



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DEL MILDIU (*Bremia lactucae*  
Regel) EN SALAMANCA Y SAN MIGUEL DE ALLENDE,  
GUANAJUATO, MEDIANTE RAPD E ISSR.**

**SUSANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2008**

---

---

## INDICE GENERAL

<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b> .....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<b>SUMMARY</b> .....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1. Interacción planta-patógeno .....	11
2.2. Importancia y problemática del cultivo de lechuga en México .....	11
2.3. Generalidades de <i>Bremia lactucae</i> .....	13
2.3.1. Descripción del patógeno .....	14
2.3.1.1. El micelio .....	14
2.3.1.2. Los esporangióforos .....	14
2.3.1.3. Los esporangios .....	14
2.3.1.4. Las oosporas .....	15
2.3.2. Importancia de la enfermedad .....	15
2.3.3. Ciclo de vida y epidemiología .....	16
2.3.3.1. Medición de enfermedades .....	18
2.3.3.2. Medición de la incidencia de enfermedades .....	18
2.3.3.3. Severidad como un factor de la estimación de pérdidas. ....	18
2.4. Genética y biología de poblaciones de hongos fitopatógenos .....	19
2.5. Estructura genética de poblaciones de hongos fitopatógenos .....	20
2.6. Factores que influyen en la estructura genética de poblaciones de hongos fitopatógenos. ....	20
2.6.1. Mutación .....	20
2.6.2. Recombinación .....	21

2.6.3. Flujo de genes .....	21
2.6.4. Selección .....	21
2.7. Marcadores moleculares en hongos fitopatógenos -----	22
2.7.1. Ventajas de los marcadores moleculares.....	23
2.8. Clasificación de los Marcadores Moleculares -----	24
2.8.1. Técnicas basadas en la hibridación.....	24
2.8.2. Técnicas basadas en PCR que usan iniciadores arbitrarios o amplifican multilocus. Polimorfismo en el ADN Amplificado al Azar (RAPD). .....	25
2.8.2.2. Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). ---	27
2.8.2.3. Minisatélites y Microsatélites -----	28
2.8.2.4. Secuencias Simples Repetidas (SSR) -----	29
2.8.2.5. Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR). -----	30
2.8.2.5.1. Características y aplicabilidad de los microsatélites -----	31
2.9. Variabilidad genética de <i>Bremia lactucae</i> -----	32
2.10. Marcadores de ADN en <i>Bremia lactucae</i> -----	32
<b>3. OBJETIVOS -----</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS -----</b>	<b>35</b>
4.1. Localización de los sitios de muestreo-----	35
4.2. Variables ambientales registradas en los sitios de muestreo. -----	35
4.3. Muestreo del material vegetal -----	36
4.4. Incidencia y severidad de <i>Bremia lactucae</i> en lechuga -----	37
4.5. Obtención del micelio de <i>Bremia lactucae</i> .-----	38
4.6. Extracción de ADN -----	39
4.6.1. Método de Organismo tipo Micoplasma (MLO) modificado por Rojas-Martínez (1998). .....	39
4.6.2. Modificación del método Ahrens y Seemüller (1992).....	39
4.6.3. Calidad del ADN .....	40
4.6.4. Cuantificación del ADN.....	41
4.7. Caracterización genética por (RAPD) Polimorfismo en el ADN amplificado al azar-----	41

4.8. Caracterización genética por (ISSR) Inter-Secuencias Simples Repetidas o Microsatélites. -----	42
4.9. Separación y visualización de productos de amplificación-----	42
4.10. Análisis de datos -----	43
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----</b>	<b>44</b>
5.1. Incidencia y severidad de <i>Bremia lactucae</i> en lechuga. -----	44
5.2. Efecto de factores ambientales sobre la severidad de <i>Bremia lactucae</i> .-----	46
5.3. Aislamiento del ADN -----	55
5.4. Análisis de los marcadores moleculares RAPD en los aislados de <i>B. lactucae</i> -----	55
5.5. Análisis de los marcadores moleculares Microsatélites en los aislados de <i>B. lactucae</i> . -----	55
5.5. 1. Análisis de agrupamiento molecular de los aislados de Salamanca .....	62
5.5.2. Análisis de agrupamiento molecular de los aislados de San Miguel de Allende.....	63
<b>6. CONCLUSIONES -----</b>	<b>67</b>
<b>7. LITERATURA CITADA -----</b>	<b>68</b>
<b>8. ANEXOS -----</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Ciclo de vida del mildiu Velloso en lechuga causado por <i>Bremia lactucae</i> (Modificado de Agrios, 1998).....	17
2	Colecta de tejido con síntomas y enfermo por <i>Bremia lactucae</i> en los municipios de Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato.....	35
3	Escala modificada de De Dios (2003) para determinar la severidad del mildiu ( <i>Bremia lactucae</i> ) en lechuga.....	38
4	Comportamiento mensual de las variables temperatura, humedad relativa, humedad en la hoja y precipitación en los municipios Salamanca y San Miguel de Allende.....	47
5	Condiciones ambientales (Temp.:Temperatura, PP:Precipitación, H H: Humedad en la hoja, HR:Humedad relativa) del 21 de agosto en Salamanca.....	48
6	Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H H: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) del 20 de octubre en San Miguel de Allende.....	48
7	Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H H: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de agosto del 2005 en Salamanca, Guanajuato.....	49
8	Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H Hoja: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de septiembre del 2005 en San Miguel de Allende, Guanajuato.....	50
9	Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H H: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de octubre del 2005 en San Miguel de Allende, Guanajuato.....	51

10	Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H H: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de noviembre del 2005 en Salamanca, Guanajuato.....	52
11	Condiciones ambientales promedio por semana del mes de diciembre del 2005 en San Miguel de Allende, Guanajuato.....	53
12	Presencia de ADN en gel de agarosa al 1 %.....	55
13	(a). Productos de amplificación con el iniciador DBB-CGA <sub>5</sub> , en seis aislados de <i>Bremia lactucae</i> procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.....	58
14	(a). Productos de amplificación con el iniciador BVD-CAG <sub>5</sub> , en seis aislados de <i>Bremia lactucae</i> procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.....	59
15	(a). Productos de amplificación con el iniciador BDD-CAC <sub>5</sub> , en seis aislados de <i>Bremia lactucae</i> procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.....	59
16	(a). Productos de amplificación con el iniciador BDD-CCA <sub>5</sub> , en seis	61

	aislados de <i>Bremia lactucae</i> procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.....	
17	Agrupamiento de los aislados de <i>Bremia lactucae</i> provenientes de las variedades de lechuga cultivadas en Salamanca, Guanajuato y obtenidos del análisis de las Inter-Secuencias Simples Repetidas.....	63
18	Agrupamiento de los aislados de <i>Bremia lactucae</i> provenientes de las variedades de lechuga cultivadas en San Miguel de Allende, Guanajuato y obtenidos del análisis de las Inter-Secuencias Simples Repetidas.....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

1	Variedades de lechuga (susceptibles y resistentes) obtenidas en campos de cultivo de Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato, México.....	36
2	Severidad del mildiu en las variedades cultivadas en el municipio de Salamanca, Guanajuato.....	45
3	Severidad del mildiu en las variedades cultivadas en el municipio de San Miguel de Allende, Guanajuato.....	45
4	Número de bandas de ADN amplificadas y polimórficas obtenidas con los aislados de <i>B. lactucae</i> .....	56

Variabilidad genética del mildiu (*Bremia lactucae* Regel) en Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato, mediante RAPD e ISSR

Susana Martínez Martínez M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

*Bremia lactucae* Regel causa una de las enfermedades de mayor importancia en la lechuga a nivel mundial. Debido a que este pseudohongo presenta dos tipos de reproducción: sexual y asexual, su diversidad genética es amplia y puede dar origen a nuevas razas. Dicha situación se desconoce en México, por lo que es importante conocer este aspecto en las zonas productoras de esta hortaliza, así como también la influencia que ejercen los factores ambientales sobre la incidencia y severidad del patógeno. Por ello, fueron determinadas la incidencia y severidad de *B. lactucae* en 15 variedades de lechuga, además se registraron variables ambientales como la temperatura, humedad relativa, humedad de la hoja y precipitación en los municipios de Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato. También se determinó la variabilidad genética de este patógeno mediante el uso de las técnicas moleculares de RAPD (se probaron 10 iniciadores al azar) e ISSR (10 iniciadores previamente reportados) en 15 aislados de *B. lactucae* obtenidos de las 15 variedades de lechuga.

