
| Tabla 6 Matriz de resultados del proyecto: Mejoramiento genético de tomate para resistencia al tizón tardío causado por genotipos de <i>Phytophthora infestans</i> colectados en Guatemala..... | 30 |
| Tabla 7 Impacto esperado del proyecto: Mejoramiento genético de tomate para resistencia al tizón tardío causado por genotipos de <i>Phytophthora infestans</i> colectados en Guatemala.....     | 31 |



Mejoramiento genético de tomate para resistencia al tizón tardío causado por genotipos de *Phytophthora infestans* colectados en Guatemala.

**Resumen**

Actualmente, una de las principales limitantes en la producción del cultivo de tomate en Guatemala es el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*. El uso de agroquímicos se ha convertido en la estrategia mayormente empleada en el control de esta enfermedad, lo que supone el uso de una alta cantidad de fungicidas, los cuales tienen implicaciones negativas en el ambiente y la salud. Aplicaciones excesivas de fungicidas conducen al desarrollo de resistencia del patógeno generando genotipos de *P. infestans* que han superado la efectividad de muchos fungicidas. La resistencia genética es una alternativa altamente efectiva y viable para minimizar estos problemas. En esta investigación se evaluó la resistencia genética, de 6 líneas mejoradas y 7 híbridos desarrollados en Estados Unidos. Los materiales fueron inoculados con tres genotipos de *P. infestans* colectados en diferentes zonas productoras de tomate y papa en Guatemala, los cuales fueron caracterizados con el marcador molecular amplified fragment length polymorphism AFLP, mostrando una alta diversidad genética del patógeno. A través del método de apareamiento *in vitro* y amplificación por PCR de una región del locus S1, se determinó la presencia de los dos tipos de apareamiento A1 y A2. La evaluación de la resistencia de los materiales de tomate mostró una alta resistencia de la mayor parte de los materiales, a excepción del híbrido Plum Regal y la línea NC25Pa que mostraron ser moderadamente susceptibles. Cuatro híbridos fueron desarrollados a partir de las líneas evaluadas, los cuales mostraron alta resistencia genética a los aislados de *P. infestans*.

**Palabras clave:** diversidad genética, tipos de apareamiento, aislados *Phytophthora infestans*, resistencia genética, híbridos de tomate

Tomato breeding for resistance to late blight caused by genotypes of *Phytophthora infestans* collected in Guatemala

**Abstract**

Currently, one of the main limitations in the production of tomato crop in Guatemala is late blight caused by *Phytophthora infestans*. The use of agrochemicals has become the strategy mostly used in the control of this disease, which involves the use of a high amount of fungicides, which have negative effects for the environment and health. Excessive applications of fungicides lead to the development of pathogen resistance generating genotypes of *P. infestans* that have exceeded the effectiveness of many fungicides. Genetic resistance is a highly effective and viable alternative to minimize these problems. In this research, the genetic resistance of 6 improved lines and 7 hybrids developed in the United States was evaluated. The materials were inoculated with 3 genotypes of *P. infestans* collected in different tomato and potato producing areas in Guatemala, which were characterized through the molecular marker amplified fragment length polymorphism AFLP showing a high genetic diversity of the pathogen. Through the method of *in vitro* mating and PCR amplification of a region of the S1 locus, the presence of the two types of mating A1 and A2 was determined. The evaluation of the resistance of the tomato materials showed a high resistance of most of the materials, with the exception of the hybrid Plum Regal and the line NC25Pa which showed to be moderately susceptible. Four hybrids were developed from the evaluated lines, which showed high genetic resistance to the isolates of *P. infestans*.

**Key words:** genetic diversity, mating type, *Phytophthora infestans* isolates, genetic resistance, tomato hybrid



## 1 Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica para Guatemala, ya que según el informe del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (Maga) en el año 2013, la cosecha de este cultivo alcanzó los siete millones de quintales, y según datos del Maga (2011) se generaron 2,693,628 jornales/año. Dada su alta rentabilidad, este cultivo es atractivo para muchos productores hortícolas, siendo los departamentos de Jutiapa y Baja Verapaz los que reportan la mayor producción a nivel nacional con un 20% cada uno, seguido de Chiquimula con el 11%, Guatemala con el 8%, Zacapa con el 7%, El Progreso y Alta Verapaz con el 6% cada uno, Jalapa con 5% y el 17% para el resto de los departamentos de Guatemala (Maga, 2013).

La producción en el cultivo de tomate se ve afectada por el efecto negativo de las plagas y enfermedades, siendo el hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) DeBary el agente causal de la devastadora enfermedad conocida como tizón tardío, sobre el cual se estima un gasto anual mundial de tres billones de dólares para su control, dado el efecto destructivo que tiene sobre las plantaciones de tomate (Barbosa, Henriques, Damiano & Gomide, 2008). El desarrollo de esta enfermedad se potencia bajo periodos húmedos y nublados con temperaturas frescas, mostrándose una infección severa cuando las condiciones de humedad se establecen en un rango de 80 a 100% y temperaturas de 18 a 22 C (Rick & Chetelat, 1995) que puede generar pérdidas de hasta el 100% (Fontem, Olanyab, Tsopmbeng, & Owona 2005).

*P. infestans* puede reproducirse de manera asexual, aunque también de manera sexual para lo cual requiere de dos tipos de apareamiento denominados A1 y A2 (Goodwin, Cohen, & Fry, 1994) los cuales, al salir de México, han generado nuevas razas más virulentas alrededor del mundo (Páez, Valverde, Gómez, & Brenes, 2004). Anualmente, los agricultores tratan de controlar el tizón tardío, haciendo un uso de grandes cantidades de fungicidas en las plantaciones de tomate y papa, conduciendo de esta manera al desarrollo de resistencia del patógeno a dichos fungicidas, agotando así las estrategias de control (Deahl, Inglis, & DeMuth, 1993; Fry et al., 1993; Niederhauser, 1993).

Actualmente, la oferta de variedades de tomate con resistencia genética a *P. infestans* es reducida y no del todo efectiva, por lo que los agricultores dependen del uso excesivo de

fungicidas, que a su vez elevan los costos de producción, generan contaminación ambiental, ponen en riesgo la salud humana e incrementan la resistencia genética del patógeno, por lo cual el desarrollo de materiales de tomate con resistencia genética a *P. infestans* representa una alternativa viable (Brouwer & St. Clair, 2004).

El propósito de esta investigación es seleccionar cultivares y líneas mejoradas de tomate con resistencia al tizón tardío causado por genotipos de *Phytophthora infestans* colectadas en Guatemala para generar híbridos con resistencia genética a dicho patógeno.

## 2 Objetivos

### 2.1 General

- Seleccionar cultivares y líneas mejoradas de tomate con resistencia al tizón tardío causado por genotipos de *Phytophthora infestans* colectados en Guatemala.

### 2.2 Específicos

- Colectar y aislar diferentes genotipos de *Phytophthora infestans* procedentes de diferentes zonas de Guatemala.
- Caracterizar genotípicamente los aislados de *Phytophthora infestans* colectados en Guatemala durante el año 2017.
- Evaluar y seleccionar genotipos de tomate con resistencia genética al tizón tardío causado por genotipos de *Phytophthora infestans* colectados en Guatemala.
- Realizar cruzamientos para generar híbridos entre las líneas de tomate que presenten resistencia al tizón tardío y buenas características agronómicas y evaluar su resistencia genética.

### 3 Marco teórico y estado del arte

La enfermedad del tomate (*S. lycopersicum*), conocida en Guatemala como tizón tardío, es causada por el oomicete *P. infestans* (Mont.) DeBary, siendo la más devastadora enfermedad de plantas reportada en la historia de la humanidad (Abad & Abad, 1995). Esta enfermedad causó la destrucción de los cultivos de papa en Irlanda en 1845 y 1846 que dio como resultado el hambre y la muerte de cientos de miles de personas, así como la emigración de más de un millón y medio de Irlandeses a los Estados Unidos (Kinealy, 1994).

*P. infestans* afecta principalmente los cultivos de papa y tomate, aunque está reportado en otras solanáceas que coexisten en el agrosistema de papa y tomate (Forbes et al., 1998). Se originó en México como patógeno en plantas nativas de la familia Solanaceae, sin embargo, *P. infestans* ha migrado en varios episodios al resto del mundo (Andrivon, 1996; Fry et al., 1993).

Es una enfermedad cosmopolita y las infecciones de tizón tardío inician como una mancha circular irregular acuosa en las hojas inferiores, así como en los brotes tiernos. En países en desarrollo limita seriamente la producción de papa y tomate (Erwin & Ribeiro, 1996; Niederhauser, 1993). El daño en el fruto puede oscilar entre el 41 al 100% de la superficie cuando el cultivo se encuentra al aire libre y sin aplicación alguna de fungicidas, mientras que en las plantaciones donde se aplican fungicidas sistémicos el daño al fruto se presenta entre el 12 y 65%; para el año 2009, en los Estados Unidos, las pérdidas totales de rendimiento alcanzaron los US\$46 y US\$66 millones para frutos frescos y procesados, respectivamente ((Nowicki, Foolad, Nowakowska, & Kozik, 2012).

Anualmente, los agricultores tratan de controlar el tizón tardío, haciendo un uso de grandes cantidades de fungicidas en las plantaciones de tomate y papa, conduciendo de esta manera al desarrollo de resistencia del patógeno a dichos fungicidas, agotando así las estrategias de control (Deahl et al., 1993; Fry et al., 1993; Niederhauser, 1993).

#### 3.1 Tipos de apareamiento

*P. infestans* es un oomicete heterotálico, esto significa que necesita de dos tipos de apareamiento conocidos como A1 y A2, necesarios para la reproducción sexual. Cada tipo de apareamiento es bisexual, capaz de producir oogonios y anteridios cuando el tipo de

apareamiento opuesto está presente, ocurriendo la fusión entre gametangios de tipos opuestos, lo cual resulta en la formación de una oospora -espora sexual-. Ambos tipos de apareamiento son considerados grupos de compatibilidad y no formas sexuales, ya que el anteridio u oogonio de un tipo puede aparearse con el oogonio o anteridio, respectivamente, del tipo opuesto (Galindo & Gallegly, 1960).

En el valle de Toluca, México ambos tipos de apareamiento se encuentran naturalmente en la misma frecuencia y la reproducción sexual es común en el campo, lo que genera una gran diversidad genética en las poblaciones de *P. infestans* (Gallegly & Galindo 1958; Goodwin, Spielman, Matuszak, Bergeron, & Fry, 1992; Niederhauser, Cervantes, & Servin, 1954; Tooley, Fry, & Villareal, 1985) considerándose a México como el centro de diversidad de este patógeno. En otras regiones fuera de México solo había prevalecido el tipo de apareamiento A1, dando origen a un único genotipo clonal distribuido mundialmente y denominado US-1, cuya reproducción es típicamente asexual (Goodwin et al., 1994).

La presencia del tipo de apareamiento A2 fuera de México fue mencionada por primera vez en Suiza en 1984 (Hohl & Iselin, 1984). Al parecer, el tipo A2 migró de México a Europa en 1976, en un cargamento de 25,000 toneladas de papa; y de Europa, se dispersó a otras partes del mundo (Goodwin, Ludwik, Sujkowski, & Fry, 1996; Hohl & Iselin, 1984) y subsecuentemente se informó en otros países de Europa y el mundo (Gisi & Cohen, 1996). Este hecho, rompió las barreras que separaban la coexistencia de ambos tipos de apareamiento y abrió la posibilidad de la reproducción sexual del patógeno fuera de México, para dar origen a genotipos más diversos y agresivos que aquellos que existían cuando la población era exclusivamente de reproducción asexual (Fry et al., 1993).

A partir de este momento, hubo un incremento en la diversidad de genotipos del patógeno y un incremento en la epidemiología de la enfermedad (Fry & Goodwin, 1997). Hoy día, se ha corroborado que la ocurrencia de la reproducción sexual de *P. infestans* fuera de México da origen a genotipos más agresivos y mejor adaptados los cuales desplazan las viejas poblaciones (Gavino et al., 2000). La reproducción sexual tiene la capacidad de incrementar la variabilidad genética, alterar la estructura de las poblaciones de *P. infestans* y generar cepas más virulentas (Samaucha & Gisi, 1987). Las poblaciones nuevas de *P. infestans* tienen mayor capacidad reproductiva, capaces de producir un mayor número de

esporas, con gran capacidad de dispersión (Abad & Abad, 1995; Davidse, Looijen, Turkensteen, & Van der Wal, 1981)

El tipo de apareamiento se puede determinar de dos formas: una es confrontando las cepas aisladas con cepas que se conoce que pertenecen al tipo de apareamiento A1 o A2 (como controles) y si forma oosporas, esto significa que el aislado en estudio pertenece al tipo de apareamiento contrario al del control (Deahl, Goth, Young, Sinden, & Gallegly, 1991). La otra forma de determinar el tipo de apareamiento es con el uso de marcadores moleculares. Judelson, Spielman y Shattock (1995) encontraron que el locus S1 en *P. infestans* está fuertemente ligado al tipo de apareamiento. Este locus se encuentra en el tipo de apareamiento A1 pero está ausente en el tipo de apareamiento A2.

Basado en su conocimiento sobre este mismo locus, Judelson (1996) desarrolló un par de cebadores para llevar a cabo una reacción PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki, et al., 1988), la cual permite la amplificación de un fragmento específico únicamente en los individuos A1. El locus S1 fue identificado por Judelson y colaboradores (1995), el cual muestra una secuencia monomérica de 1.25 Kb que evolucionó por repeticiones sucesivas a 300 Kb y que es bien conservada en el estado hemicigótico del tipo A1. Esta nueva alternativa ha sido adoptada en países como Costa Rica (Páez et al., 2004), donde se determinó que aún no existe el tipo de apareamiento A2.

### **3.2 Patogenicidad**

Existen tres componentes fundamentales para determinar la habilidad patogénica de un aislamiento: periodo de latencia, área de la lesión y esporulación después de 96 horas de haber ocurrido la inoculación (Jaramillo, 2003). En la actualidad diversos factores pueden incrementar la patogenicidad del patógeno. Entre ellos están la migración a nivel mundial de los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) de *P. infestans* (Henfling, 1987).

### **3.3 Control del tizón tardío**

El tizón tardío del tomate puede controlarse mediante la combinación de varias medidas sanitarias, variedades resistentes y aspersiones con compuestos químicos (fungicidas) aplicadas en la temporada adecuada, sin embargo, en condiciones de precipitación continua y en periodos prolongados es muy difícil controlar la enfermedad

(Agrios, 1998). Son dos los tipos de fungicidas utilizados para el control químico del tizón, los de contacto (o no sistémicos) llamados también residuales, y los sistémicos (Fernández-Northcote, Navia, & Gandarillas, 1999).