Los resultados indican que temperaturas de 10 a 15 °C y humedad relativa superior al 80 %, son condiciones que favorecen la incidencia y severidad de *B. lactucae*. La humedad de la hoja y la precipitación no tuvieron relación con el crecimiento del hongo, ya que en el periodo de estudio la precipitación fue escasa y los sensores de humedad de la hoja no se encuentran a nivel del cultivo. Utilizando la técnica de ISSR se detectó variabilidad genética (polimorfismo de 91.6 %) de *B. lactucae* en los sitios estudiados, que con base en los patrones polimórficos, se detectaron 3 grupos diferentes en Salamanca y 5 grupos distintos en San Miguel de Allende. Con el uso de RAPD, no fue posible detectar variabilidad genética de este patógeno.

Palabras clave: *Bremia lactucae*, mildiu, diversidad genética, microsatélites.



Genetic Variability of the mildew (*Bremia lactucae* Regel) in Salamanca and San Miguel de Allende, Guanajuato, by RAPD and ISSR  
Susana Martínez Martínez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2008

*Bremia lactucae* Regel causes one of the most important diseases worldwide in lettuce. This pseudofungus presents two types of reproduction: sexual and asexual, so its genetic diversity is wide and may give origin to new races. Currently this fact is unknown in Mexico, reason why it is important to know mainly in the productive areas of lettuce; as well as the influence of the environmental factors on the incidence and severity of the disease. In this study, incidence and severity of *B. lactucae* were determined in 15 lettuce varieties; also, environmental variables as temperature, relative humidity, leaf surface wetness and precipitation were recorded in the municipalities of Salamanca and San Miguel de Allende, Guanajuato. Genetic variability of 15 isolates of *B. lactucae* obtained of 15 varieties of lettuce was determined, by using the molecular techniques RAPD (10 primers were randomly tested) and ISSR (10 primers previously reported were tested). The results indicate that temperatures between 10 and 15 °C and relative humidity above 80%, are optimal conditions for high incidence and severity of *B. lactucae*. However, leaf surface wetness and precipitation did not show any effect on fungus growth, some of the reasons to explain this situation were the low precipitation during the period of the study, and the lack of devices to record leaf surface wetness *in situ*. By using the ISSR technique genetic variability of *B. lactucae* was detected (polymorphism of 91.6 %) in the study plots; based on the polymorphic patterns, three groups were detected in Salamanca and five groups in San Miguel de Allende. With the use of RAPD, it was not possible to detect genetic variability of this pathogen.

Key Words: *Bremia lactucae*, mildew, genetic diversity, microsatellite.

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la SAGARPA (1997), en México la producción de hortalizas se realiza en alrededor de 512,000 hectáreas, lo que equivale a 3.5% de la superficie agrícola nacional. El cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una de las hortalizas de mayor importancia y se cultiva en una extensión de 9 379 ha, siendo los principales estados productores Puebla, Guanajuato, Baja California Norte, Zacatecas y San Luis Potosí. La lechuga tradicionalmente se cultiva en campo, aunque en la actualidad se está cultivando en condiciones de invernadero debido a la demanda de productos frescos y libres de patógenos (Cobelli *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2002).

Las enfermedades de las plantas son un factor limitante para la producción cuando no se dispone de cultivares resistentes. Son el resultado de las interacciones entre la planta y el patógeno (bacteria, hongo, virus, fitoplasma o nematodo (Davis *et al.*, 2002), condiciones ambientales, el manejo y hombre (Hans-Jürgen y Hoyningen-Huene, 1986). Es por ello que el objetivo de varias investigaciones está enfocado hacia la protección de los cultivos contra las enfermedades causadas por patógenos para satisfacer y mantener la demanda de los alimentos en el mundo (Herrera-Estrella y Simpson, 1995; Baker *et al.*, 1997).

*Bremia lactucae* Regel es un oomicete que induce la enfermedad del mildiu en aproximadamente 36 plantas diferentes del género de las Compuestas (Smith, 1992), silvestres y cultivadas, (Lebeda y Petrzelova, 2004; Grube y Ochoa, 2005). A nivel mundial el mildiu es considerado una de las enfermedades más importantes y devastadoras de la lechuga, ya que se encuentra presente en los sistemas de producción en campo y en invernadero, principalmente en regiones donde las temperaturas son relativamente bajas y las hojas de la lechuga están con frecuencia húmedas (Davis *et al.*, 2002). Las epidemias causadas por este patógeno pueden ser tan devastadoras que causan pérdidas importantes en la recolección, transporte y almacenamiento postcosecha (Zink *et al.*, 1962; Gull *et al.*, 1990; Scherm y Van

Bruggen, 1994), e inclusive pueden llegar a ocasionar que la cosecha no sea comerciable (Scherer y Van Bruggen, 1994; Davis *et al.*, 2002).

Debido a la presencia de los dos grupos de compatibilidad (B1 y B2) y a su capacidad homotética existe alta variabilidad genética que puede dar lugar a la presencia de una gran diversidad de razas fisiológicas (Crute, 1987, Michelmore *et al.*, 1987, Yuen y Lorbeer, 1987) que cuando los factores ambientales y el manejo le son propicios pueden influir de manera negativa al cultivo en deterioro de la sanidad. Esto debido a que en México no existe información acerca del mildiu, es decir, que no se cuenta con estudios epidemiológicos y mucho menos de variabilidad genética, lo cual dificulta su manejo. Con los avances de la Biología Molecular, principalmente con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han desarrollado técnicas que pueden utilizarse en la caracterización y evaluación de la diversidad genética (Hoelzel, 1994). Una de estas técnicas son los marcadores moleculares que proveen información acerca de la variabilidad genética dentro de una población, facilitando el entendimiento y predicción del desarrollo de una enfermedad, así como su relación genética (Huff *et al.*, 1994)

Es por ello que la presente investigación tuvo como objetivo estudiar la variabilidad genética de *Bremia lactucae* en diferentes poblaciones procedentes de Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato, mediante la utilización de técnicas moleculares como los RAPD e ISSR.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Interacción planta-patógeno

Las enfermedades de las plantas son un factor limitante para la producción agrícola cuando no se realiza un manejo adecuado de estas, pues llegan a ocasionar pérdidas considerables en su rendimiento y calidad. Estos problemas fitopatológicos tienen diferentes causas y etiologías, son resultado de las interacciones complejas entre la planta y el patógeno (bacteria, hongo, virus, fitoplasma o nematodo (Davis *et al.*, 2002), condiciones ambientales y el hombre (Hans-Jürgen y Hoyningen-Huene, 1986).

### 2.2. Importancia y problemática del cultivo de lechuga en México

La lechuga es un cultivo autopolinizado que se originó en el área mediterránea (Vavilov, 1951). La más temprana indicación de su existencia viene de aproximadamente 4 500 años a. c. en pinturas de las tumbas de Egipto, que muestran plantas con hojas estrechas del tipo “lechuga espárrago” (Ryder, 1979). En la actualidad, la lechuga es el cultivo más importante para el mercado en fresco en los EUA en términos de peso, producción y valor de mercado. La mayoría de las lechugas son de tipo Crisphead y representa el vigésimo sexto lugar de la lista de frutas y verduras comunes por su valor nutritivo (Pérez *et al.*, 1997).

Según la SAGARPA (1997), en México la producción de hortalizas se realiza en alrededor de 512,000 hectáreas, lo que equivale a 3.5% de la superficie agrícola nacional. El cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una de las hortalizas de mayor importancia y se cultiva en una extensión de 9 379 hectáreas, siendo los principales estados productores Puebla, Guanajuato, Baja California Norte, Zacatecas y San Luis Potosí. La lechuga tradicionalmente se cultiva en campo. En los últimos años el cultivo en invernadero esta tomando auge debido a la demanda de productos frescos (Cobelli *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2002).