### **3.4 Fungicidas de contacto**

Se denominan fungicidas de contacto a todos los productos químicos que actúan en la superficie de las hojas (no ingresan al interior del tejido foliar), tienen efecto residual corto. No obstante, que existe un mayor conocimiento sobre la enfermedad, la presencia de nuevos genotipos altamente virulentos hace necesario caracterizar las poblaciones de *P. infestans*, para lo cual se pueden usar marcadores como tipos de apareamiento A1 y A2, sensibilidad al metalaxyl, patrones electroforéticos de aloenzimas, análisis de DNA y pruebas de virulencia (Therrien et al., 1993).

### **3.5 Mejoramiento genético para resistencia al tizón tardío del tomate**

Desde la ocurrencia de la hambruna en Irlanda en los años 1940s, ha habido un gran interés por el desarrollo de cultivares de tomate y papa con resistencia al tizón tardío. Durante este proceso se ha observado que la resistencia contra *P. infestans* puede ser clasificada en dos tipos: (a) resistencia específica contra un determinado genotipo del patógeno (también llamado resistencia vertical) (b) resistencia no específica contra un genotipo del patógeno (también llamado resistencia parcial u horizontal) (Abad & Abad, 1995).

### **3.6 Genes de resistencia al tizón tardío**

En recientes estudios moleculares del proceso de infección de *P. infestans* se determinó que algunos genes, tales como el gen RB y el gen Ph-3, a pesar de poseer resistencia vertical estos genes son capaces de activar el sistema de defensa de la planta, lo cual confiere resistencia a casi todos los aislados de *P. infestans* con las que fueron inoculados. Pero debido a la rápida evolución del patógeno producto de la reproducción sexual de *P. infestans* este genera genotipos más virulentos, la resistencia específica puede ser superada luego de unos años en el campo, por tal razón los fitomejoradores recomiendan incorporar al menos dos genes de resistencia específica en los cultivares comerciales (Hanson et al., 2016).

Fitomejoradores han reportado la presencia de ambos tipos de resistencia en tomate. Sin embargo, los genes de resistencia específica han sido prácticamente más útiles en programas de mejoramiento genético del tomate. Por lo que es muy importante la identificación de más genes de resistencia específica contra el tizón tardío para poder utilizarlos en el desarrollo de cultivares. En el año 2003, el gen denominado RB fue aislado de la especie silvestre *Solanum bulbocastanum*. Este gen es capaz de proveer resistencia genética contra todos los genotipos de *P. infestans* presente hasta el año 2010 en Estados Unidos de América (Song et al., 2003). Actualmente el gen RB no es usado en ninguna variedad comercial de tomate o de papa. La especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* (anteriormente llamada *Lycopersicon pimpinellifolium*) ha sido la fuente de cinco genes de resistencia contra el tizón tardío denominados Ph-1 (Peirce, 1971) Ph-2 (Moreau et al., 1998) Ph-3 (Black, Wang, Hanson & Chen, 1996) Ph-4 (Labate et al., 2007) y Ph-5 (Fooland et al., 2008). Los genes Ph-1 y Ph-2 son genes de resistencia específica contra un reducido número de genotipos del patógeno (Pierce, 1971; Moreau et al., 1998) mientras que el gen Ph-3 confiere una excelente resistencia a plantas de tomate cuando es inoculado con diferentes genotipos de *P. infestans* (Black et al., 1996).

En 2013 dos cultivares criollos de tomate en Estados Unidos de América, denominados *Wapsipinicon* y *Matt's Wild Cherry* demostraron muy buena resistencia al tizón tardío causado por diferentes genotipos de *P. infestans* colectados en los años 2008 al 2014 en los Estados Unidos de América. Estos dos cultivares de tomate se encuentran disponibles en el mercado en Estados Unidos de América y han sido utilizados desde los años 1960 por pequeños productores de tomate y muy frecuentemente por productores orgánicos. Se desconoce el origen y tampoco han sido mapeados estos genes de resistencia en el genoma de estos dos cultivares (Seidl, Jordan, & Gevens, 2014).

### **3.7 Métodos de selección de plantas resistentes.**

El método de selección de plantas resistentes a enfermedades debe ser efectivo, rápido de costo reducido, para poder evaluar cientos o miles de líneas mejoradas. Usualmente los métodos incluyen evaluación de la resistencia a nivel de campo abierto, bajo condiciones de presión natural de la enfermedad; puede hacerse también en invernadero con condiciones ajustadas para el desarrollo de la enfermedad y en el cual las plantas son inoculadas con una

cepa específica del patógeno y una concentración definida del patógeno. La evaluación en invernadero tiene la ventaja que se reduce la variación del efecto del clima y reduce el daño de otros patógenos presentes en campo abierto, lo cual permite evaluar únicamente el efecto de la resistencia genética de la planta contra el patógeno de interés (Hanson et al., 2016).

La técnica de inoculación a hojas en cámara húmeda, ha sido utilizada con bastante éxito y que resulta ser muy económica para evaluar resistencia genética al tizón tardío, consiste en colocar dos hojas de la planta en una caja Petri con papel toalla húmedo, esto permite mantener la humedad que el patógeno necesita para su desarrollo, las cajas Petri con las hojas inoculadas se incuban a temperatura de 22 °C, que es la temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad (Seidl et al., 2014). El número de variedades de tomate con resistencia genética conferida por los genes Ph y que se encuentran comercialmente disponibles en Estados Unidos de América es muy reducido, entre los que se puede mencionar Mountain Magic, Plum Regal, Mountain Merit, Defiant y recientemente Iron Lady; variedades que no se encuentran disponibles en Guatemala.

## **4 Materiales y métodos**

### **4.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio de la investigación**

La investigación se desarrolló de febrero a noviembre del 2017. Se realizaron colectas de *P. infestans* en los municipios de Agua blanca, Cobán, Zunil, Ipala, Jalapa, Patzicía, Patzún, Salamá, Sanarate, San Juan Ostuncalco, San Agustín Acasaguastlán, Tajumulco, Sololá y Todos Santos Cuchumatán, como puede observarse en la Tabla 2, en la cual se detalla la ubicación precisa de cada sitio de colecta.

### **4.2 Tipo de investigación**

Esta investigación es experimental aplicada, con la finalidad de poder seleccionar cultivares y líneas mejoradas de tomate que han sido desarrolladas por fitomejoradores del programa de mejoramiento genético de tomate de la Universidad de Carolina del Norte. Los cultivares evaluados existen comercialmente en los Estados Unidos de América, pero no en Guatemala. Éstos han sido reportados como resistentes al tizón tardío causado por *P. infestans* colectado en aquel país. Las líneas mejoradas de tomate fueron desarrolladas



mediante la introgresión de los genes de resistencia provenientes de especies silvestres del género *Solanum* que no están presentes en Guatemala.

### **4.3 Materiales de tomate**

Los materiales de tomate que fueron utilizados para realizar la prueba de resistencia genética, a los diferentes aislados de *P. infestans* colectados en las diferentes regiones del país, se muestran en la Tabla 1.

## **5 Técnicas e instrumentos**

### **5.1 Aislamiento de *P. infestans*, proveniente de las zonas productoras de tomate y papa en Guatemala**

Se realizaron colectas de plantas de papa y tomate infectadas con *P. Infestans* en los departamentos de Jutiapa, Jalapa, Quetzaltenango, Chimaltenango, Baja Verapaz, Alta Verapaz, San Marcos, Sololá y Huehuetenango. Los muestreos fueron realizados utilizando la metodología de muestreo jerárquico descrito por Grünwald y colaboradores (2001). Fueron colectadas 45 muestras de plantas de tomate y 20 muestras de plantas de papa, de las cuales se logró aislar el patógeno en 7 muestras de tomate y 15 muestras de papa. Cada muestra consistió de 10 hojas, con síntomas de tizón tardío, de plantas en cada área de producción de papa o tomate. Posteriormente, las hojas colectadas se trasladaron en condiciones de frío hacia las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía, en donde se realizó un proceso de desinfección utilizando etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1.25% y posteriormente, colocándolo en una cámara húmeda para estimular el desarrollo del micelio y 48 horas después se procedió a colectar esporangios con una aguja de disección.

Los micelios fueron colectados sobre medio de cultivo de arveja conteniendo 100 ppm de penicilina y 30 ppm de procloraz, lo que ayudó a reducir el crecimiento de hongos y bacterias saprófitas. Posteriormente, las cajas Petri conteniendo las muestras se incubaron a 20C para estimular el desarrollo del micelio durante una semana. Se realizaron resiembras del hongo a intervalos de 4 semanas para estimular el crecimiento del patógeno debido a que, la permanencia de este en el mismo medio de cultivo, durante largos períodos, cesa su

desarrollo. Para la resiembra se empleó el medio de cultivo de arveja sin antibiótico ni fungicida.

Tabla 1 *Materiales de tomate utilizados para pruebas de resistencia genética y generación de híbridos.*

| No. | Nombre             | Hábito   | Hábito<br>crecimiento | Forma fruto | Color fruto |
|-----|--------------------|----------|-----------------------|-------------|-------------|
| 1   | Defiant PHR F1     | Híbrido  | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 2   | Mountain Merit F1  | Híbrido  | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 3   | Plum Regal         | Híbrido  | Determinado           | Saladette   | Rojo        |
| 4   | Iron Lady          | Híbrido  | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 5   | NCLCELBR1          | Linea    | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 6   | NCLCELBR2          | Linea    | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 7   | NC2CELBRa          | Linea    | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 8   | NC2CELBRb          | Linea    | Determinado           | Redondo     | Rojo        |
| 9   | Matt's Wild Cherry | Cultivar | Indeterminado         | Cherry      | Rojo        |
| 10  | Mountain Magic     | Híbrido  | Indeterminado         | Cherry      | Rojo        |
| 11  | Wapsipinicon Peach | Cultivar | Indeterminado         | Redondo     | Amarillo    |
| 12  | NC25Pa             | Linea    | Determinado           | Alargado    | Rojo        |
| 13  | NC25Pb             | Linea    | Determinado           | Alargado    | Rojo        |
| 14  | Lancelot           | Híbrido  | Indeterminado         | Alargado    | Rojo        |

## 5.2 Extracción de ADN

Se tomó micelio de la superficie del medio de cultivo, el cual fue macerado con micropistilo agregando 400 uL de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) en un tubo de 1.5 mL incubando los tubos a 65°C durante 1 h, luego las muestras se dejaron a temperatura ambiente y se agregó 100 uL de acetato de amonio (2.0 M) incubando en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 min y la fase líquida se transfirió a un nuevo tubo al cual se le agregó 300 uL de isopropanol y nuevamente se centrifugó 13.000 rpm durante 3 min descartando la fase líquida.

La pastilla de ADN generada se lavó con etanol al 70% y de nuevo se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min descartando una vez más la fase líquida. Tras la evaporación del

etanol se resuspendió la pastilla de ADN en 50 uL de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA) dejando reposar 1 h a temperatura ambiente. Finalmente fue almacenado a -20°C. La integridad y cantidad del ADN obtenido fue medida mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

### **5.3 Determinación del tipo de apareamiento (A1 o A2) en los aislados de *P. infestans***

La determinación del tipo de apareamiento se realizó de dos formas: por el método molecular y por método de apareamiento *in vitro* de aislamientos vivos.

#### a) Determinación del tipo de apareamiento por el método molecular

El ADN de los aislamientos y de los controles de *P. infestans* fue amplificado con el uso de los cebadores S1A (5'-AGGATTTCAACAA-3') y S1B (5'-TGCTTCCTAAGG-3'), los cuales amplificaron un fragmento de 1250 pb, perteneciente al locus S1, correspondiente al tipo de apareamiento A1. El aislamiento de tipo A2 no produjo amplificación alguna. (Judelson, 1996; Páez et al., 2004). Todas las reacciones fueron amplificadas a 94°C por 30 s; 35 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 45 C por 30 s (alineamiento), 72 C por 60 s (extensión), en un termociclador PCJ Research.

#### b) Determinación del tipo de apareamiento por el método de apareamiento *in vitro* de aislamientos vivos

Cada cepa, de la cual se desconocía su tipo de apareamiento, fue confrontada con una cepa A1 y una cepa A2, sobre medio de cultivo sólido de arveja. Un fragmento de 5 mm de diámetro de un cultivo de 3 semanas de la cepa desconocida de *P. infestans* fue colocado sobre el medio de cultivo y separado aproximadamente 5 cm de un fragmento de 5 mm de diámetro de una cepa conocida (A1 o A2). Las cajas Petri conteniendo las cepas se incubaron a 18°C por 14 días en condiciones de oscuridad. Para la evaluación de la formación de oosporas, se cortó una pequeña porción del cultivo de micelio que creció entre las dos cepas y se colocó sobre un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos, usando un microscopio se observó la formación de oosporas. Cepas que formaron oosporas al ser confrontadas con el evaluador A1, fueron designadas como A2. Cepas que formaron oosporas al ser confrontadas con A2, fueron designadas como A1.

#### **5.4 Caracterización genotípica por medio de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) de los aislados de *P. infestans***

El marcador molecular AFLP fue utilizado debido a la alta capacidad en la identificación de regiones polimórficas en el estudio de diversidad genética de *P. infestans* (Abu-El Samen, Secor, & Gudmestad, 2003; Mesa et al., 2008; Silva, Cotes, & Marín, 2010). El análisis se realizó utilizando el Kit AFLP Análisis System I de Invitrogen® (Zabeau & Vos, 1993) y la metodología empleada fue la siguiente: se utilizó ADN a una concentración de 25 ng/μl, el cual fue digerido con las enzimas de restricción EcoR1/Mse1 y se incubó por 2 h a 37°C, después a 70°C por 15 min. La ligación de los adaptadores se llevó a cabo usando los reactivos del kit y se incubó durante 2 h a 20°C. Seguidamente se realizó una preamplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa, el programa empleado en el termociclador fue el siguiente: 94°C por 30 s, 56°C por 60 s, 72°C por 60 s, por 20 ciclos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Se hizo una amplificación selectiva con los cebadores E-AAC + M-CTC del kit, los cuales produjeron mayor polimorfismo.

Los productos de PCR se visualizaron en una gel de acrilamida al 5% para poder observar las bandas amplificadas. La tinción del gel se realizó con nitrato de plata mediante el siguiente procedimiento: inmersión en solución fijadora de ácido acético glacial 10% v/v durante 35 min, agua destilada durante 20 min, solución de tinción (nitrato de plata 0.15% p/v, formaldehído 0.15% v/v) por 40 min, agua destilada por 10 segundos, solución de revelado de 5 a 6 min según la aparición de las bandas (carbonato de sodio 6% p/v, formaldehído 0.3% v/v, Tiosulfato de sodio 5 ppm), solución fijadora para detener el proceso durante aproximadamente 5 min, finalmente lavar en agua destilada. Se dejó secar por 2 días y posteriormente se realizó la lectura del perfil de las bandas. Utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary and Genetics Analysis, Tamura, Stecher, Peterson, Filipiski, & Kumar, 2013) y NTSYS (Numerical Taxonomy System, Rolfh, 1997) se realizó el análisis filogenético de los aislados de *P. infestans* obtenidos en las diferentes regiones que contempló este estudio.