Entre los principales factores que afectan la producción del cultivo se encuentran la falta de un control adecuado de malezas, fertilización inadecuada, así como la incidencia de plagas y enfermedades, siendo estas últimas un importante factor limitante para la producción de lechugas cuando no se dispone de cultivares resistentes. Las 75 enfermedades reportadas en lechuga son resultado de la interacción entre la planta, el patógeno (bacteria, hongo, virus, fitoplasma o nematodo), condiciones ambientales (Davis *et al.*, 2002) y el manejo proporcionado por el hombre. De estas, las enfermedades más importantes son las ocasionadas por bacterias y hongos, dentro de estos últimos se encuentra el mildiu, el cual es inducido por *Bremia lactucae* y es considerada una de las enfermedades más importantes y devastadoras de la lechuga, ya que se encuentra presente en los sistemas de producción en campo e invernadero en todo el mundo, principalmente en regiones donde las temperaturas son relativamente bajas y las hojas de la lechuga están con frecuencia húmedas (Wu *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2002). Las epidemias causadas por este patógeno pueden ser devastadoras. Niveles relativamente bajos de infección son capaces de reducir la calidad de la cosecha, causar pérdidas importantes en la recolección y facilitar la pudrición durante el transporte y almacenamiento postcosecha (Zink *et al.*, 1962; Gull *et al.*, 1990; Scherm y Van Bruggen, 1994). Niveles altos de enfermedad pueden ser la causa de que la cosecha no sea comerciable (Scherm y Van Bruggen, 1994; Davis *et al.*, 2002). Maroto *et al.* (2000), resaltan la importancia que tiene el combatir al mildiu durante los primeros períodos vegetativos y sobre todo en la fase de semillero, pues el estado sanitario que tenga una plantación de lechuga dependerá de la protección que las plantas hayan recibido en el mismo; además, las condiciones climáticas y las prácticas de riego juegan también un papel muy importante en el desarrollo de las epidemias del mildiu en el cultivo de lechuga. Normalmente, se observa más enfermedad en el cultivo de lechuga cuando se utiliza el riego por aspersión que en el riego por gravedad, debido a la duración más prolongada de la humedad foliar, al aumento de la humedad en el aire de la copa y/o al incremento de la dispersión de inóculo por salpicaduras (Davis *et al.*, 2002). En los últimos años, las estrategias de control del mildiu involucran el uso de cultivares resistentes, los cuales a partir de

1950 empezaron a cobrar importancia en Europa (Maroto *et al.*, 2000). Los cultivares resistentes (Brown *et al.*, 2004; Johnson, 1984) tienen genes específicos de resistencia del huésped (genes individuales dominantes) o niveles moderados de resistencia en el campo (probablemente genes múltiples). Desde aquí la resistencia del gen individual ha proporcionado altos niveles de control durante muchos años, pero han surgido razas de *Bremia lactucae* que superan esta resistencia; además de la presencia de estas, el manejo que se da en el cultivo juega un papel muy importante en el desarrollo de las epidemias del mildiu de la lechuga (Wu *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2002). Otro de las estrategias de control son la aplicación de fungicidas (Johnson, 1984) entre estos se encuentran los de contacto y sistémicos. Y como última estrategia, los estudios epidemiológicos y los sistemas de predicción de la enfermedad, los cuales están basados en el supuesto de que los periodos de infección aparecen principalmente cuando la humedad foliar termina a las 10 de la mañana o más tarde (Brown *et al.*, 2004).

### 2.3. Generalidades de *Bremia lactucae*

La enfermedad del mildiu se conoce en Europa desde 1843, fue descrita por el investigador Regel. Es una enfermedad común en las zonas productoras de lechuga tanto en campo abierto como en invernadero (Walker, 1965). Aunque en América se conoce desde 1875, cobra importancia a partir de 1982, cuando diferentes razas de *Bremia lactucae* causaron pérdidas considerables de lechuga en California (Brown *et al.*, 2004).

Clasificación de *Bremia lactucae* según Kirk *et al* (2001)

Dominio: Eucariota

Reino: Straminopila

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Bremia*

Especie: *lactucae*

Las especies del genero *Bremia* son parásitos obligados (Davis *et al.*, 2002) que se distinguen de otros miembros de los Peronosporales por los extremos dilatados de sus esporangioforos ramificados dicotómicamente. En las preparaciones observadas al microscopio los esporangios se observan colapsos apareciendo en forma de disco de copa (Mendoza y Pinto., 1985).

### 2.3.1. Descripción del patógeno

#### 2.3.1.1. El micelio

El micelio es cenocítico, intercelular y emite haustorios globosos, pequeños en forma de perilla (Mendoza y Pinto., 1985), su diámetro es de 5 a 12  $\mu\text{m}$ ; los haustorios son de 15  $\mu\text{m}$  de largo y de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. El micelio se desarrolla con alta humedad relativa y una temperatura de 20 a 22 °C, lo mismo sucede con la formación de haustorios (Dixon, 1981).

#### 2.3.1.2. Los esporangióforos

Los esporangióforos son rígidos, hialinos, emergen en grupos de 2 a 3 a través de los estomas y están ramificados dicotómicamente, ensanchados en su ápice dando la apariencia de un disco, rodeado por esterigmas (usualmente 4) delgados, donde se originan los esporangios (Mendoza, 1999). La producción de esporangióforos se da con temperaturas de 6 a 23 °C, con película de agua (Dixon, 1981) y varían de longitud de 200 a 1200 (Verhoeff, 1960).

#### 2.3.1.3. Los esporangios

Los esporangios son esféricos a ovoides, con una longitud de 12 a 31  $\mu\text{m}$  y un ancho de 11 a 275  $\mu\text{m}$  (Davis *et al.*, 2002) hialinos lisos, presentan una pequeña papila y germinan directamente mediante tubos germinativos, o bien, pueden liberar

zoosporas hialinas, globulares y biciliadas (Mendoza, 1999). Los oogonios y los anteridios se producen aproximadamente 4 días después de la inoculación.

#### 2.3.1.4. Las oosporas

Las oosporas son esféricas, de 27 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y están rodeadas por una espesa pared. La producción de estas conduce a la senescencia localizada del hospedante, impidiendo la reproducción asexual del patógeno (Davis *et al.*, 2002).

*Bremia lactucae* es principalmente heterotálico, es decir, se necesitan de dos tipos de apareamiento (B1 y B2) para la producción de oosporas, aunque también se han encontrado aislados homotálicos (Crute, 1987; Ilott *et al.*, 1987; Yuen y Lorbeer, 1987). En algunas regiones productoras, solamente puede estar presente uno de los tipos de apareamiento, esto podría explicar porque las oosporas no se encuentran con frecuencia. Contrario a lo que sucedió en un campo de Nueva York, en el cual se encontraron los dos tipos compatibles B1 y B2. La presencia o ausencia del ciclo sexual está correlacionado con la presencia de variabilidad genética y la habilidad de las poblaciones para cambiar en su virulencia (Hulbert y Michelmore, 1988). La recombinación sexual es la responsable de la variabilidad genética en este patógeno (Crute, 1987; Maisonneuve *et al.*, 1994).

#### 2.3.2. Importancia de la enfermedad

El mildiu es una de las enfermedades más serias e importantes del cultivo de la lechuga en todo el mundo (Brown *et al.*, 2004; Grube y Ochoa, 2005) al afectar principalmente la calidad de la planta. Las pérdidas económicas por la enfermedad varían dependiendo de la región geográfica, la época del año y el tipo de lechuga (Smith, 1992). Es difícil valorar directamente las pérdidas económicas que ocasiona *Bremia lactucae*, debido a ello se han realizado algunos estudios en donde se le señala como la enfermedad fungosa más importante de la lechuga en varios países (Smith, 1992). Dixon (1981) señala que dichas pérdidas económicas alcanzan del 30 al 50%. En invernadero, esta enfermedad es una de las más agresivas, ataca plantas



jóvenes (Achar, 1996), de manera que los primeros síntomas se pueden observar sobre los cotiledones, los cuales, una vez infectados se ponen cloróticos, se secan y mueren prematuramente. Las plantas atacadas quedan debilitadas y por tanto son sensibles a cualquier otro parásito (Maroto *et al.*, 2000).

Los ataques suelen manifestarse a partir de que empieza a formarse el cogollo, apareciendo primero en las hojas externas que son las que inicialmente se contaminan. Enseguida aparecen en ellas zonas más o menos grandes que empiezan a reducir la intensidad del verde normal, se tornan cloróticas y posteriormente se oscurecen y finalmente se necrosan. El contorno de estas manchas es anguloso y limitado por las nervaduras. En la zona atacada, y sobre todo en la parte del envés, se forma como un fieltro blanco-harinoso constituido por las fructificaciones del hongo (Maroto *et al.*, 2000).

### 2.3.3. Ciclo de vida y epidemiología

El mecanismo de distribución determina la diseminación de la enfermedad en el campo (Wu *et al.*, 2001b). Las oosporas presentes en el suelo son fuente de inóculo primario, aunque no está confirmado. La lechuga cultivada y algunas plantas silvestres pueden ser otro medio o fuente de inóculo (Wu *et al.*, 2001b). La distribución secundaria de esta enfermedad se da mediante los esporangios que son transportados por el viento (Wu *et al.*, 2000) y por salpicaduras de agua (Wu *et al.*, 2001b). La germinación de los esporangios de *B. lactucae* se da con temperaturas de 2 a 10° C, siendo las óptimas de 10 a 15 °C, cuando la duración de la humedad en las hojas es de 2 a 4 horas (Wu *et al.*, 2001a), estos mismos autores encontraron que cuando hay menos de 4 horas de humedad en la hoja y la temperatura aumenta de 20 a 25 °C, el porcentaje de germinación de esporangios disminuye considerablemente. Los esporangios son producidos por la noche después de un período oscuro seco, seguido de unas horas de humedad casi absoluta y baja velocidad del viento, y pueden penetrar e infectar a las hojas después de 3 horas de haber sido depositados en la superficie de la hoja (Wu *et al.*, 2000; Wu *et al.*,

2001a). Estos esporangios son liberados por la mañana a humedades relativas de entre 50 y 90%, la dispersión de estos empieza normalmente a la salida del sol y alcanza su nivel mas alto entre las 10:00 a.m y 12:00 p.m (Davis *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2001a). La germinación de las esporas asexuales o esporangios está altamente influenciada por la duración de la humedad en la hoja y temperatura (Schermer y van Bruggen., 1994). Mientras que la esporulación se da únicamente en períodos de oscuridad, humedad relativa alta y velocidad baja de viento (Schermer y van Bruggen., 1994). En general, la esporulación favorable del hongo se presenta durante la noche, cuando la humedad relativa es alta y la velocidad del viento es baja (Wu *et al.*, 2001a). La temperatura que favorece la esporulación varía de 4 a 20 ° C, con un óptimo de 10 a 15 ° C o 6 a 11 ° C y una humedad relativa superior al 80% (Su *et al.*, 2004).

La infección de *B. lactucae* se da cuando los esporangios germinan y penetran a las células de la hoja o por estomas, según la temperatura y la susceptibilidad de los tejidos, en 5 a 14 días se forma una nueva producción de esporas (Smith, 1992). Aunque se ha reportado que la infección puede llevar solamente 3 horas en condiciones óptimas (10 a 15° C), en presencia de agua corriente o humedad relativa superior al 80%. Las temperaturas varían de -5 ° C a 20 ° C (Davis *et al.*, 2002). En la Figura 1 se describe el ciclo de vida de *Bremia lactucae*.

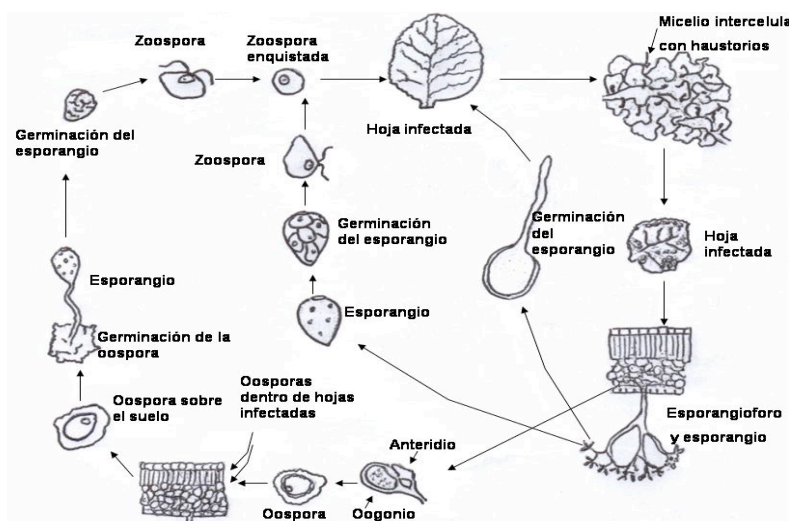


Figura. 1. Ciclo de vida del mildiu en lechuga causado por *Bremia lactucae* (Modificado de Agríos, 1998).

### 2.3.3.1 Medición de enfermedades

La medición de la intensidad de una enfermedad (incidencia o severidad) es un requisito indispensable en estudios epidemiológicos básicos, así como en la caracterización cuantitativa de epidemias, estudios de pronóstico, comparación de diversas prácticas de manejo de enfermedades y en la estimación de pérdidas de producción (Campbell y Madden, 1990). El mejor método para medir una enfermedad, es el entendimiento de la misma, para esto se requiere de un examen completo de la sintomatología y de la manera como afecta al hospedante (Large, 1966). Varias técnicas se han desarrollado para medir las enfermedades (Large, 1966). De los aspectos que se pueden medir, algunos autores reconocen que la incidencia es más fácil de medir que la severidad; cualquier relación cuantificable entre las dos medidas permite una estimación de la severidad basada en los datos de incidencia, lo que representa un gran beneficio en aquellas áreas donde la estimación de la enfermedad y de la pérdida en la producción tienen limitaciones que impiden la toma de datos precisa de la severidad (Seem, 1984).

### 2.3.3.2. Medición de la incidencia de enfermedades

La incidencia implica el número de plantas enfermas muestreadas que son expresadas en términos de porcentaje o proporción del total de unidades estimadas (Seem, 1984; Gaunt, 1987). La incidencia es una medida rápida y fácil que es generalmente más segura y reproducible que otras medidas cuantitativas (Gaunt, 1987).

### 2.3.3.3. Severidad como un factor de la estimación de pérdidas.

La severidad de una enfermedad es el área de una unidad de muestreo afectada y expresada como un porcentaje o proporción del área total y junto con las pérdidas que se produzcan en el hospedante pueden ser usadas para determinar el impacto económico (Nutter *et al.*, 1991).

## 2.4. Genética y biología de poblaciones de hongos fitopatógenos

Los cambios genéticos observados en los patógenos y parásitos de las plantas, ha sido bastante amplia debido a que estos fenómenos están marcados principalmente por aspectos epidemiológicos y del ambiente (Burdon, 1993). La diversidad de patógenos y parásitos en las plantas ha sido bastante amplia, por su constante interacción y la adaptación a cambios en su ambiente (McDonald, 1997).

Uno de los aspectos más dinámicos e importantes en la biología de las poblaciones es que las características de los individuos de una especie no son fijas, esto es debido a que varían de un individuo a otro. Un hecho real es que se espera que todos los individuos que resultan de un proceso sexual difieran entre sí y de sus progenitores en numerosas características, aún cuando conserven la mayoría de similitudes con ellos y pertenezcan a la misma especie. Este es el caso de los hongos que resultan de esporas sexuales, y cuando se reproducen asexualmente; la frecuencia y el grado de variabilidad entre la progenie disminuye ampliamente, pero aún así, ciertos individuos de la descendencia mostrarán diferentes características (Agrios, 2004).

McDonald y McDermont (1993) mencionan que, con el incremento de la agricultura intensiva, basada principalmente en cultivos uniformes o clones, las poblaciones de patógenos tienen la habilidad para desarrollarse y adaptarse a medidas genéticas o de control químico, provocando con esto una rápida adaptación del patógeno.

Para poder asegurar un largo periodo de suministro de productos alimenticios, nuevas estrategias podrían ser desarrolladas, basadas sobre todo en el entendimiento de la genética y biología poblacional de las interacciones planta-patógeno, que podrían aplicarse como herramienta de control para las enfermedades (Wolfe, 1985).

## 2.5. Estructura genética de poblaciones de hongos fitopatógenos

La estructura genética de poblaciones se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética que existe dentro y entre poblaciones de hongos fitopatógenos (McDonald, 1997; McDonald *et al.*, 1999). Dicha información puede ser usada para inferir el relativo impacto de las diferentes fuerzas evolutivas que influyen la biología de las poblaciones de patógenos y con esto, predecir el potencial de evolución de las mismas dentro de los ecosistemas agrícolas. También puede ser usada para predecir en que período de tiempo un método de control puede ser mas efectivo, ya que las poblaciones con un alto nivel de variabilidad genética pueden adaptarse más rápidamente a hospedantes resistentes y/o fungicidas (McDonald, 1997; McDonald *et al.*, 1999).

## 2.6. Factores que influyen en la estructura genética de poblaciones de hongos fitopatógenos.

La mutación, migración, selección y segregación tienen impacto en la genética de poblaciones y sobre el patrón de variación observado en las secuencias moleculares de los genes (Hartl y Clark, 1997).

### 2.6.1. Mutación

La mutación es un factor importante como fuente de variación genética en las poblaciones de hongos fitopatógenos (McDonald, 1997). Es un cambio más o menos repentino en el material genético de un organismo que es transmitido hereditariamente a la progenie (Agrios, 2004).

Es probable que las mutaciones que determinan la virulencia no ocurran con más frecuencia que las que determinan cualquiera de las características heredadas, pero dado el gran número de descendientes que dejan los patógenos, es probable que

cada año aparezcan en la naturaleza un gran cantidad de mutantes que difieren de su progenitor en su grado de virulencia (Agrios, 2004).