## **5.5 Análisis de datos moleculares**

Se realizó un análisis de cluster mediante la construcción de una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda en los 22 aislamientos evaluados. Esta información se utilizó para calcular una matriz de similitud utilizando el índice de Dice mediante el programa MEGA 6 y NTSYS y a partir de ésta se construyó un dendrograma mediante el método unweighted pair group method with arithmetic mean

UPGMA (Sokal and Michiner, 1958) por sus siglas en inglés, utilizando los procedimientos Cluster y Tree.

## **5.6 Generación de inóculo de cada genotipo *P. infestans*, para inoculación de plantas**

Con el objetivo de generar esporangios para inoculación, se propició el desarrollo del patógeno en medio de cultivo de arveja sólido en cajas Petri de 90 mm de diámetro durante 21 días en completa oscuridad. Los esporangios fueron colectados agregando 5 ml de agua estéril a cada caja Petri, y cuidadosamente se raspó sobre el medio con una espátula de vidrio, la suspensión de esporangios se colectó en un beacker estéril. La concentración de esporangio se ajustó a 5,000 esporangios por microlitro. La suspensión de esporangio fue incubada por dos horas a 4°C en condiciones de oscuridad para promover la liberación de zoosporas.

## **5.7 Selección de genotipos de tomate para evaluación de resistencia al tizón tardío causado por genotipos de *P. infestans***

Se evaluaron siete cultivares comerciales que han demostrado tener resistencia al tizón tardío causado por genotipos de *P. Infestans* presentes en Estados Unidos de América. Estos materiales de tomate están disponibles en el mercado del país norteamericano, pero no se disponen en Guatemala, por lo que se desconoce si poseen resistencia al tizón tardío causado por los genotipos guatemaltecos de *P. infestans*. Los cultivares comerciales son los siguientes Wapsipinicon, Matt´s Wild Cherry, Mountain Magic, Plum Regal, Mountain Merit, Defiant y Iron Lady. Como control se utilizó la variedad comercial Lancelot disponible en Guatemala, el cual es susceptible al tizón tardío.

## **5.8 Ensayo para evaluación de resistencia al tizón tardío causado por genotipos de *P. infestans***

Los genotipos de tomate se evaluaron utilizando la técnica de cámara húmeda, en un diseño experimental de bloques completamente al azar con 4 repeticiones (4 bloques), siguiendo la metodología propuesta por Seidl y colaboradores (2014). Cada repetición consistió de 5 cajas Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo papel toalla húmeda. En cada caja Petri fueron colocadas un par de hojas de cada genotipo. El método de la cámara húmeda evitó la dispersión de los diferentes genotipos del patógeno en áreas de producción y minimizó el contacto entre los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) que podrían haber generado oosporas y recombinación genética entre las cepas del patógeno colectado.

Las semillas de cada genotipo de tomate fueron sembradas en bandejas conteniendo peatmoss como sustrato, las cuales fueron ubicadas en un invernadero libre de tizón tardío. Tras 5 semanas se procedió a trasplantar 20 plántulas de cada genotipo hacia el invernadero facilitado por la Facultad de Agronomía, Usac. Dos semanas después del trasplante se colectaron hojas bien formadas de la parte medía de la planta y para evitar sesgos, se colectaron hojas del mismo tamaño. Las hojas se fueron colocadas en cajas Petri donde fueron inoculadas, aplicando 10  $\mu$ l de suspensión de esporas de *P. infestans* al centro del haz de cada hoja. Como control susceptible se empleó la variedad Lancelot, y como control negativo se empleó agua destilada. Después de la inoculación, las cajas Petri fueron colocadas en un incubador a 20°C, para el desarrollo de la enfermedad.

Siete días después de la inoculación se procedió a hacer la evaluación de la resistencia de los genotipos de tomate, se procederá a medir las dimensiones de la lesión provocada por el patógeno. Mediante el uso del estereoscopio se procedió a observar la presencia del crecimiento superficial del patógeno (micelio, esporangios y esporangióforos) así como el área de la lesión de cada hoja. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% en base al diseño experimental descrito anteriormente, empleando el programa InfoStat, seguido de una comparación de medias mediante la prueba de tukey con un nivel de significancia del 5% utilizando el mismo programa.

## **5.9 Generación de híbridos**

Se elaboró un plan de cruzamientos convencional (polinización) entre los genotipos de tomate resistentes al tizón tardío, para ello fueron consideradas las características del fruto (firmeza, tamaño, forma y color) y el rendimiento de las plantas que fueron establecidas en el invernadero. Se colectaron polen de las plantas seleccionadas, el cual fue conservado a 2°C, hasta el día de su uso. Para llevar a cabo el cruzamiento se requirió emasculación de las flores con pétalos aún cerrados (antes de la antesis) y con la ayuda de una pinza se removieron los estambres, dejando libre el pistilo. Usando un pincel se colocaron granos de polen, del genotipo que se utilizará como macho, en el pistilo de la planta que se utilizará como hembra. Los cruzamientos fueron identificados indicando los parentales usados en el cruzamiento. El fruto resultante de cada cruzamiento fue colectado al momento de haber alcanzado su punto de madurez indicando el cruzamiento que les dio origen. Posteriormente, realizó la extracción de las semillas híbridas, las cuales fueron conservadas a 4°C.

## **5.10 Evaluación de resistencia de los híbridos generados al tizón tardío**

Siguiendo la metodología propuesta anteriormente para la evaluación de resistencia de las líneas y cultivares de tomate, se procedió a hacer la evaluación de resistencia de los híbridos como se describe en la sección 5.8.

# **6 Resultados**

## **6.1 Aislamiento de *P. infestans* provenientes de algunas zonas productoras de tomate y papa en Guatemala.**

Tras las colectas realizadas de tejido foliar afectado por *P. infestans* en las zonas productoras de los cultivos de tomate y papa se obtuvieron 22 aislados del patógeno en estudio. Los aislados son procedentes de las regiones de occidente, oriente, altiplano central y norte del país. En Tabla 2 se pueden observar los aislados obtenidos con el código de identificación, de igual forma se puede observar el lugar de colecta y el cultivo a partir del cual se obtuvo el tejido foliar afectado.

Tabla 2 *Lista de aislados de Phytophthora infestans obtenidos en diferentes regiones productoras de tomate y papa de Guatemala*

| <b>Aislado</b> | <b>Lugar de colecta</b>      | <b>Cultivo</b> | <b>Departamento</b> | <b>Coordernadas</b> |            |
|----------------|------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|------------|
| <b>P1</b>      | Agua Blanca                  | Tomate         | Jutiapa             | 14.50926            | -89.63408  |
| <b>P2</b>      | Cobán                        | Tomate         | Alta Verapaz        | 15.238237           | -90.252488 |
| <b>P3</b>      | Fuentes Georginas 1          | Papa           | Quetzaltenango      | 14.758588           | -91.483474 |
| <b>P4</b>      | Fuentes Georginas 2          | Papa           | Quetzaltenango      | 14.763701           | -91.483037 |
| <b>P5</b>      | Fuentes Georginas 3          | Papa           | Quetzaltenango      | 14.765284           | -91.478927 |
| <b>P6</b>      | Ipala                        | Tomate         | Chiquimula          | 14.535491           | -89.66710  |
| <b>P7</b>      | Jalapa 1                     | Tomate         | Jalapa              | 14.537358           | -89.903819 |
| <b>P8</b>      | Jalapa 2                     | Papa           | Jalapa              | 14.550435           | -90.100101 |
| <b>P9</b>      | Jalapa 3                     | Papa           | Jalapa              | 14.536762           | -90.158174 |
| <b>P10</b>     | Patzicía 1                   | Papa           | Chimaltenango       | 14.640814           | -90.940335 |
| <b>P11</b>     | Patzicía 2                   | Papa           | Chimaltenango       | 14.645522           | -90.942162 |
| <b>P12</b>     | Patzicía 3                   | Papa           | Chimaltenango       | 14.659235           | -90.945065 |
| <b>P13</b>     | Patzún 1                     | Papa           | Chimaltenango       | 14.68858            | -90.99823  |
| <b>P14</b>     | Patzún 2                     | Papa           | Chimaltenango       | 14.703891           | -91.012587 |
| <b>P15</b>     | Salamá                       | Tomate         | Baja Verapaz        | 15.077132           | -90.282946 |
| <b>P16</b>     | Sanarate                     | Tomate         | El Progreso         | 14.81018            | -90.213296 |
| <b>P17</b>     | San Juan<br>Ostuncalco       | Papa           | Quetzaltenango      | 14.866048           | -91.602249 |
| <b>P18</b>     | San Agustín<br>Acasaguastlán | Tomate         | El Progreso         | 14.949777           | -89.96101  |
| <b>P19</b>     | San Marcos 1                 | Papa           | San Marcos          | 15.022028           | -91.798506 |
| <b>P20</b>     | San Marcos 2                 | Papa           | San Marcos          | 15.069238           | -91.835866 |
| <b>P21</b>     | Sololá                       | Papa           | Sololá              | 14.841253           | -91.170777 |
| <b>P22</b>     | Todos Santos<br>Cuchumatán   | Papa           | Huehuetenango       | 15.456613           | -91.501255 |



## 6.2 Determinación del tipo de apareamiento (A1 o A2) en los aislados de *P. infestans*

### 6.2.1 Determinación por el método molecular

A partir del ADN extraído de los 22 aislados de *P. infestans* y tras el desarrollo de la PCR, se determinó la presencia de los dos tipos de apareamiento A1 y A2. La Figura 1 muestra el resultado de la amplificación con los cebadores específicos para el locus S1 correspondiente al tipo de apareamiento A1.



Figura 1 Electroforesis en gel de agarosa con los segmentos de ADN de *Phytophthora infestans* amplificados con los cebadores S1a y S1b. Los aislados identificados en los pozos del gel como P11, P12, P13, P14, P15, P16, P20, P21, P22 corresponden al tipo de apareamiento A2. Los aislados identificados en los pozos del gel como P17, P19, P20 corresponden al tipo de apareamiento A1. M representa el marcador de peso molecular de 100 pb a 1500 pb.

A partir de la identificación de las muestras que presentaron una reacción positiva para la amplificación del locus S1, se clasificaron 5 aislados como pertenecientes al tipo de apareamiento A1, mientras que los restantes 17 aislados correspondieron al tipo de apareamiento A2. El detalle de la reacción de amplificación, así como el tipo de apareamiento de cada aislados puede observarse en la Tabla 3.

Tabla 3 *Determinación del tipo de apareamiento de los aislados de Phytophthora infestans a través de la amplificación del locus S1.*

| <b>Aislado</b> | <b>Amplificación locus S1 (1250 pb)*</b> | <b>Tipo de apareamiento</b> | <b>Aislado</b> | <b>Amplificación locus S1 (1250 pb)*</b> | <b>Tipo de apareamiento</b> |
|----------------|--|-----------------------------|----------------|--|-----------------------------|
| P1             | -  | <b>A2</b>                   | P12            | -  | <b>A2</b>                   |
| P2             | -  | <b>A2</b>                   | P13            | -  | <b>A2</b>                   |
| P3             | -  | <b>A2</b>                   | P14            | -  | <b>A2</b>                   |
| P4             | +  | <b>A1</b>                   | P15            | -  | <b>A2</b>                   |
| P5             | -  | <b>A2</b>                   | P16            | -  | <b>A2</b>                   |
| P6             | -  | <b>A2</b>                   | P17            | +  | <b>A1</b>                   |
| P7             | +  | <b>A1</b>                   | P18            | +  | <b>A1</b>                   |
| P8             | -  | <b>A2</b>                   | P19            | +  | <b>A1</b>                   |
| P9             | -  | <b>A2</b>                   | P20            | -  | <b>A2</b>                   |
| P10            | -  | <b>A2</b>                   | P21            | -  | <b>A2</b>                   |
| P11            | -  | <b>A2</b>                   | P22            | -  | <b>A2</b>                   |

Nota: \*+ = reacción positiva, - = reacción negativa. P1, P2, P3 etc hace referencia a los aislados descrito en la tabla 2.

### 6.2.2 Determinación por método de apareamiento *in vitro* de aislamientos vivos

La prueba de apareamiento *in vitro* a partir de las cepas control A1, A2 y los aislados permitieron identificar aislados con tipo de apareamiento A1 y A2. Del total de 22 aislados analizados se determinó que 4 de ellos pertenecen al tipo A1, mientras el resto corresponden al tipo A2. Los resultados de la prueba de apareamiento *in vitro*, así como la clasificación de los aislados, según fueron A1 o A2, se presentan detalladamente en la Tabla 4.

Tabla 4 Resumen de prueba de apareamiento in vitro con cepas control A1 y A2 para la determinación del tipo de apareamiento de los aislados de *Phytophthora infestans*.

| Aislados<br>confrontados | Formación<br>de<br>oosporas* | Tipo<br>de<br>apareamiento | Aislados<br>confrontados | Formación<br>de<br>oosporas* | Tipo<br>de<br>apareamiento |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| P1*A1                    | +                            | <b>A2</b>                  | P12*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P1*A2                    | -                            |                            | P12*A2                   | -                            |                            |
| P2*A1                    | +                            | <b>A2</b>                  | P13*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P2*A2                    | -                            |                            | P13*A2                   | -                            |                            |
| P3*A1                    | +                            | <b>A2</b>                  | P14*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P3*A2                    | -                            |                            | P14*A2                   | -                            |                            |
| P4*A1                    | +                            | <b>A1</b>                  | P15*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P4*A2                    | -                            |                            | P15*A2                   | -                            |                            |
| P5*A1                    | +                            | <b>A2</b>                  | P16*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P5*A2                    | -                            |                            | P16*A2                   | -                            |                            |
| P6*A1                    | +                            | <b>A2</b>                  | P17*A1                   | -                            | <b>A1</b>                  |
| P6*A2                    | -                            |                            | P17*A2                   | +                            |                            |
| P7*A1                    | -                            | <b>A1</b>                  | P18*A1                   | -                            | <b>A1</b>                  |
| P7*A2                    | +                            |                            | P18*A2                   | +                            |                            |
| P8*A1                    | -                            | <b>A2</b>                  | P19*A1                   | -                            | <b>A1</b>                  |
| P8*A2                    | +                            |                            | P19*A2                   | +                            |                            |
| P9*A1                    | -                            | <b>A2</b>                  | P20*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P9*A2                    | +                            |                            | P20*A2                   | -                            |                            |
| P10*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  | P21*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P10*A2                   | -                            |                            | P21*A2                   | -                            |                            |
| P11*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  | P22*A1                   | +                            | <b>A2</b>                  |
| P11*A2                   | -                            |                            | P22*A2                   | -                            |                            |

Nota: \*+ = reacción positiva, - = reacción negativa. P1, P2, P3 etc hace referencia a los aislados descrito en la tabla 2.