### 2.6.2. Recombinación

La recombinación o el tipo de reproducción tanto sexual, asexual o una combinación de ambas, incrementa la diversidad genética en las poblaciones permitiendo la formación de nuevas combinaciones genéticas (Burdon, 1993). Los hongos fitopatógenos que se reproducen de forma sexual tienden a ser más diversos genéticamente que las poblaciones asexuales de la misma especie (Milgroom, 1996).

El proceso de recombinación ocurre durante la reproducción sexual de los hongos. En estos microorganismos, los gametos o núcleos haploides suelen dividirse para producir micelio y esporas haploides, que resultan en grupos de individuos genéticamente distintos relativamente homogéneos, que pueden producir asexualmente grandes poblaciones hasta el siguiente ciclo sexual (Agrios, 2004).

### 2.6.3. Flujo de genes

Se refiere a los mecanismos resultantes en el flujo de genes de una población a otra, dando como resultado cambios debidos al movimiento de gametos y de individuos o grupos de individuos de un lugar a otro, seguido por la recolonización, o el intercambio de segmentos extranucleares de ADN tales como mitocondria y plásmidos, entre otros (Slatkin, 1987). La ocurrencia de un alto flujo de genes, facilita la similitud genética entre poblaciones (McDermott y McDonald, 1993).

### 2.6.4. Selección

La selección, se ha definido como cambios genéticos recíprocos que ocurren en dos o más especies que interactúan ecológicamente. Sin embargo, esta definición es muy simple y se enfoca simplemente en términos de la coevolución, debido a que los

fitomejoradores en sus experimentos controlan la mitad de la interacción coevolutiva en patosistemas agrícolas. Si la selección natural o coevolución está presente en poblaciones de hongos fitopatógenos, es posible mantener altos niveles de flujo de genes (McDonald *et al.*, 1996).

## 2.7. Marcadores moleculares en hongos fitopatógenos

En las últimas décadas, los marcadores moleculares han sido usados para cuantificar la variación genética, descifrar la distribución espacial y distinguir como se genera y mantiene la variación genética (McDonald *et al.*, 1999). Los estudios sobre la biología y genética en los hongos fitopatógenos se han basado en el análisis de sus características morfológicas, bioquímicas y aloenzimas. Sin embargo, estos métodos han demostrado ser insuficientes (Weising *et al.*, 1995); en años recientes con los avances en la Biología Molecular, la introducción de técnicas de hibridación de ADN y las que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), marcan una nueva era en la aplicación de la genética molecular (Erlich y Arnheim, 1992), para la identificación y taxonomía de microorganismos, como hongos fitopatógenos (Ward *et al.*, 1998). Varias de las nuevas técnicas moleculares basadas en PCR, son directamente aplicables a la sistemática de los hongos, específicamente a nivel de especie. Esas herramientas pueden ser usadas para delimitar y determinar las relaciones entre especies a través de la comparación de análisis filogenéticos (Bridge *et al.*, 1998). Los marcadores genéticos tienen numerosas aplicaciones en los estudios de hongos fitopatógenos (Michelmore y Hulbert, 1987; Hulbert *et al.*, 1988), sirven para identificar cepas y aislados, también pueden ser usados en el estudio de los mecanismos de variación de virulencia, misma que es generada y mantenida por las poblaciones de patógenos (Hulbert *et al.*, 1988).

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos. Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de interferencia

epistática o ambiental limitaban su uso. La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos. El número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado y la aplicación de la técnica se expandió prácticamente a todas las especies de plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Actualmente existen diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN, los llamados marcadores moleculares. Estos son definidos como cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Un marcador molecular recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia Mendeliana (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Villamon, 2000).

La importancia de los marcadores moleculares, se basa en la infinidad de aplicaciones que tienen (Moore y Durham, 1992), como son: la realización de mapas genómicos y estudios taxonómicos. Los marcadores basados en ADN, según Tanksley *et al.*, (1989), se detectan como diferencias en la información genética entre individuos.

#### 2.7.1. Ventajas de los marcadores moleculares

Según Ferreira y Grattapaglia (1998), las principales ventajas de los marcadores moleculares son:

1. El nivel de polimorfismo de los marcadores moleculares es generalmente alto para cada locus estudiado facilitando la construcción de mapas genéticos, en contraste con el mayor esfuerzo y planificación necesarios para construir mapas genéticos a partir de marcadores morfológicos, puesto que el número reducido de estos restringe la cobertura total del genoma. El limitado polimorfismo que presentan los marcadores morfológicos, generalmente hace que el investigador deba recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamientos genéticos.



2. En general, son neutros con relación a los efectos fenotípicos, con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo.
3. En su mayoría, son codominantes y contienen mayor cantidad de información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría son dominantes o recesivos.
4. Pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo de la planta. Mientras que los marcadores morfológicos presentan la desventaja de ser identificados, en su mayoría sólo a nivel de planta entera o adulta.

## 2.8. Clasificación de los Marcadores Moleculares

La mayoría de los marcadores moleculares se incorpora en alguna de estas categorías de técnicas que usan la hibridación o están basados en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

### 2.8.1. Técnicas basadas en la hibridación.

Incluye principalmente los RFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción). Los RFLP han sido usados en muchos estudios sobre hongos fitopatógenos y están basados en la hibridación del ADN (McDonald, 1997), donde los fragmentos de la sonda son cortados con endonucleasas de restricción y visualizados en geles de agarosa (McDermott y McDonald, 1993). Esta técnica detecta variación en las secuencias del ADN entre las secciones homólogas de los cromosomas; en estudios sobre hongos fitopatógenos, se incluye ADN mitocondrial y ADN nuclear (McDermott y McDonald, 1993).

La técnica de RFLP, se ha utilizado para el estudio de las relaciones entre la patogenicidad y filogenia de *Leptosphaeria maculans* (Koch *et al.*, 1991), la diversidad genética a nivel de un solo campo de *Mycosphaerella graminicola* (anamorfo *Septoria tritici*) (McDonald y Martínez, 1990), en *Bremia lactucae* (Hulbert y Milchemore, 1988), *Rhynchosporium secalis* (McDonald *et al.*, 1999), así como en

la determinación de flujos de genes en *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Rosewich *et al.*, 1999).

Una desventaja de los RFLP es que requieren cantidades relativamente grandes 5 a 10 µg de ADN con alta calidad y personal con experiencia para el análisis; estos marcadores incluyen clonación y la generación de sondas. Los materiales utilizados en esta técnica son costosos, en comparación con los análisis por RAPD, sin embargo, ofrecen la ventaja de ser más reproducibles (McDonald, 1997). Los marcadores RFLP generalmente describen un número limitado de alelos (Lee *et al.*, 1995), y al igual que los RAPD, no necesariamente reflejan la cantidad de variación genética presente en los genes que condicionan esa propiedad (McDonald, 1997).

Las ventajas de estos marcadores son las diversas aplicaciones que tienen, incluyendo el desarrollo de mapas genéticos (Hulbert *et al.*, 1988); de la misma forma que los RAPD, los RFLP son fácil de interpretar (McDonald, 1997). El análisis de RFLP revela altos niveles de heterocigotos y el polimorfismo entre varios aislados de alrededor del mundo (Hulbert y Michelmore, 1988; Sicard *et al.*, 2003)

2.8.2. Técnicas basadas en PCR que usan iniciadores arbitrarios o amplifican multilocus. Polimorfismo en el ADN Amplificado al Azar (RAPD).

Tienen la característica de no necesitar mayor información de la secuencia del genoma que se esta investigando.

La técnica de ADN-RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ha sido la metodología más ampliamente utilizada en la PCR para diferentes propósitos (Valádez y Kahl, 2000), utiliza pequeños iniciadores de secuencias aleatorias, para amplificar múltiples regiones del ADN (Burdon, 1993; McDermott y McDonald, 1993; Bridge *et al.*, 1998); usualmente tienen un contenido de GC mayor a 50%. Estos iniciadores no contienen secuencias repetidas inversas internas (“autocomplementarias”) y se pegan a distintos sitios en un genoma, si es que existen diferentes sitios blanco para ellos. Los productos de amplificación se separan

en geles de agarosa, se tiñen con bromuro de etidio y finalmente se visualizan bajo luz ultravioleta (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas (Valádez y Kahl, 2000).