### 6.3 Caracterización genotípica por medio de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) de los aislados de *P. infestans*

Con el par de cebadores utilizados se obtuvo un total de 26 bandas, de las cuales el 88% fueron polimórficas. El dendrograma que se muestra en la figura 2 divide los aislamientos en tres grupos principales. El primero de ellos incluyó 4 aislados con un nivel de similitud de 0.54 lo que indica un alto grado de variación. El segundo grupo incluyó 13 aislados con un nivel de similitud de 0.66 y finalmente el tercer grupo incluyó 5 aislados con un nivel de similitud entre ellos de 0.77.

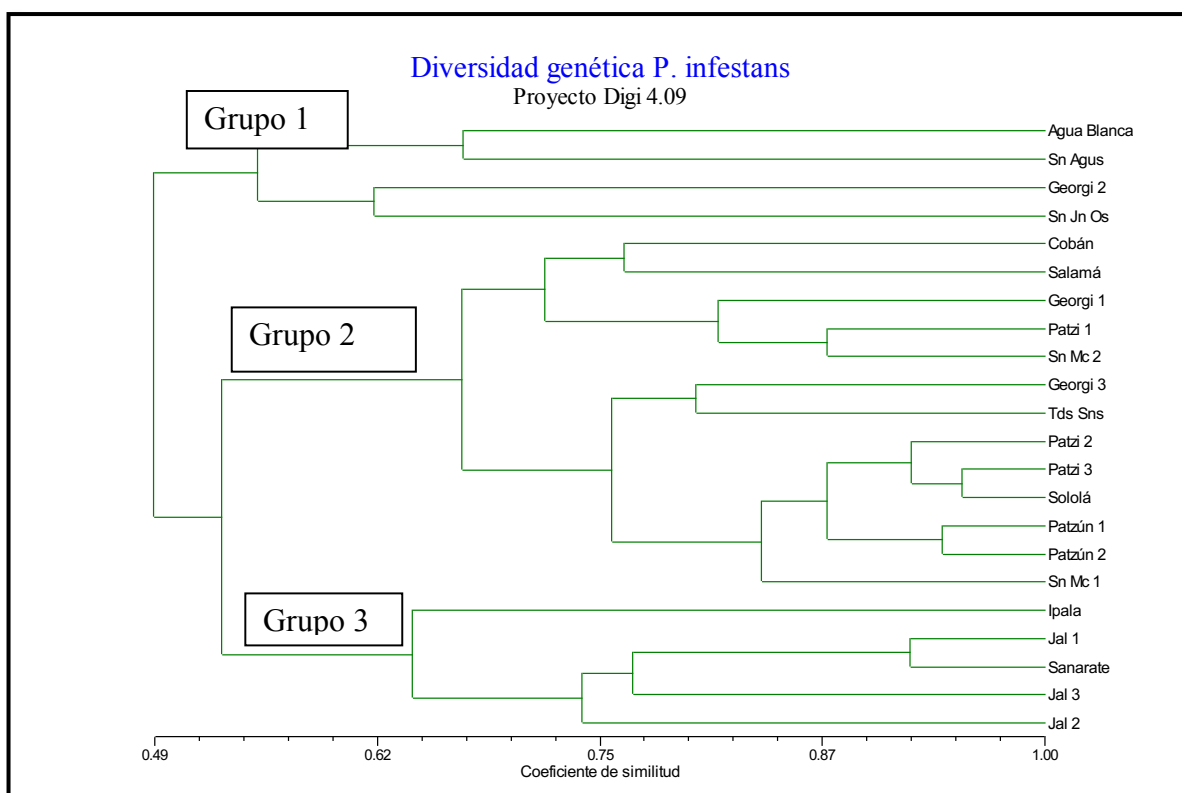


Figura 2 Dendrograma (UPGMA) generado a partir de 22 aislamientos de *Phytophthora infestans* colectados en Guatemala, en 2017, mediante el marcador molecular AFLP.

En los resultados se observa que los aislados del patógeno fueron agrupados siguiendo un patrón en base a su lugar de procedencia, de manera que, como puede observarse en el grupo 1, los aislados provenientes de la región oriental del país, Agua Blanca (P1) y San Agustín Acasaguastlán (P18), quedaron en un mismo grupo (subgrupo 1A). Dentro de este grupo también quedaron incluidos los aislados provenientes de algunos municipios de Zunil

(P4) y San Juan Ostuncalco (P17) (subgrupo 1B). El subgrupo 1A incluyó los aislados a partir de tomate, mientras que el subgrupo 1B incluyó los aislados provenientes del cultivo de papa. El grado de similitud dentro del grupo I (0.54).

Los aislados incluidos dentro del grupo 2 también pueden ser divididos en 2 subgrupos. El subgrupo 2A incluye los aislados provenientes de los municipios de Cobán (P2) y Salamá (P15) los cuales corresponden al cultivo de tomate. Este subgrupo también incluye los aislados provenientes de los municipios de Zunil (P3), Patzcía (P10) y San Marcos (P20); de donde se obtuvieron muestras de cultivo de papa. El grado de similitud dentro de este subgrupo alcanza un valor de 0.70 El subgrupo 2B incluyó los aislados de las muestras del cultivo de papa procedentes de la región del altiplano central y región occidente del país incluyendo los municipios de Zunil (P5), Todos Santos Cuchumatán (P22), Patzicía (P11) y (P12), Sololá (P21), Patzún (P13) y (P14) y San Marcos (P19). El grado de similitud dentro de subgrupo 2B fue de 0.74.

El grupo 3 incluye 5 aislados los cuales son divididos en 2 subgrupos. El grupo 3A incluye únicamente al aislado proveniente de Ipala (P6) y muestra un coeficiente de similitud de 0.64 respecto al subgrupo 3B que incluye los aislados obtenidos de los municipios de Jalapa (P7) (P8) y (P9) y Sanarate (P16) los cuales muestran un nivel de similitud de 0.74.

#### **6.4 Evaluación de resistencia genética de diferentes materiales de tomate**

Se realizó la prueba de inoculación sobre 14 materiales de tomate, de los cuales seis fueron líneas puras, siete híbridos comercializados como resistentes y un material como testigo susceptible. Todos los materiales fueron inoculados a partir del patógeno colectado en Todos Santos Cuchumatán (P22), Agua Blanca (P1) y Sanarate (P16), por ser cada uno de ellos representativo de cada grupo filogenético generados a partir de la caracterización molecular (Figura 1). El material Lancelot, utilizado como testigo, fue susceptible a la inoculación de los 3 aislados, siendo el patógeno colectado del municipio de Todos Santos Cuchumatán (P22) quien mayor daño foliar causó, seguido del aislado proveniente del municipio de Agua Blanca (P1) y finalmente el aislado que provino del municipio de Sanarate (P16). La línea pura NC25Pa fue afectada por los 3 aislados, mientras la línea NC25Pb se vio afectada únicamente por la inoculación con el aislados de Todos Santos (P22).

El resto de líneas mostró resistencia completa a la inoculación con los 3 aislados de *P. infestans* como se observa en la figura 3.

El híbrido comercial Plum regal fue sensible a la inoculación de los 3 aislados, siendo el aislado de Todos Santos Cuchumatán (P22) quien mayor daño foliar ocasionó. Un comportamiento similar se observó con el híbrido Mountain Merit F1. El híbrido Iron Lady mostró una resistencia completa a la inoculación con los 3 aislados. El resto de híbridos, si bien no mostraron una resistencia completa, el área foliar afecta es muy cercana a 0 mm<sup>2</sup>.

Tras realizar el análisis de varianza se observó que existía diferencia estadísticamente significativa en la resistencia de los materiales de tomate hacia la inoculación con cada uno de los aislados de *P. infestans*, por lo cual se realizó una prueba de medias que se muestra en la *Figura 4*. El testigo fue categorizado como un grupo único, confirmando su alta susceptibilidad a los aislados de *P. infestans*. En cuanto a las líneas puras, todas fueron ubicadas dentro del mismo grupo de tukey, debido a que estadísticamente todas son resistentes, a excepción de la línea NC25Pa, la cual fue ubicada en un grupo distinto. Los híbridos fueron ubicados en el grupo de materiales resistente junto con las líneas puras, a excepción de los híbridos Mountain Merit y Plum regal, los cuales fueron ubicados en grupos distintos.

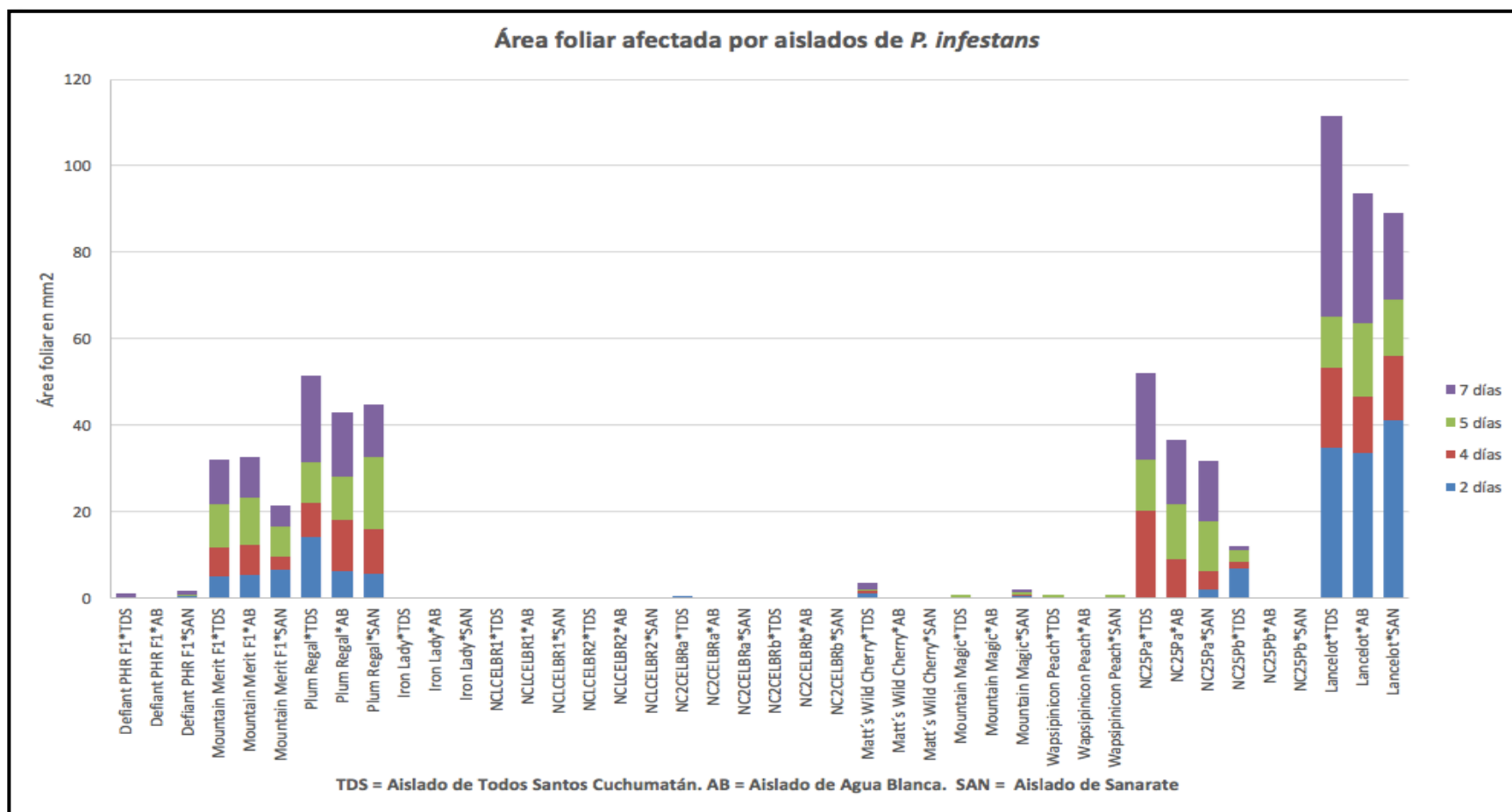


Figura 3. Área foliar afectada de cada material de tomate inoculado con 3 aislados de *Phytophthora infestans*. Se presenta cada material de tomate inoculado con cada uno de los aislados de *Phytophthora infestans*. Las columnas muestran el área afectada en cada una de las lecturas, a través de cada serie presente, siendo la parte más alta de la misma, el valor total de área foliar afectada al final de la prueba de inoculación.

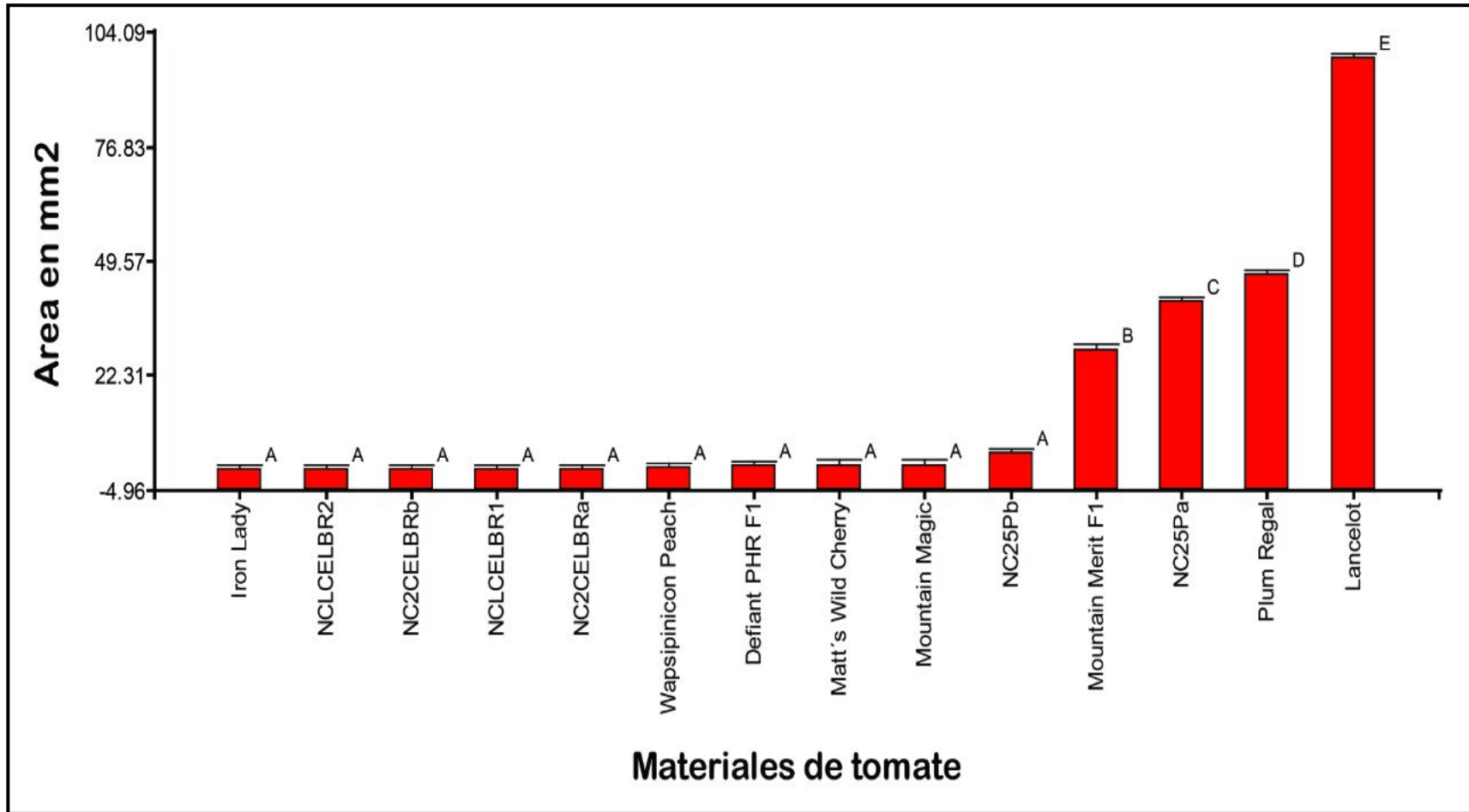


Figura 4 Media de área foliar total de lesión de tizón tardío, inoculados con tres aislados de *P. infestans* colectados en Guatemala en 2017. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ( $p > 0.05$ )



En cuanto a los 3 aislados de *P. infestans* utilizados para realizar las inoculaciones, el análisis de varianza y la posterior prueba de medias demostró que el aislado proveniente del municipio de Todos Santos Cuchumatán fue el que mayor efecto negativo, en área foliar dañada, causó a los materiales de tomate donde, tras la inoculación, pudo sobrepasar la resistencia genética. Los aislados de Agua Blanca y Sanarate mostraron ser menos agresivos y fueron categorizados dentro del mismo grupo de tukey, como se observa en la figura 5.

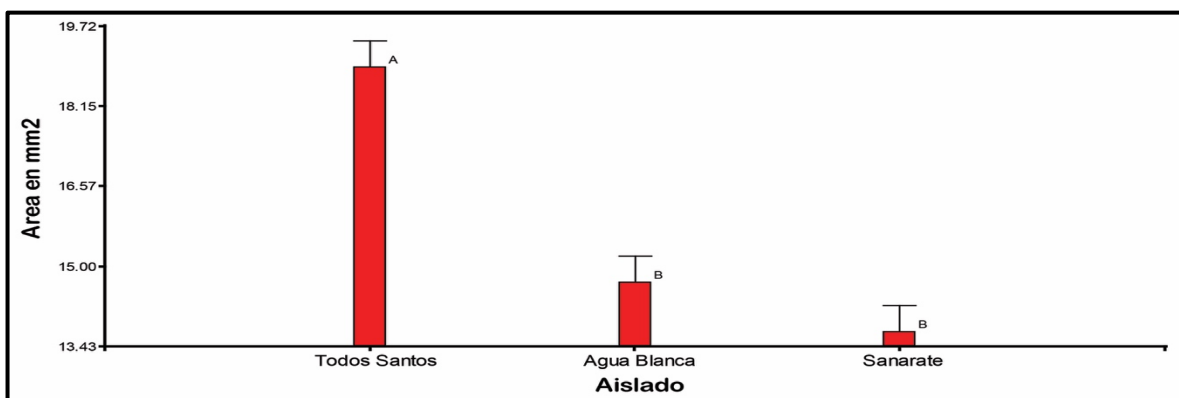


Figura 5 Media de área foliar infectada en 14 materiales de tomate, producida por cada uno de los tres aislados utilizados en la prueba de resistencia genética. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

### 6.5 Generación de híbridos de tomate

A partir de resultados obtenidos en la prueba de inoculación, así como la identificación de las características agronómicas de interés mencionadas en la metodología, se seleccionaron las líneas NCLCELBR2, NC2CELBRa, NC25Pa y NC25Pb para llevar a cabo los cruzamientos como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5 Híbridos generados a partir de líneas puras, con características agronómicas deseables y resistencia genética a *Phytophthora infestans*

| Línea 1   | Línea 2 | Híbrido resultante |
|-----------|---------|--------------------|
| NCLCELBR2 | NC25Pa  | Híbrido 1          |
| NCLCELBR2 | NC25Pb  | Híbrido 2          |
| NC2CELBRa | NC25Pa  | Híbrido 3          |
| NC2CELBRa | NC25Pb  | Híbrido 4          |

La prueba de inoculación para evaluar la resistencia genética de los híbridos tuvo resultados satisfactorios. Como dato en común, ningún híbrido mostró lesión foliar durante la primera toma de datos a los 2 días. Todos los híbridos fueron afectados al menos por uno de los aislados, pero ninguno fue afectado por más de dos aislados de *P. infestans*. Al igual que en la prueba de resistencia anterior, fue el aislado proveniente de Todos Santos el que causó mayor daño, aunque los valores de área afectada son muy cercanos a 0. El comportamiento de los híbridos ante la inoculación de cada uno de los 3 aislados de *P. infestans* utilizados se observa en la Figura 6.

El análisis de varianza demostró que existía diferencia estadísticamente significativa en la resistencia de los híbridos de tomate hacia la prueba de inoculación con cada uno de los aislados de *P. infestans*, por lo cual se realizó una prueba de medias que se muestra en Figura 7. Los híbridos 2 y 4 fueron categorizados como los más resistentes de los 4 evaluados, mientras que el híbrido 1 puede ser considerado en el mismo grupo, o bien ubicarse en el segundo grupo donde se encuentra el híbrido 3, el cual fue el mayormente afectado.

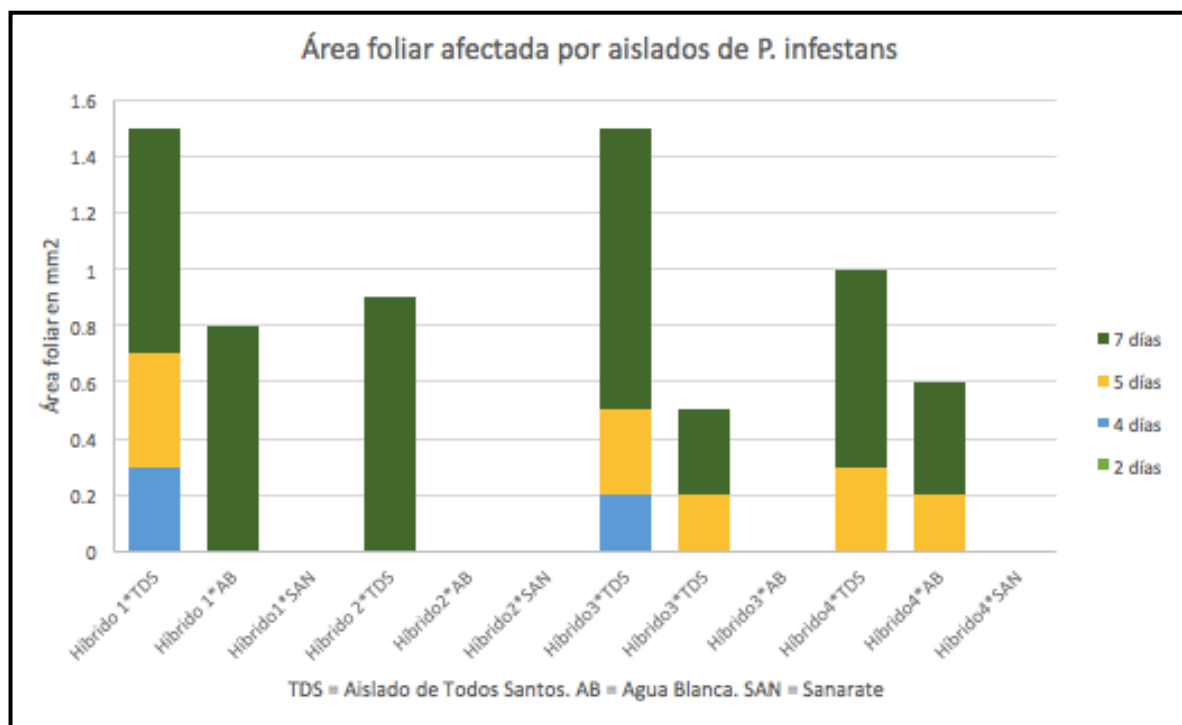


Figura 6 Área foliar infectada de cada híbrido de tomate inoculado con 3 aislados de *Phytophthora infestans*. Se presenta cada híbrido de tomate inoculado con cada uno de los aislados de *Phytophthora infestans*. Las columnas muestran el área afectada en cada una de las lecturas, a través de cada serie presente, siendo la parte más alta de la misma, el valor total de área foliar afectada al final de la prueba de inoculación.

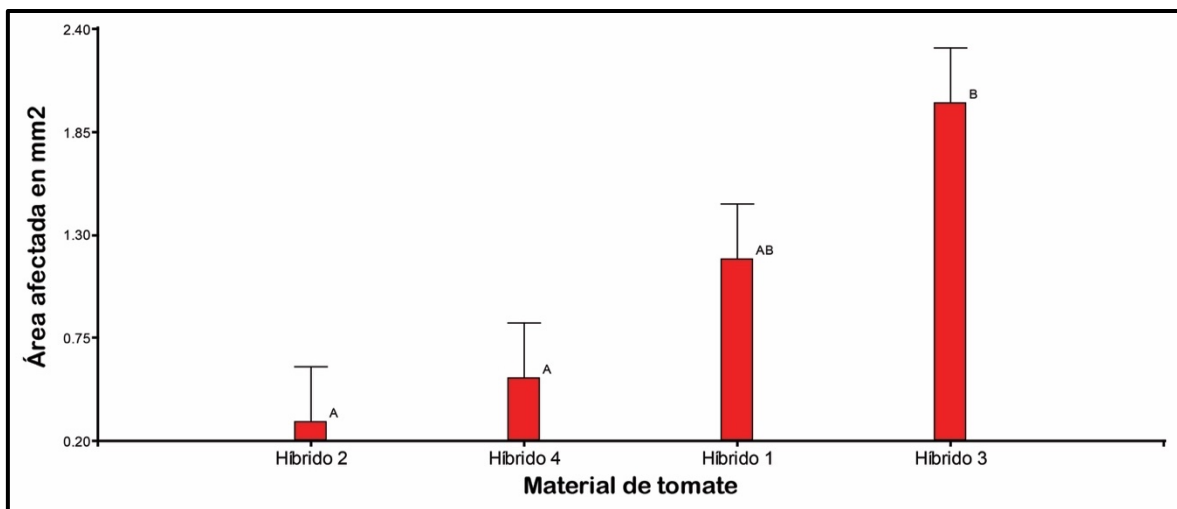


Figura 7 Media de área foliar infectada en 4 híbridos de tomate inoculados con 3 aislados de *Phytophthora infestans* colectados en Guatemala, 2017. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

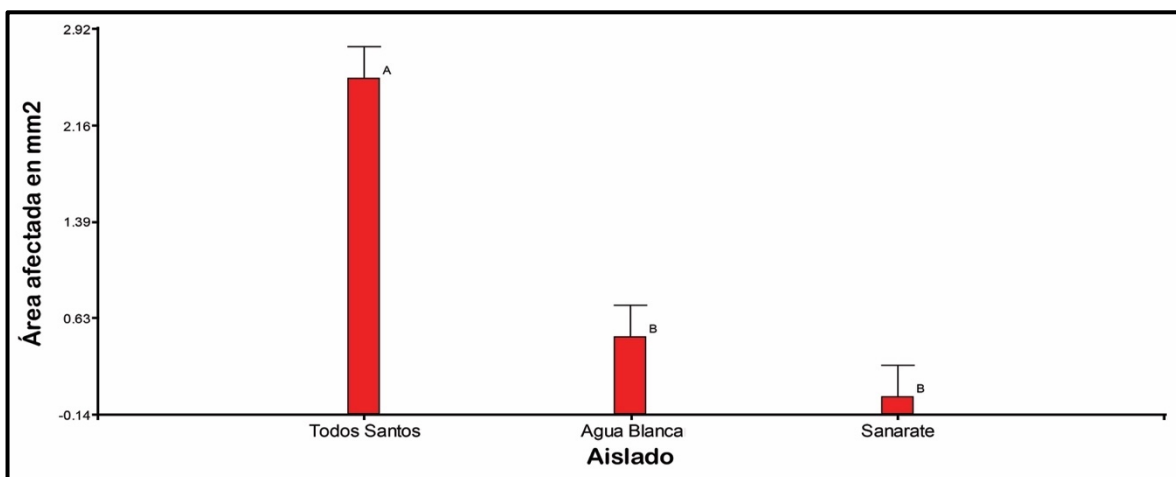


Figura 8 Media del área foliar infectada en 4 híbridos de tomate, producida por cada uno de los tres aislados utilizados en la prueba de resistencia genética. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

En cuanto a los 3 aislados de *P. infestans* utilizados para realizar las inoculaciones, el análisis de varianza y la posterior prueba de medias demostró que el aislado proveniente del municipio de Todos Santos Cuchumatán (P22), al igual que en la prueba anterior, causó el mayor daño foliar; mientras que los aislados de Agua Blanca (P1) y Sanarate (P16) mostraron ser menos agresivos y fueron categorizados dentro del mismo grupo de tukey, como se observa en la Figura 8