Según (Bridge *et al.*, 1998), la técnica de RAPD-PCR tiene las siguientes ventajas:

1. No necesita información previa de la secuencia del ADN. El protocolo es relativamente simple y rápido, y las cantidades de ADN que se necesitan son nanogramos, para obtener producto de PCR.
2. La técnica es preferida cuando los genotipos de un gran número de especies, población o patotipos necesitan ser diferenciados. Los marcadores RAPD también pueden ser usados para analizar el parentesco en genotipos y ubicar en diferentes niveles taxonómicos.
3. Es una buena herramienta para crear mapas genéticos y ha probado ser un buen método para la identificación de marcadores moleculares.
4. Esta técnica es conveniente para estudiar poblaciones genéticas y ha tenido mucho éxito para diferenciar entre especies de plantas, animales y dentro de especies, cepas de bacterias y hongos.

La utilización de los RAPD en hongos fitopatógenos ha sido eficaz para diferenciar poblaciones de estos a nivel de especie y razas. Algunos ejemplos de hongos en los que se ha utilizado esta técnica son: *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Phytophthora cinnamomi*, *Tuber magnatum* y *Glomus mosseae*, en los que se utilizó para diferenciar a nivel de especie la forma especial (Dobrowolsky y O'Brien, 1993; Lanfranco *et al.*, 1993; Manulis *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1998). Para determinar variación genética, se ha empleado en los siguientes hongos: *Erysiphe cichoracearum*, *Fusarium oxysporum* (Bentley *et al.*, 1995), *Magnaporthe poae* (Huff *et al.*, 1994), *Alternaria* spp. (Sharma y Tewari, 1998), *Ophiostoma piceae* (Pipe *et al.*, 1995) y *Botrytis cinerea* (Yourman *et al.*, 2000). Para diferenciar a nivel de razas, en *Peronospora valerianellae* (Pietrek y Zinkernagel, 2002).

Es de utilidad para la determinación de distintos grupos infraespecíficos, como son los diferentes grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* (Duncans *et al.*, 1993) y grupos de patógenos (Brigde *et al.*, 1998). También se ha empleado en la identificación de *Aspergillus flavus* (Bayman y Cotty, 1993) y en la autenticación de algunas especies de *Trichoderma* (Schlick *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1998).

Los marcadores de RAPD, proporcionan un método rápido para generar mapas genéticos y analizar poblaciones, especies de un género, diferentes géneros de una familia (Valádez y Kahl, 2000). Aunque en otros trabajos los RAPD han sido menos usados porque usualmente son marcadores dominantes (Milgroom, 1996).

#### 2.8.2.2. Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

La técnica de los AFLP (Amplified Fragment length polymorphism por sus siglas en inglés) se basa en la amplificación selectiva por medio de la PCR de fragmentos de restricción del total de ADN genómico digerido. La técnica involucra tres pasos: 1) Restricción del ADN y ligación de los adaptadores de oligonucleótidos, 2) amplificación selectiva de los juegos de fragmentos de restricción y 3) análisis del gel de los fragmentos amplificados. Usando este método, se pueden visualizar series de fragmentos de restricción por medio de la reacción en cadena de la polimerasa sin el conocimiento de la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, el número de fragmentos que pueden ser amplificados simultáneamente, depende de la resolución del sistema de detección. Típicamente de 50 a 100 fragmentos de restricción son detectados y amplificados en un gel de poliacrilamida, pueden ser marcadores dominantes (McDonald, 1997) y codominantes (Vos *et al.*, 1995).

Los AFLP ofrecen una herramienta potencial para detectar polimorfismos en las secuencias de ADN de los hongos fitopatógenos (McDonald, 1997). Se han utilizado para determinar mapas genéticos de *Peronospora parasítica* (Sicard *et al.*, 2003), también se han utilizado para diferenciar algunos patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, aislados de diferentes regiones (González-Chavira *et al.*, 2004).

Las desventajas de los AFLP, es que requiere personal con experiencia en el manejo de enzimas de restricción y geles de poliacrilamida, aunque a veces sufren las mismas limitaciones que los RAPD (McDonald, 1997).

### 2.8.2.3. Minisatélites y Microsatélites

Recientemente se ha descubierto la existencia de secuencias de ADN extremadamente variables tanto en animales como en plantas. Uno de estos son las secuencias de ADN en minisatélites que consisten en repeticiones en serie de una secuencia (Moore y Durham, 1992). Las secuencias están a menudo dispersas a través del genoma y representan diferentes loci (Moreno *et al.*, 1998). En cada locus, los alelos pueden representarse por un número variable de repeticiones de secuencia una tras otra. De esta manera, una simple prueba homóloga para la secuencia común puede revelar simultáneamente variabilidad en muchos loci, produciendo la huella genética de un organismo (Moore y Durham, 1992).

El término microsatélite fue introducido por Litt y Luty (1989) para caracterizar la Secuencia Simple Repetida amplificada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También son conocidas como repeticiones cortas tandem (STRs) o secuencia simple repetida (SSR) (Gupta *et al.*, 1996) y consisten en secuencias cortas repetidas mono, di, tri y tetranucleótidos. Son de longitud variable (Brunel, 1994; Groppe *et al.*, 1995) semejantes a las secuencias que han sido ampliamente distribuidas en el genoma eucariota (Moreno *et al.*, 1998), en el cual incluye a algunos hongos fitopatógenos. También suelen encontrarse, aunque en menos frecuencia, en genoma de procariontes (Groppe *et al.*, 1995); los microsatélites son una importante clase de marcadores de ADN, por su abundancia e hipervariabilidad (Gupta *et al.*, 1996) y difieren de los minisatélites debido a que estos (frecuentemente son llamados VNTR “Variable Number of Tandem Repeat Loci”), son secuencias repetidas que tienen unidades repetidas con rangos de 11 a 60 pb de longitud. Los minisatélites fueron reportados primeramente por Jeffreys *et al* (1985). Su utilidad completa en PCR fue sugerida mucho tiempo después. Los microsatélites

están distribuidos al azar en el genoma mientras que los minisatélites, generalmente están confinados a telómeros (Gupta *et al.*, 1996). Con la ayuda de una sonda se han utilizado para detectar huellas genómicas de hongos (DeScenzo y Harrington, 1994). Los minisatélites producen bajos niveles de polimorfismo (Moreno *et al.*, 1998).

#### 2.8.2.4. Secuencias Simples Repetidas (SSR)

Conocidas en español como Secuencias Simples Repetidas (SSR) o microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Las secuencia  $(AT)_n$ ,  $(GA)_n$ , son muy abundantes y se encuentran dispersos en el genoma de la planta (Gupta *et al.*, 1996), y la secuencia  $(CAT)_5$  sólo en algunos hongos fitopatógenos (Groppe *et al.*, 1995). Con el uso de esta técnica se ha observado un alto nivel de polimorfismo, que deriva de diferencias en el grado de repetición de la unidad repetida dentro del microsatélite, resultando en numerosas variantes alélicas.

Esta nueva técnica está siendo ampliamente usada para estudiar la diversidad genética de plantas (Moreno *et al.*, 1998). Los SSR son motivos de secuencias de nucleótidos repetidos en tándem (uno a seis nucleótidos por motivo) y usualmente son altamente polimórficos debido al número variable de repeticiones (Tenzer *et al.*, 1999).

Los microsatélites están agrupados en tres clases, de acuerdo con Gobbin *et al* (2003):

- (1) Repeticiones perfectas, donde cada repetición es seguida de la siguiente sin interrupciones.
- (2) Repeticiones imperfectas, donde las repeticiones son interrumpidas por bases no-repetidas, y
- (3) Componentes repetidos, donde dos o más unidades repetidas son adyacentes a la otra.

Los SSR se han desarrollado para la identificación de cepas (Groppe *et al.*, 1995), genotipos, elaboración de mapas genéticos (Gobbin *et al.*, 2003), y diversidad genética de *Venturia inaequalis* (Tenzer *et al.*, 1999). Los SSR tienen la ventaja que son más informativos (Tenzer *et al.*, 1999), comparado con algunos marcadores como lo son RFLP o RAPD, es una técnica sencilla de manejar, las cantidades de ADN que requiere son muy pequeñas para la amplificación por PCR y los resultados son altamente reproducibles (Tenzer *et al.*, 1999). Para estudios en los que la planta esta asociada a un hongo, los microsatélites tienen la ventaja de que los análisis los hace directamente de la planta, ya que los iniciadores son suficientemente específicos (Groppe *et al.*, 1995). En resumen, los microsatélites son codominantes y de ahí que sean ampliamente usados en la elaboración de mapas genéticos (Tenzer *et al.*, 1999).

#### 2.8.2.5. Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR).

Recientemente, se ha descrito una novedosa técnica que permite la detección de polimorfismo en loci minisatélites, así como microsatélites sin el conocimiento previo de la secuencia de ADN (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1998). Las Inter-Secuencias simples Repetidas (ISSR), es un nuevo tipo de marcador de ADN el cual incluye el uso de secuencias de microsatélites para la amplificación del ADN directamente de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Ratnaparkhe *et al.*, 1998b). Se han propuesto dos nombres para esta técnica: 'Inter Simple Sequence Repeat PCR' (ISSR-PCR o ISSR) (Zietkiewicz *et al.*, 1994), y 'polimorfismos de microsatélites amplificados al azar' (RAMP) (Wu *et al.*, 1994). La técnica involucra el uso de un solo iniciador compuesto por una secuencia microsatélite más una secuencia arbitraria corta, la cual se ancla a la región microsatélites y amplifica por medio de PCR la región entre los dos SSR relacionados y opuestamente orientados (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1998). Así como también posibilita la amplificación de ADN genómico y provee información acerca de muchos loci simultáneamente. Reportes recientes muestran la herencia Mendeliana en los fragmentos de la Secuencia Simple Repetida (SSR) como marcadores dominantes

(Tsumura *et al.*, 1996; Ratnaparkhe *et al.*, 1998b), o como marcadores codominantes (Wu *et al.*, 1994; Ratnaparkhe *et al.*, 1998b). Las secuencias son abundantes, dispersas a través del genoma y altamente polimórficos en comparación con otros marcadores moleculares como los Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y Polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias (RAPD) (Ratnaparkhe *et al.*, 1998a; Ratnaparkhe *et al.*, 1998b). Ratnaparkhe *et al.* (1998b), fueron los primeros en demostrar que los marcadores ISSR son útiles en la identificación de un gen y pueden ser usados para encontrar marcadores ligados a genes de interés. El uso de los microsatélites como marcadores de ADN se implementaron en hongos del genero *Trichoderma* (Meyer *et al.*, 1992), en la identificación de cepas y especies de *Aspergillus*, *Penicilium* y *Trichoderma* (Meyer *et al.*, 1992). El uso de microsatélites específicos se iniciaron en el género de *Epichloe* (Groppe *et al.*, 1995) y *Venturia inaequalis* (Tenzer *et al.*, 1999).

#### 2.8.2.5.1. Características y aplicabilidad de los microsatélites

La razón principal del incremento del uso de los ISSR como una herramienta molecular es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o (PIC) Polymorphic Information Content (Powell *et al.*, 1996).

Características de los microsatélites:

1. Son altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
2. Ser técnicamente simples: la tecnología de PCR puede ser fácil y rápidamente utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.
3. Ser una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de DNA son requeridas.
4. Ser analíticamente simples: los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles.
5. Ser abundantes: los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kbp.



6. Ser ampliamente aplicables: los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros, y
7. Ser de fácil intercambio de datos entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los iniciadores.

### 2.9. Variabilidad genética de *Bremia lactucae*

La variabilidad patogénica de *Bremia lactucae* fue descrita por Hulbert y Michelmore (1988), quienes demostraron que los aislados analizados se encontraban agrupados de uno a cuatro patotipos con subgrupos los cuales al parecer habían sido generados por la variación asexual. El aumento en la variabilidad probablemente ha sido el resultado de la falta de cultivares de lechuga, y sobre todo la no rotación de fungicidas lo que a su vez genera resistencia del patógeno (Brown *et al.*, 2004). Los principales estudios realizados sobre la variabilidad genética en *B. lactucae* se han hecho en California, país donde se ha observado predominantemente la transición de las poblaciones asexual a sexual, lo cual ha incrementado variabilidad y por consecuencia las epidemias tempranas, situación que dificulta su control (Brown *et al.*, 2004). La presencia o ausencia del ciclo sexual está correlacionado con la cantidad de variación y la habilidad de las poblaciones para cambiar en virulencia (Hulbert y Michelmore, 1988). *B. lactucae* es un patógeno altamente variable con un gran número de genotipos que difieren en virulencia, estos se han encontrado en *Lactuca serriola* y otras especies de compuestas silvestres (Lebeda y Petrzelova, 2004). En algunos estudios realizados en Europa se ha demostrado la presencia de numerosos fenotipos virulentos (Ilot *et al.*, 1987).

### 2.10. Marcadores de ADN en *Bremia lactucae*

La utilización de las técnicas moleculares en el estudio del genoma de *B. lactucae*, se ha convertido en el objetivo de numerosos trabajos de investigación en países donde el cultivo de lechuga es de los más importantes (Hulbert y Michelmore, 1988).

Recientemente los marcadores moleculares cobran gran importancia en el estudio del genoma de hongos fitopatógenos de importancia económica. Particularmente los marcadores más utilizados en la identificación de aislados provenientes de varias partes del mundo de *B. lactucae* son los RFLP y los RAPD para la identificación de genes. Como la alternativa más actual se encuentran los microsatélites con los cuales se obtiene alto nivel de polimorfismo y sobre todo son ideales para describir las poblaciones de *B. lactucae* en distintas regiones, (Stefan Wagner, comunicación personal), ya que estos pueden exhibir un gran número de variantes alélicas diferentes y de esta manera ser más informativos (Lee *et al.*, 1995).

### 3. OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de los factores ambientales sobre la incidencia y severidad del mildiu en el cultivo de lechuga en Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato.
2. Determinar la variabilidad genética de 15 aislados de *Bremia lactucae*, obtenidos de diferentes variedades de lechuga procedentes de Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato, mediante técnicas moleculares como los RAPD e ISSR.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Localización de los sitios de muestreo

El tejido vegetal con síntomas y enfermo fue colectado en dos municipios del Estado de Guanajuato: San Miguel Allende, ubicado a 1870 msnm dentro de las coordenadas geográficas 101°06'06" latitud Norte y 100°39'08" longitud Oeste y Salamanca cuyas coordenadas geográficas son 101°11'39" longitud Oeste y 20°34'22" latitud Norte, como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Colecta de tejido enfermo de *Bremia lactucae* en los municipios de Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato.

### 4.2. Variables ambientales registradas en los sitios de muestreo.

Las variables ambientales de temperatura, humedad relativa, humedad de la hoja, precipitación fueron registradas en la estación meteorológica automatizada, La Mina en el caso de San Miguel de Allende y la de Los Aguilares para Salamanca. Las

lecturas fueron registradas cada 15 minutos durante las 24 horas del día en los diferentes meses de muestreo, agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre.

#### 4.3. Muestreo del material vegetal

Para el muestreo del material vegetal se tomaron muestras de hojas al azar de 15 variedades de lechuga enfermas con *Bremia lactucae* en campos de cultivo ya establecidos, las cuales se encontraban en diferentes etapas de crecimiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variedades de lechuga (susceptibles y resistentes) obtenidas en campos de cultivo en Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato, México.

Municipio	Variedad	Resistencia y susceptibilidad	Procedencia
Salamanca	Montecristo	Susceptible	Salamanca
	FallGreen	Susceptible	Salamanca
	Summertime	Susceptible	Salamanca
	Magnum	Susceptible	Santa Rita
	King Henry	Susceptible	Churi 1
	Napoleón	Susceptible	Churi 2
San Miguel de Allende	Sundavil	Susceptible	Santa Martha
	Rayder	Susceptible	Santa Martha
	Siskiyou	Susceptible	Santa Martha
	Rayder	Susceptible	Mina 5
	VerteMar	Susceptible	Nacimiento 4
	Alfa	Resistente a las razas 1-5	Mina 3
	Mágnun	Susceptible	Mina 3
	Sundavil	Susceptible	Mina 7
Summertime	Susceptible	Mina 7	

Las hojas cortadas desde su base fueron etiquetadas y guardadas en bolsas de papel y trasladadas en una hielera al laboratorio del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados. Los muestreos se realizaron de forma mensual en los meses de agosto a diciembre del 2005.

#### 4.4. Incidencia y severidad de *B. lactucae* en lechuga

La incidencia y severidad del patógeno se midió una vez en cada fecha de muestreo, agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre del 2005. En las 15 variedades de lechuga, se determinó el número de lesiones por hoja en un total de 25 plantas por unidad experimental. Los datos fueron obtenidos y analizados en dos experimentos completamente al azar: Uno en San Miguel de Allende y otro en Salamanca. Para medir la incidencia se contó el número de plantas enfermas, y para medir la severidad se utilizó la escala modificada (Figura 3) descrita por De Dios (2003) en el (Anexo 8.5). Se contó el número de manchas por hojas, iniciando de las más externas a las internas, y se le asignó un valor entre 0 y 5 correspondiente a la escala, de los cuales se obtuvo un promedio, mismos que fueron convertidos a porcentaje de daño con la misma escala.