## 6.6 Matriz de resultados

Tabla 6 *Matriz de resultados del proyecto: Mejoramiento genético de tomate para resistencia al tizón tardío causado por genotipos de Phytophthora infestans colectados en Guatemala.*

| <b>Objetivos específicos</b>  | <b>Resultado esperado</b>  | <b>Resultados obtenidos</b>  |
|---|--|--|
| Colectar y aislar diferentes genotipos de <i>Phytophthora infestans</i> procedentes de diferentes zonas de Guatemala.   | Colecta de al menos 60 cepas de <i>P. infestans</i> y al menos 2 genotipos diferentes presentes en Guatemala durante el año 2017                 | Colecta de 65 cepas de <i>P. infestans</i> de las cuales se pudieron aislar en cultivo puro únicamente 22 de éstas.                            |
| Caracterizar genótipicamente los aislados de <i>Phytophthora infestans</i> colectados en Guatemala durante el año 2017  | Dendograma con grupos de <i>P. infestans</i> genéticamente emparentados, generado a partir de las bandas analizadas en el gel de poliacrilamida. | Dendograma (UPGMA) generado a partir de 22 aislamientos de <i>P. infestans</i> mediante el marcador molecular AFLP                             |
| Evaluar y seleccionar genotipos de tomate con resistencia genética al tizón tardío causado por genotipos de <i>Phytophthora infestans</i> colectados en Guatemala                       | Al menos, un cultivar y una línea mejorada que presenten resistencia a la enfermedad del tizón tardío.   | 5 híbridos y 5 líneas mostraron alta resistencia a los aislados de <i>P. infestans</i> .   |
| Realizar cruzamientos para generar híbridos entre las líneas de tomate que presenten resistencia al tizón tardío y buenas características agronómicas y evaluar su resistencia genética | Generación de al menos 4 híbridos con resistencia genética al tizón tardío   | 4 híbridos generados con alta resistencia a los aislados <i>P. infestans</i> , además de poseer algunas características agronómicas deseables. |

## 6.7 Impacto esperado

Tabla 7 *Impacto esperado del proyecto: Mejoramiento genético de tomate para resistencia al tizón tardío causado por genotipos de Phytophthora infestans colectados en Guatemala.*

| <b>Impacto esperado</b>   | <b>Beneficiario potencial</b>    | <b>Indicador verificable</b>  |
|---|----------------------------------|---|
| Generar información de la diversidad genética, presencia de los tipos de apareamiento de <i>P. infestans</i> , así como de la resistencia de líneas puras e híbridos comerciales a diferentes aislados del patógeno en estudio. | Productores nacionales de tomate | Se cuenta con un dendograma, generado a partir del uso del marcador molecular AFLP, que muestra la diversidad genética del patógeno. La formación de oosporas evidencia la presencia de ambos tipos de apareamiento. Las pruebas de inoculación en las cuales no hubo daño foliar demuestran la resistencia genética de algunos materiales de tomate. |

## 7 Análisis y discusión de resultados

### 7.1 Aislamiento de *P. infestans* provenientes de algunas zonas productoras de tomate y papa en Guatemala

Durante las comisiones realizadas en busca de plantas de tomate y papa afectadas por *P. infestans* fueron colectadas 65 muestras, sin embargo no se logró obtener aislados puros de todas ellas. En muchos de los casos, se presume que el tejido foliar colectado había sido previamente asperjado con fungicidas, debido a que al realizar el proceso de aislamiento el hongo no presentaba ningún indicio de crecimiento. Esta situación fue recurrente en muchas de las plantaciones visitadas, debido a que, un gran número de productores hacen un uso desmedido de fungicidas y esto complica la obtención de tejido foliar no asperjado, ya que el productor, al notar el menor indicio de presencia del patógeno, realiza aplicaciones a intervalos cortos, así como dosis superiores a las recomendadas.

En algunas ocasiones fue posible obtener tejido foliar dañado por *P. infestans* en el cual se pudo observar que el hongo presentaba crecimiento micelial, pero esto tampoco representó una garantía para poder lograr el aislamiento del patógeno. Esto pudo ser debido al medio de cultivo empleado, ya que debido a la alta diversidad genética que presenta el patógeno en las zonas de estudio, demostrada a través de la caracterización molecular, no todas las muestras de *P. infestans* colectadas en diversas zonas son aptas para crecer en el mismo medio de cultivo. Dada esta situación es recomendable realizar evaluaciones futuras que determinen los medios de cultivo más aptos para lograr el desarrollo *in vitro* de *P. infestans* a partir de la zona donde sea colectado, como se presenta en el trabajo de Soto y colaboradores (2017).

### 7.2 Determinación del tipo de apareamiento (A1 o A2) en los aislados de *P. infestans* por apareamiento *in vitro* y método molecular

El desarrollo de oosporas, identificadas en la zona de interfase de contacto de ambos aislados, durante el apareamiento *in vitro*, evidencia la existencia de ambos tipos de apareamiento A1 y A2, debido a que este tipo de estructuras son propias de una forma de reproducción sexual. La ausencia de este tipo de estructuras concuerda con la condición heterotálica de este patógeno, pues cuando la cepa de control, de tipo de apareamiento previamente conocido, se

enfrentó a un aislado con tipo de apareamiento idéntico, no fue capaz el desarrollo de una estructura sexual, por lo cual en estos casos la reproducción es por vía clonal, como menciona Grünwald y colaboradores (2001).

La amplificación de una región del locus S1, visualizada a través de la electroforesis que se muestra en la Figura 1, fue de utilidad para la identificación del tipo de apareamiento A1, mientras la ausencia de amplificación denotó el tipo de apareamiento A2 según Judelson y colaboradores (1996) lo que corrobora la presencia de ambos tipos de apareamiento en Guatemala. La presencia de ambos tipos de apareamiento, hasta principios de la década de los 1980, había sido considerada únicamente para la región del Valle de Toluca en México, suponiendo su ausencia fuera de dicho país (Goodwin et al., 1994) sin embargo, a partir de 1981 Fry y Goodwin (1997) documentan la dispersión del patógeno hacia diferentes países de América del sur, Europa, Medio Oriente y Asia; sin embargo Koh y colaboradores (1994) describe la presencia del tipo de apareamiento A2 en Japón desde 1937 y sugiere que la presencia de dicho tipo de apareamiento pudo ser debido a una autoreversión del tipo A1 hacia la forma A2, inducida por envejecimiento, exposición a fungicidas u otros tipos de condiciones de estrés para el patógeno, abriendo la posibilidad para que exista reproducción sexual al encontrarse ambos tipos de apareamiento.

En Ecuador, Ordóñez y colaboradores (2000) han identificado ambos tipos de apareamiento, lo cual se corrobora con el trabajo de Adier y colaboradores (2004) quienes mencionan que en este país la diversidad genética es mayor que en el resto de países Andinos; por otra parte, en Perú el estudio de Pérez y colaboradores (2001) reportan la presencia de genotipos no registrados anteriormente en Ecuador, Colombia ni Venezuela. Por su parte, los estudios de monitoreo realizados en Colombia han mostrado la existencia únicamente del tipo de apareamiento A1 (León, 2004; Marín & Mirra, 1998; Mazo & Patiño, 1995) sin embargo, un estudio de caracterización de aislados de *P. infestans* provenientes de diferentes hospederos y regiones de Colombia, mostró la existencia de una gran variación genética, situación que no puede ser explicada por un tipo de reproducción clonal, lo cual supone que ambos tipos de apareamiento pueden estar ya dentro de territorio colombiano (Amaya & Raigosa, 2006).

En cuanto a la distribución de ambos tipos de apareamiento Forbes y colaboradores (1998) mencionan que los aislados de tipo A1 había duplicado al tipo A2 en Ruanda,

Holanda, Polonia y México; pero estudios posteriores demostraron una reducción del tipo A1 frente al tipo A2. El estudio realizado desde 2003 en Francia demostró un incremento del tipo de apareamiento A2, el cual había superado el 76% hacia finales del 2007 (Corbière, Montarry, Glais, Viard, & Andrivon, 2008), mientras que Cooke y colaboradores (2008) mencionan que en Gran Bretaña esta distribución pasó de un 10% en 2004 a valores por encima del 70% hacia 2006. Goodwin y colaboradores (1998) propone que el incremento en la severidad de la enfermedad coincide con cambios genéticos en la población de *P. infestans* los cuales a su vez están asociados a la aparición del tipo de apareamiento A2 como menciona Reis, Smart, Fry, Maffia y Mizubuti (2003), además Calderon, Castro, Gilchrist, Márquez y Jaramillo (2002) agregan que el incremento de la frecuencia del tipo A2 puede estar influenciado por una mayor tolerancia a fungicidas como el Metalaxyl y una mejor adaptación a factores ambientales que pueden ser causantes de estrés. La cercanía con México puede ser un factor muy importante por el cual el tipo de apareamiento A2 se encuentra presente en Guatemala generando una alta diversidad genética a causa de una reproducción sexual. La alta proporción, a favor del tipo de apareamiento A2, coincide con la situación expuesta por varios autores a través de estudios en diferentes regiones del mundo (Corbière et al., 2008; Forbes et, 1998; Goodwin et al., 1998).

### **7.3 Caracterización genotípica por medio de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) de los aislados de *P. infestans***

El estudio de diversidad genética de *P. infestans*, a través del marcador molecular AFLP, con aislados provenientes de diferentes zonas productoras de papa y tomate para Guatemala, ha demostrado que en las zonas de estudio existe un alto grado de diversidad del patógeno. Esto puede asumirse debido a que el grado de similitud genética a través del índice de Dice mediante el método de UPGMA fue del 0.49. Al comparar dicho valor con el obtenido en el estudio de variabilidad genética de este patógeno en regiones del suroeste de Colombia (Mesa, Mideros, Jaramillo, Lagos, Pineda, & Montoya, 2008) el cual mostró un nivel de similitud alrededor del 0.86, indicando una mayor homogeneidad de la población, se logra apreciar la alta variabilidad presente en el Guatemala. Situación similar presentan Silva, Jaramillo y Marín, (2008) en su estudio de variabilidad genética de dicho patógeno, afirmando nuevamente el alto grado de variabilidad presente en el territorio guatemalteco.



Raigosa, Amaya, Jaramillo, Lagos y Marín (2009), obtuvieron resultados coincidentes en cuanto a la alta similitud de sus aislados (0.83).

En Costa Rica se han llegado a encontrar valores de diferenciación genética de 0.22 concluyendo que el flujo de genes entre poblaciones no ha sido una fuente de diversidad genética (Páez et al., 2004). El valor de diferenciación entre las poblaciones costarricenses se encuentra por debajo al encontrado en el presente estudio, al igual que los valores encontrados en otros estudios realizados en la región de Sur América como Ecuador, aunque en dicho país si se ha reportado la presencia de ambos tipos de apareamiento (Ordoñez et al., 2000).

Dentro del subgrupo 1A los aislados incluidos responden a un lugar de procedencia cercano, así como a la misma planta hospedera, que para este caso correspondió al cultivo de tomate. Esto supone que los aislados ubicados en Agua Blanca (P1) y San Agustín Acasaguastlán (P18) han migrado en ambas vías, compartiendo de esta manera parte de su material genético. Por otra parte, los aislados ubicados en el subgrupo 1B proceden entre ellos de una zona geográfica poco distante, razón por la cual se encuentran cercanas en cuanto a valores de distancia genética, sin embargo el grado de diversidad entre ambos subgrupos evidencia que si existe una diferencia genética considerable entre ambos subgrupos (0.52)

La distribución obtenida para el caso del subgrupo 2A coloca a los aislados provenientes de la región norte agrupados entre sí, siendo el caso de Cobán (P2) y Salamá (P15), ambas zonas productoras de tomate y considerablemente cercanas entre sí, sin embargo, también puede observarse la presencia de aislados provenientes de los municipios de Zunil (P3), Patzicía (P10) y San Marcos (P20); aunque estos últimos disminuyen considerablemente su similitud con los aislados provenientes de Salamá (P15) y Cobán (P2). En el subgrupo 2B aparecen los aislados con procedencia de las zonas del altiplano central y zona occidental. Al indagar dentro de cada subgrupo puede observarse que la diversidad de *P. infestans* está ligada a la planta hospedera, siendo el caso de papa y tomate, así como el lugar de procedencia; pues el dendograma muestra que la similitud entre los aislados del subgrupo 2B es mayor a medida que su ubicación geográfica es más cercana. La relación entre la similitud genética y los factores de tipo de plantas hospederas también fue hallada por Raigosa y colaboradores (2009), mediante la aplicación del marcador molecular RAPD en aislados de *P. infestans*.

En cuanto a la diversidad obtenida dentro del grupo 3 puede observarse nuevamente que existe relación entre el lugar de colecta y el tipo de cultivo hospedero, aunque el grado de similitud entre los aislados ubicados en este grupo es menor que la observada en el grupo 2. El aislado correspondiente a la zona de Sanarate (P16) muestra un nivel de similitud de 0.92 respecto al aislado obtenido de la región de Jalapa, ambas zonas productoras de tomate. Una situación similar se presenta para los otros 2 aislados de la región de Jalapa (P7) y (P8) ya que muestran un alto nivel de similitud genética, lo cual responde a su cercanía geográfica y al mismo tipo de cultivo.

Burdon y Silk (1997) establecen que la diversidad genética en la población de *P. infestans* puede estar dada por (a) el flujo de genes (b) la recombinación sexual o asexual y (c) por mutaciones. En el presente estudio, la alta diversidad genética es atribuida a la presencia de los dos tipos de apareamiento, lo cual se traduce en una reproducción sexual del patógeno incrementando de esta manera su variabilidad genética. La presencia de ambos tipos de apareamiento en Guatemala es respaldada por estudios previos realizados en la región mexicana (Gallegly & Galindo, 1958; Goodwin et al., 1992; Niederhauser et al., 1954; Tooley et al., 1985) lo cual incrementa la variabilidad genética de la población (Sujkowski, Goodwin, Dyer, & Fry, 1994; Van den Bosch et al., 2011). Esto, sumado a que el país es considerado como megadiverso, asegura que ambos tipos de apareamiento estén presentes. El uso indiscriminado de fungicidas, los cuales provocan resistencia y mutaciones en el patógeno, también incrementan la variabilidad genética de este hongo en el país.

#### **7.4 Evaluación de resistencia genética de diferentes materiales de tomate**

La prueba de resistencia permitió categorizar a aquellos materiales que mostraron resistencia a los aislados que fueron empleados para realizar las inoculaciones. La resistencia mostrada por los materiales está directamente relacionada con el tipo de gen Ph que posea, así como el tipo de aislado de *P. infestans* que sea empleado para realizar la inoculación. Los resultados obtenidos corroboran la información de Tuttle (2015) quien hace una relación con la resistencia genética de materiales comerciales de tomate, con el tipo de genes Ph y los genotipos de *P. infestans* utilizados. El híbrido Plum Reagal posee únicamente el gen de resistencia Ph 3 (Seidl et al., 2014; Tuttle, 2015) siendo el material que mostró mayor susceptibilidad, aunque en una escala moderada en comparación al testigo.

El resto de materiales comerciales evaluados mostraron ser altamente resistentes, esto debido a la presencia no solo del gen Ph 3 sino el Ph2 en el caso del híbrido Iron Lady, Defiant PHR y Mountain Merit (Tuttle, 2015). El patrón de susceptibilidad moderada mostrado por la línea NC25Pa es similar al híbrido Plum Regal, esto es debido a que dicha línea corresponde a uno de sus dos parentales de origen. Para el caso de los materiales Wapsipinicon y Matt's Wild Cherry no se conoce con cuales de genes Ph cuenta (Seidl et al., 2014; Tuttle, 2015) pero el análisis de medias ubicó a ambos en el grupo de mayor resistencia genética, lo que hace suponer que posee al menos los genes Ph 2 y Ph 3 ya que su resistencia es similar a la de los materiales Defiant PHR y Iron Lady. Para todos los casos de inoculación, el aislado proveniente de Todos Santos Cuchumatán (P22) demostró ser el más agresivo, corroborando la información de Cooke y colaboradores, (2009) quien menciona al tipo de apareamiento A2 como el de mayor agresividad, tal y como se comportó dicho aislado. El avance de la enfermedad, en aquellos materiales que sufrieron daño foliar, mostró una primera etapa de colonización en la que el avance de la enfermedad fue moderado, sin embargo a partir de este punto el avance fue mayor a medida que los días de lectura se espaciaban más.

## **7.5 Generación de híbridos de tomate**

Los híbridos fueron generados a partir de NCLCELBR2 y NC2CELBRa por la alta resistencia genética; mientras las líneas NC25Pa y NC25Pb fueron seleccionadas por las características agronómicas de forma, color y hábito de crecimiento descritas en la Tabla 1. La prueba de inoculación ayudó a poder hacer una discriminación de los híbridos en base a la resistencia genética, colocando a los híbridos en dos grupos, aunque en términos netos, el área afectada en el híbrido 3 es despreciable a pesar de estar categorizado como el de mayor susceptibilidad por la prueba de Tukey. Es evidente que los parentales NCLCELBR2 y NC2CELBRa aportan una alta resistencia a los híbridos. En cuanto al comportamiento frente a los diferentes aislados de *P. infestans*, nuevamente fue el aislado proveniente de Todos Santos Cuchumatán (P22) el de mayor agresividad por las razones expuestas anteriormente.

## 8 Conclusiones

1. Se logró obtener 22 aislados de *Phytophthora infestans* a partir de muestras de tejido foliar de los cultivos de tomate y papa colectado en las regiones del altiplano central, occidente, norte y oriente del país.
2. El análisis de los aislados de *Phytophthora infestans* mediante el marcador molecular AFLP, mostró una alta diversidad genética del patógeno, el cual fue categorizado, a través del dendograma UPGMA, en 3 grupos principales. Así mismo, mediante la amplificación de una región de 1250 pb en el locus S1 se determinó que 5 aislados pertenecen al tipo de apareamiento A1, mientras los restantes 17 pertenecen al tipo A2. Mediante la prueba de apareamiento *in vitro* estos resultados fueron corroborados existiendo total coincidencia entre ambos métodos.
3. De los 14 materiales de tomate evaluados para la determinación de resistencia genética a los aislados de *Phytophthora infestans* colectados en Todos Santos Cuchumatán, Agua Blanca y Sanarate; el híbrido Lancelot mostró completa susceptibilidad ante la inoculación con los aislados, mientras que la línea pura NC25Pa también fue afectada por los 3 aislados, pero en menor severidad, como lo demostró la prueba de Tukey. Las líneas restantes fueron categorizadas como resistentes a través de la misma prueba. A excepción de los híbridos Mountain Merit F1 y Plum Regal, los cuales fueron moderadamente susceptibles, los restantes materiales fueron incluidos dentro del grupo de materiales resistentes junto con las líneas puras. En orden de agresividad, es el aislados colectado en Todos Santos Cuchumatán el que causó el mayor daño foliar en los materiales que mostraron susceptibilidad, seguido por los aislados provenientes de Agua Blanca y Sanarate, los cuales fueron categorizados dentro de un grupo de Tukey distinto.
4. A partir de los cruces realizados se desarrollaron 4 híbridos, los cuales mostraron resistencia genética tras la inoculación con los aislados de *Phytophthora infestans* utilizados en la evaluación de las líneas puras e híbridos comerciales. A pesar de

cumplir con las expectativas de resistencia genética, aún es necesario seguir con el trabajo de mejoramiento para lograr cumplir con las características agronómicas demandadas como forma, color, consistencia, producción y resistencia genética a otros patógenos y plagas.

## 9 Referencias

- Abad, G., & Abad, J. (1995). Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pearl melon in the Andes of South America. L. Dowley, E. Bannon, L. Cooke, T. Keane & E. Sullivan (eds), *Phytophthora infestans* (pp. 239-245). Dublin: Press Ltd.
- Abu-El Samen, F. M., & Secor, G. A. (2003). Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers. *Plant Pathology*, *52*, 314-325.
- Adler, N., Erselius, L., Chacón, M., Flier, W., Ordóñez, M., Kroon, L., ... Forbes, G. (2004). Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology*, *94*, 154-162.
- Agrios, G. N. (1998). *Fitopatología*. México: Limusa.
- Amaya, M. C., & Raigosa, G. N. (2006). *Análisis de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de Phytophthora infestans utilizando marcadores moleculares* (Tesis licenciatura). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Colombia.
- Andrivon, D. (1996). The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: A critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*, *45*, 1027-1035.
- Barbosa, A., Henriques, S., Damiano, C., & Gomide, M., (2008). Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp. (formerly *Lycopersicon* sp. ), Solanales, Solanaceae). *Genetics and Molecular Biology*, *31*, 493-497.
- Black, L. L., Wang, T. C., Hanson, P., & Chen, J. T. 1996. Late Blight Resistance in Four Wild Tomato Accessions: Effectiveness in Diverse Locations and Inheritance of Resistance. *New Phytology*, *166*, 427-438.

- Brouwer, D. J., & Clair, D. (2004). Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theoretical Applied Genetics*, *108*, 628-638.
- Burdon, J. J., & Silk, J. (1997). Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, *87*, 664-9.
- Calderón, H. J., Castro, M., Gilchrist, E., Márquez, E., & Jaramillo, S. (Julio de 2002). Caracterización de las Poblaciones de *Phytophthora infestans* Presentes en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca. XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología. Nuevas Tendencias en Fitopatología. Bogotá, Colombia.
- Cooke, D., Lees, A., Shaw, D., Taylor, M., Prentice, M., Bradshaw, N., ... Bain, R. (2008). The status of GB blight populations and the threat of oospores. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain*, *40*, 217-222.
- Cooke, L. R., Little, G., & Armstrong, C. (Octubre de 2009). Recent changes in the *Phytophthora infestans* population in Northern Ireland and first results from a new all-Ireland late blight project. H. Schepers (Presidencia). Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop, Hamar, Norway.
- Corbière, R., Montarry, J., Glais, I., Viard, A., & Andrivon, D. (Octubre de 2008). Aggressiveness differences between A1 and A2 isolates of *Phytophthora infestans* from France. H. Schepers (Presidencia). Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop. Hamar, Norway.
- Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J., & Van der Wal, D. (1981). Occurrence of metalaxyl-resistance strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *87*(2), 65-68.
- Deahl, K. L., Goth, R. W., Young, R., Sinden, S. L., & Gallegly, M. E. (1991). Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in potato fields in the United States and Canada. *American Potato Journal*, *68*, 717-725.
- Deahl, K. L., Inglis, D. A., & DeMuth, S. P. (1993). Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*, isolates from north-western Washington. *American Journal of Potato Research*, *70*, 779-795.
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora* Diseases World Wide. Minnesota, Estados Unidos: American Phytopathology Society Press.
- Fernández E., Navia, O., & Gandarillas, A. (1999). Bases de las estrategias de control químico del tizón tardío de la papa desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa*, *11*, 1-25.

- Fontem, D. A., Olanyab, O. R., Tsopmbeng, G., & Owona, M. 2005. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. *Crop Protection*, 24, 449–456.
- Foolad, M. R., Merk, H. L., & Ashrafi, H. 2008. Genetics, Genomics and Breeding of Late Blight and Early Blight Resistance in Tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27 (2), 75–107.
- Forbes, G. A., Goodwin, S. B., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordoñez, M. E., & Fry, W.E. (1998). A Global Database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 82 (7), 811-818.
- Fry, W. E. & Goodwin, S. B. (1997). Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience*, 47, 363-371.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W.,... Sandlan, K. P. (1993). Historical recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications. *Plant Disease*, 77, 653-661.
- Galindo, J., & Gallegly, M. E. (1960). The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 50, 123-128.
- Gallegly, M. E., & Galindo, J. (1958). Mating type and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology*, 48, 274-277.
- Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Hamm, P. B., Yun Lee,...Fry, W. E. (2000). Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of an aggressive lineage. *Plant Disease*, 84, 731-735.
- Gisi, U., & Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 549-572.
- Goodwin S. B., Cohen, B. A., & Fry, W. E. (1994). Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 91, 11591-11595.
- Goodwin, S. B., Ludwik, S., Sujkowski, S., & Fry, W. E. (1996). Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxil in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology*, 86, 793-800.
- Goodwin, S. B., Spielman, L. J., Matuszak, J. M., Bergeron, S. N., & Fry, W. E. (1992). Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* in Northern and Central Mexico. *Phytopathology*, 82, 955-961.

- Grünwald, N. J., Flier, W. G., Sturbaum, A. K., Garay-Serrano, E., Van den Bosch, T. B., Smart, C. D.,...Fry, W. E. (2001). Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of Central Mexico. *Phytopathology*, *91*, 882-890.
- Hanson, P., Lu, Sh., Wang, J., Chen, W., Kenyon, L., Tan, Ch.,...Yang, R. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulture*, *201*, 346–354.
- Henfling, J. W. (1987). Late Blight of potato (*Phytophthora infestans*). International Potato Center Lima, Perú: International Potato Center
- Hohl, H. R., & Iselin, K. (1984). Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of British Mycological Society*, *83*, 529-530.
- Jaramillo, S. (2003). *Monografía sobre Phytophthora infestans (Mont) DeBary* (Tesis licenciatura) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia.
- Judelson, H. S. (1996). Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular and General Genetics*, *252*, 155-161.
- Judelson, H. S., Spielman, L. J., & Shattock, R. C. (1995). Genetic mapping and non-mendelian of mating type in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Genetics*, *141*, 503-512.
- Kinealy, C. 1994. *This Great Calamity: The Irish Famine*. Dublin: Gill & MacMillan.
- Koh, Y., Goodwin, B., Dyer, T., Cohen, A., Ogoshi, A., Sato, N., ... Fry, E. (1994). Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. *Phytopathology*, *84*, 922–927.
- Labate J.A., Grandillo S., Fulton T., Muños S., Caicedo A.L., Peralta I., ... Gonzalo, M. J. (2007) Tomato. C. Kole (ed.) *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants* (Vol. 5, pp. 1-125). New York: Springer.
- León. H. (2004). *Evaluación de aislamientos de Phytophthora infestans (Mont) de Bary colectados en Antioquia mediante tipo de apareamiento y haplotipos mitocondriales*. (Tesis licenciatura) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia.
- Marin, M., & Mira, J. (1998). *Caracterización de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislados de Phytophthora infestans (Mont) de Bary, en diferentes pisos térmicos y hospederos en el Departamento de Antioquia. Medellín*. (Tesis licenciatura). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias , Colombia.



- Mazo, J. & Patiño, L. (1995). *Determinación de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislados de Phytophthora infestans (Mont.) de Bary*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia.
- Mesa, M. V., Mideros, M. F., Jaramillo, S., Cotes, J. M., Lagos, L. E., Pineda, R. P., ... Montoya, M. (2008). Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes del suroeste de Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 167-172.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2011). El Agro en cifras, 2011. Dirección de Planeamiento del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2013). El Agro en cifras, 2013. Dirección de Planeamiento del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala.
- Moreau, P., Thoquet, P., Olivier, J., Laterrot, H., Grimsley, N., & De Biologie, L. 1998. Genetic Mapping of Ph-2 , a Single Locus Controlling Partial Resistance to *Phytophthora Infestans* in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(4), 259-269.
- Niederhauser, J. S. (1993). Internacional cooperation in potato research and development. *Annual Review of Phytopathology*, 31,1-21.
- Niederhauser, J. S., Cervantes, J., & Servin, L. (1954). Late blight in Mexico and its implications. *Phytopathology*, 44, 406-408.
- Nowicki, M., Foolad, M., Nowakowska, M., & Kozik, E. (2012). Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease*, 96(1), 4-17.
- Ordoñez, M. E., Hohl, J. A., Velasco, M. P., Ramon, P. J., Oyarzun, C. D., Fry, W. E., ... Erselius, L. J. (2000). A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans*, attacks wild Solanum species in Ecuador. *The American Phytopathological society*, 90(2), 197-202.
- Páez, O., Valverde, R., Gómez, L., & Brenes, A. (2004). Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans* Recolectados en plantaciones de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 28(2), 09-16.
- Peirce, L. C. 1971. Linkage Tests with Ph Conditioning Resistance to Race 0, *Phytophthora Infestans*. *Tomato Genomics Cooperative*, 21, 30-36.

- Pérez, W. G., Gamboa, S., Falcon, Y. V., Coca, M., Raymundo, R. M., & Nelson, J. R. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 91(10), 956-965.
- Raigosa, N., Amaya, M., Jaramillo, S., Lagos, L., & Marín, M. (2009). Variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en solanáceas cultivadas en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62 (1), 4761-4771.
- Reis, A., Smart, C. D., Fry, W. E., Maffia, L. A., & Mizubuti, E. S. 2003. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease*, 87, 896–900.
- Rick, C., & Chetelat, R. 1995. Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Horticulturae*, 4(12), 21-38.
- Rolfh, F. (1997). NTSYS - pc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.02. Exeter, New York: Applied Biostatistics Inc.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T.,...Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 23, 487-491.
- Samaucha, Y., & Gisi, U. (1987). Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathology*, 77, 1405-1409.
- Seidl, A., Jordan, S., & Gevens, A. (2014). Novel Resistance in Heirloom Tomatoes and Effectiveness of Resistance in Hybrids to *Phytophthora infestans* US-22, US-23, and US-24, Clonal Lineages. *Plant Diseases*, 98, 761-765.
- Silva, B., Jaramillo, S., & Marín, M. (2009). Caracterización genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 31(90), 5-20.
- Silva, B., Cotes, J., & Marín, M. (2010) Population structure of *Phytophthora infestans* in potato crops from Antioquia, Boyaca, Cundinamarca, and Norte de Santander (Colombia). *Agronomía Colombiana*, 28 (3), 375-382.
- Sokal, R., & Michener, C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409–1438.

- Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T.,...Jiang, J. (2003). Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 100, 9128–9133.
- Soto, A., Rodríguez, G., Fernández, Y., Pedraza, M., López, L., Díaz, M., & Fernández, S. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. Enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8 (8), 1867-1880
- Sujkowski, L. S., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., & Fry, W. E. (1994). Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology*, 84, 201- 207.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, A. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Therrien, C. D, Tooley, P. W, Spielman, L. J, Fry, W. E, Rith, D. L., & Shelly, S. E. (1993). Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycological Research*, 97, 945-950.
- Tooley, P. W., Fry, W. E., & Villareal, M. J. (1985). Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *The journal of Heredity*, 76, 431-435.
- Tuttle, M. (2015). Late blight management in tomato with resistant varieties. Recuperado de [http:// articles.extension.org/pages/72678/late-blight-management-in-tomato-with-resistant-varieties](http://articles.extension.org/pages/72678/late-blight-management-in-tomato-with-resistant-varieties)
- Van den Bosch, T., Li, Y., Evenhuis, B., Förch, M., Van Der Lee, T., & Kessel, G. (junio de 2011). The population structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands during the years 2000-2009. En H. Schepers (Presidencia). Proceedings of the Thirteenth EuroBlight Workshop, St. Petersburg, Russia.
- Zabeau, M., and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Publication 0534858A1. European Patent Office, Munich, Germany

## 10 Apéndices

### Apéndice 1: Análisis de varianza factorial realizado a los materiales de tomate y aislados de *Phytophthora infestans*

#### Análisis de la varianza

| Variable | N   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Area     | 168 | 0.98           | 0.98              | 24.27 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.     | SC        | gl  | CM      | F      | p-valor |
|----------|-----------|-----|---------|--------|---------|
| Modelo.  | 129514.31 | 15  | 8634.29 | 589.05 | <0.0001 |
| Material | 128655.46 | 13  | 9896.57 | 675.17 | <0.0001 |
| Aislado  | 858.85    | 2   | 429.43  | 29.30  | <0.0001 |
| Error    | 2228.00   | 152 | 14.66   |        |         |
| Total    | 131742.31 | 167 |         |        |         |

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=5.25478

Error: 14.6579 gl: 152

| Material           | Medias | n  | E.E.   |
|--------------------|--------|----|--------|
| Iron Lady          | 0.00   | 12 | 1.11 A |
| NCLCELBR2          | 0.00   | 12 | 1.11 A |
| NC2CELBRb          | 0.00   | 12 | 1.11 A |
| NCLCELBR1          | 0.00   | 12 | 1.11 A |
| NC2CELBRa          | 0.11   | 12 | 1.11 A |
| Wapsipinicon Peach | 0.43   | 12 | 1.11 A |
| Defiant            | 0.89   | 12 | 1.11 A |
| Matt's Wild Cherry | 1.11   | 12 | 1.11 A |
| Mountain Magic     | 1.22   | 12 | 1.11 A |
| NC25Pb             | 4.00   | 12 | 1.11 A |
| Mountain Merit     | 28.67  | 12 | 1.11 B |
| NC25Pa             | 40.08  | 12 | 1.11 C |
| Plum Regal         | 46.35  | 12 | 1.11 D |
| Retana             | 98.03  | 12 | 1.11 E |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.69827

Error: 14.6579 gl: 152

| Aislado | Medias | n  | E.E.   |
|---------|--------|----|--------|
| TDS     | 18.92  | 56 | 0.51 A |
| AB      | 14.70  | 56 | 0.51 B |
| SAN     | 13.71  | 56 | 0.51 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Apéndice 2: Análisis de varianza factorial realizado a los híbridos de tomate y aislados de *Phytophthora infestans***

**Análisis de la varianza**

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R<sup>2</sup></u> | <u>R<sup>2</sup> Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Área afectada   | 48       | 0.84                 | 0.80                    | 23.42     |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo.     | 78.45     | 5         | 15.69     | 14.96    | <0.0001        |
| Material    | 20.83     | 3         | 6.94      | 36.62    | 0.0001         |
| Aislado     | 57.62     | 2         | 28.81     | 27.47    | <0.0001        |
| Error       | 44.05     | 42        | 1.05      |          |                |
| Total       | 122.50    | 47        |           |          |                |

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.11842**

*Error: 1.0489 gl: 42*

Material Medias n E.E.

|           |      |    |      |     |
|-----------|------|----|------|-----|
| Híbrido 2 | 0.30 | 12 | 0.30 | A   |
| Híbrido 4 | 0.53 | 12 | 0.30 | A   |
| Híbrido 1 | 1.17 | 12 | 0.30 | A B |
| Híbrido 3 | 2.00 | 12 | 0.30 | B   |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)*

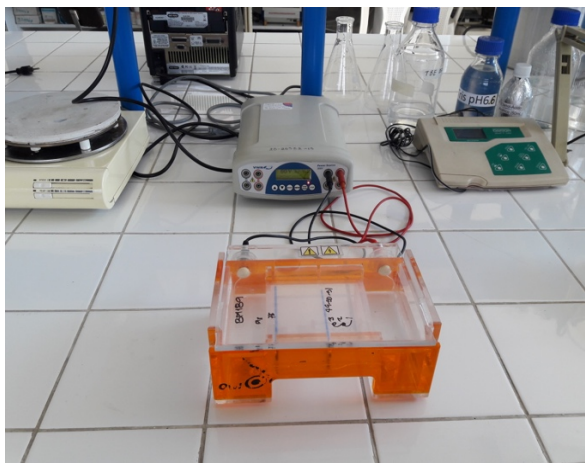
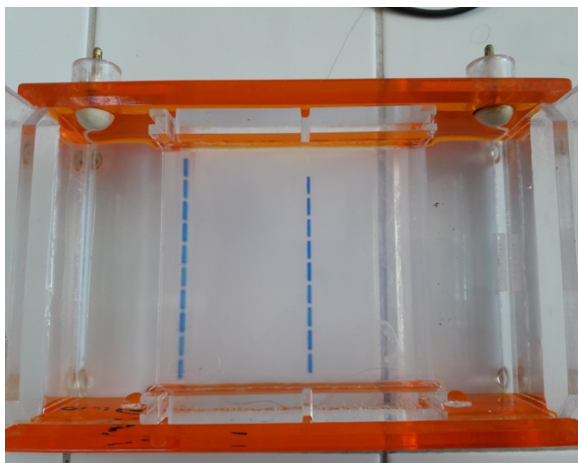
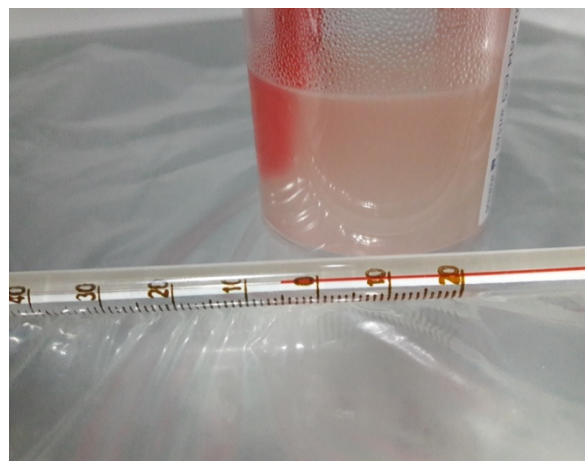
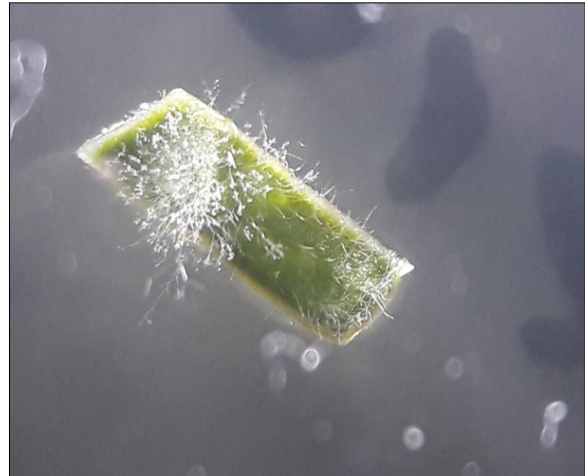
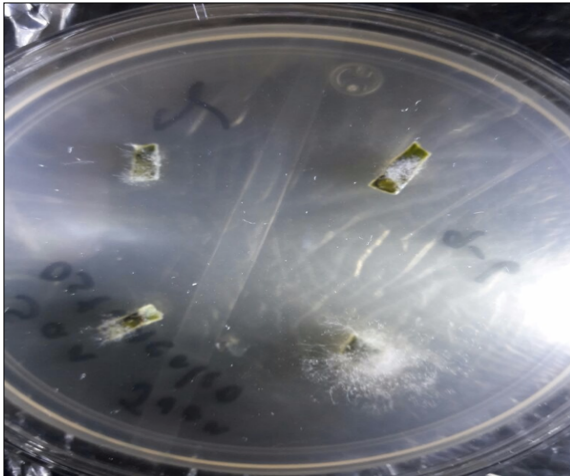
**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.87970**

*Error: 1.0489 gl: 42*

| <u>Aislado</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> |
|----------------|---------------|----------|-------------|
| Todos Santos   | 2.53          | 16       | 0.26 A      |
| Agua Blanca    | 0.48          | 16       | 0.26 B      |
| Sanarate       | 0.00          | 16       | 0.26 B      |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)*

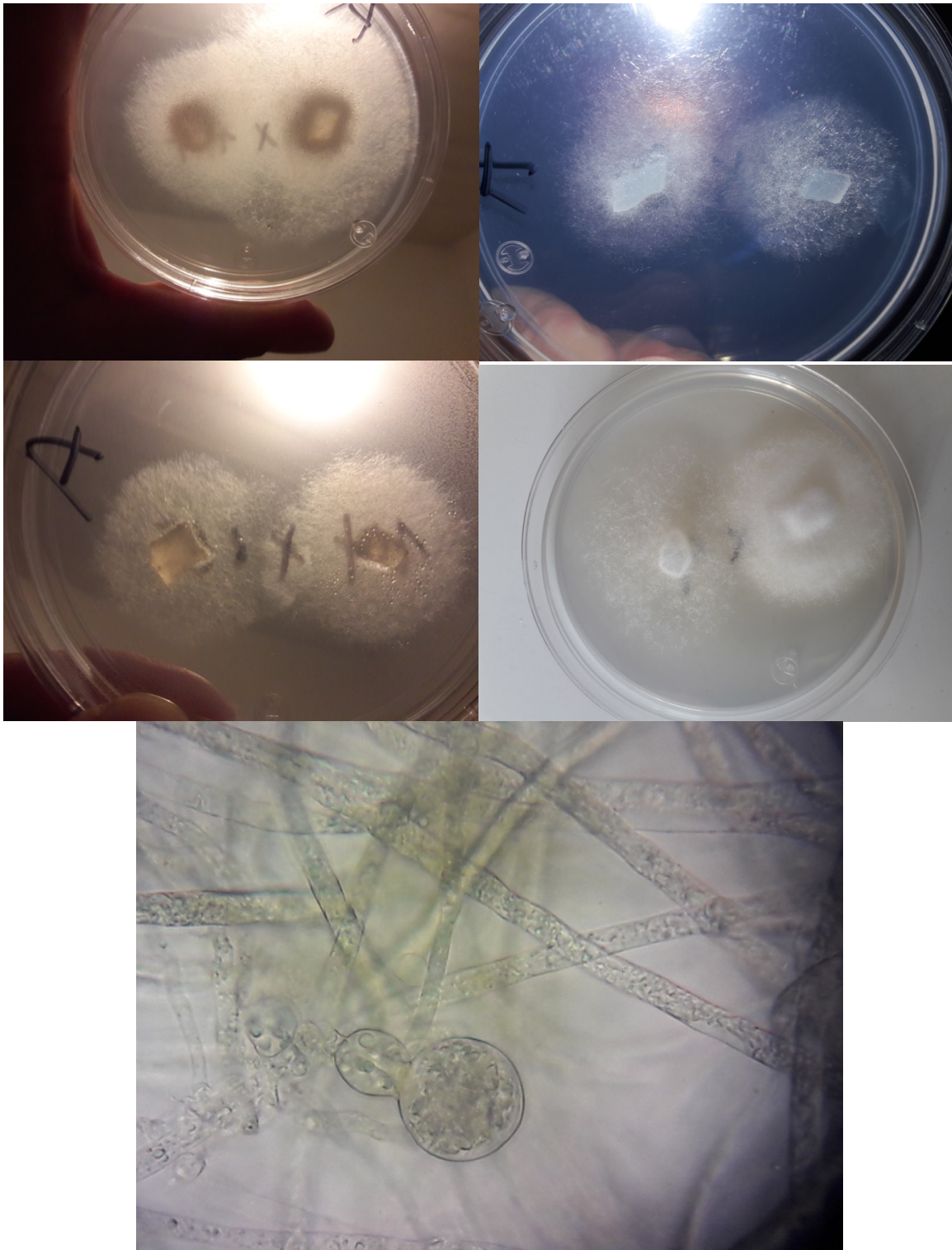
**Apéndice 3: Fotografías del desarrollo *in vitro* de *Phytophthora infestans*, preparación de solución para inoculación y proceso de electroforesis para determinación del tipo de apareamiento.**



**Apéndice 4: Fotografías de la evaluación de resistencia genética con inoculación de aislados de *Phytophthora infestans*.**



**Apéndice 5: Fotografías de la evaluación del método de apareamiento in vitro de *Phytophthora infestans*.**





## 11 Actividades de gestión, vinculación y divulgación

- Se contó con el apoyo de productores de papa en los departamentos de Quetzaltenango (Asociación de productores de papa de San Juan Ostuncalco), y en el departamento de Huehuetenango (Cooperativa Agrícola Paquixeña, Cuchumatanes y Cooperativa Agrícola Joya Hermosa, Aguacatán).
- Se contó con el apoyo de productores de tomate en los departamentos de Baja Verapaz, Jalapa, Chiquimula, Jutiapa y El Progreso.
- Se tuvo el apoyo de la Universidad de Carolina del Norte, del cual se obtuvo germoplasma de tomate los cuales mostraron resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) colectados en Guatemala. .
- Se redactó un artículos para la revista Ciencia Tecnología y Salud de la Digi, como parte del compromiso del proyecto.

## 12 Orden de pago

### LISTADO DE TODOS LOS INTEGRANTES DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

| <b>Contratados por la contraparte y colaboradores</b> |             |
|---|-------------|
| Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez                  | Coordinador |
|   |             |
|   |             |

### CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

| <b>Contratados por la Dirección General de Investigación</b> |              |                      |      |    |
|--|--------------|----------------------|------|----|
| Nombre   | Categoría    | Registro de personal | Pago |    |
|  |              |                      | SI   | NO |
| Julio Ernesto Berdúo Sandoval                                | Investigador | 20101438             | X    |    |
| José Alejandro Ruiz Chután                                   | Investigador | 20101034             | X    |    |

| Nombre                        | Firma |
|-------------------------------|-------|
| Julio Ernesto Berdúo Sandoval |       |
| José Alejandro Ruiz Chután    |       |