Guía para medir la severidad de *Bremia lactucae* en campo:

- 0: Sin daño
- 1: Representa 2 manchas
- 2: Representa 4 manchas
- 3: Representa 7 manchas
- 4: Representa 8 manchas
- 5: Representa 12 manchas

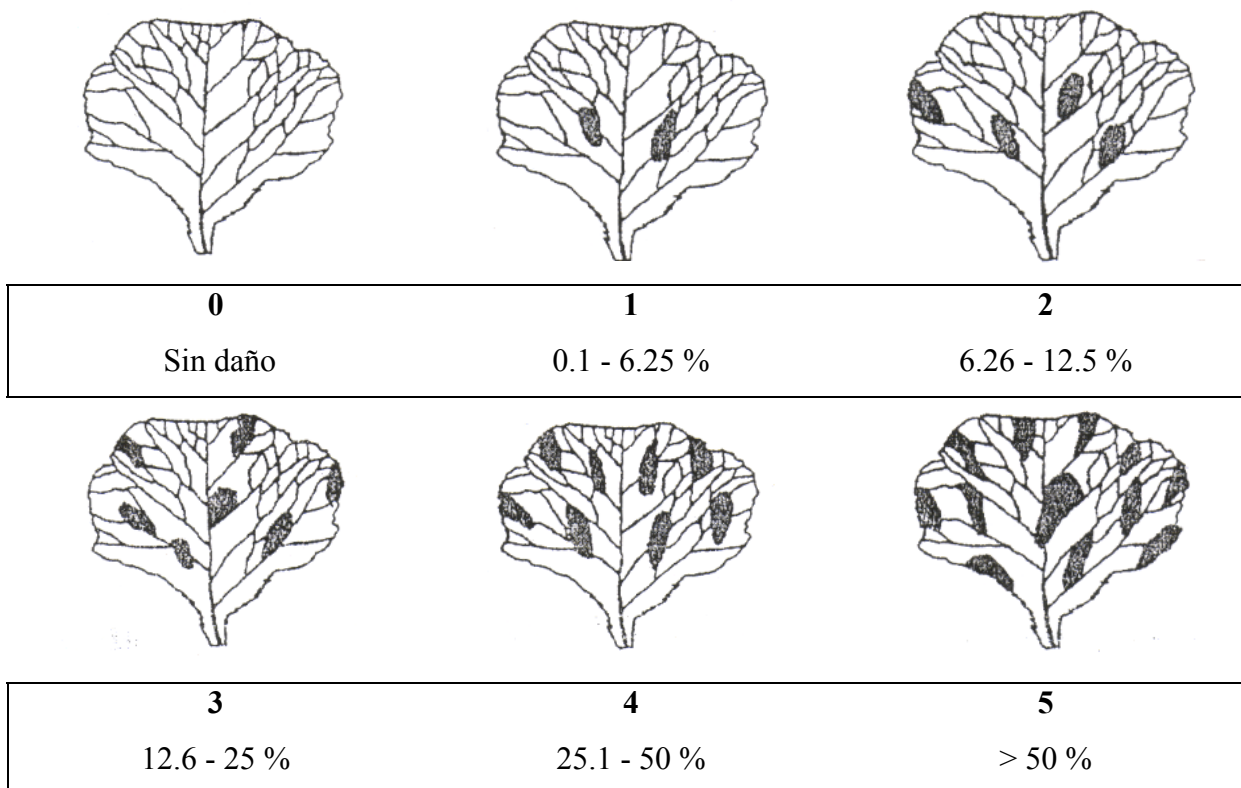


Figura 3. Escala modificada de De Dios (2003) para determinar la severidad del mildiu (*Bremia lactucae*) en lechuga.

#### 4.5. Obtención del micelio de *Bremia lactucae*.

Una vez determinada la incidencia y severidad del mildiu en campo, las hojas fueron separadas de la planta y colocadas en bolsas de papel. Posteriormente, fueron transportadas en una hielera al laboratorio de Microbiología, donde se incubaron a 4° C durante 4 días, para favorecer la esporulación.

Cuando el hongo esporuló totalmente, se recortaron aproximadamente 10 lesiones o pústulas de cada muestra, las cuales se colocaron en cámaras deshidratadoras mismas que constaron de tres componentes: una base de 1.5 cm de cloruro de calcio anhidro (Meyer)<sup>®</sup>, silica gel granulada como secante en la parte intermedia (20 y 25 gránulos) y algodón en la parte superior, sobre el cual se colocó el tejido. Las muestras se mantuvieron en dichas cámaras hasta la obtención del micelio, el cual

se separo del tejido con un pincel y fue guardado en tubos Eppendorf hasta su posterior uso.

#### 4.6. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de *B. lactucae* se emplearon dos métodos. El primero de ellos fue el de MLO (Lee *et al.*, 1991) modificado por Rojas-Martínez (1998) y la modificación al método de Ahrens y Seemüller (1992).

##### 4.6.1. Método de Organismo tipo Micoplasma (MLO) modificado por Rojas-Martínez (1998).

El método MLO modificado por Rojas-Martínez (1998) tuvo como propósito la obtención de micelio libre fenoles. Los reactivos empleados fueron los siguientes: 2.17 g de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.41 g de  $KH_2PO_4$ , 10 g de Sucrosa, 0.15 g de BSA (Albúmina, Bovine), 2.0 g de PVP (Polyvinilpyrrolidone) y 0.53 g de ácido ascórbico mezclados en 100 mL de agua destilada estéril. Al micelio de cada muestra se le adicionó 1 mL de la solución MLO, procediéndose a la agitación en el vortex durante 10 minutos antes de ser centrifugados durante 8 minutos a 14 000 rpm para finalmente ser decantados, el producto de la lisis de cada muestra fue utilizada para la extracción de ADN.

##### 4.6.2. Modificación del método Ahrens y Seemüller (1992)

Una vez eliminados los fenoles, se procedió a realizar la extracción de ADN utilizando el método de Ahrens y Seemüller (1992) modificado que constó de los siguientes pasos:

La pastilla obtenida de cada muestra (paso 4.6.1.) se le agregaron 800  $\mu$ L de solución a 60 °C de CTAB 2 % (bromuro de alquiltrimetilo de amonio mixto) preparado con los reactivos en el siguiente orden (100mM de Tris-HCl pH 8.0; 20 mM



de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, pH. 8.0; 1.4 M de NaCl; CTAB 2 %; 0.2 % de β-Mercaptoetanol), se agitaron vigorosamente para promover el contacto con la solución, posteriormente se incubaron a 65 °C durante 1 hora 20 minutos mezclándose ocasionalmente, transcurrido el tiempo mencionado se les adicionaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclándose perfectamente para después ser centrifugadas a 14 000 rpm por 8 minutos, transcurrido este paso se separaron las fases, quedando la fase acuosa en la parte superior misma que fue colocada en un tubo nuevo y a la que se le adicionaron 600 µL de isopropanol frío para precipitar ADN. Los tubos se incubaron a -20 °C toda la noche. Posteriormente el ADN se concentro por centrifugación a 14 000 rpm por 8 minutos eliminando el sobrenadante, el pelet obtenido se lavó dos veces con 300 µL etanol al 70 % a 12 000 rpm por 5 minutos, el pelet se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril y se guardo a -20 °C.

#### 4.6.3. Calidad del ADN

Para verificar la extracción exitosa de ADN, se realizó la prueba de calidad de ADN propuesta por Ferreira y Grattaplagia (1998). Para ello se mezclaron 5 µL de la solución de ADN (obtenida en el paso 9 de la sección 4.6.2) más 2 µL de buffer de carga (Naranja G 0.25%, Glicerol 30%), misma que fue colocada en un gel de agarosa (Ultrapura Invitrogen<sup>®</sup>) al 1%; se incluyó también un pozo de 1 µL de marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen<sup>®</sup>). De cada muestra se corrieron de manera sincronizada, tres repeticiones en una cámara de electroforesis (Life Technologies<sup>®</sup>) en amortiguador TBE (Tris ultrapuro 0.1M, Ácido bórico anhidro 0.1 M, Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 2 mM) a 85 Volts durante 35 minutos. Transcurrido ese tiempo, el gel se tiñió en bromuro de etidio durante 35 minutos. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta Modelo Gel Doc 2000, BIO RAD<sup>®</sup> y analizados con el programa Quantity One 4.0.3. La repetición con mejor definición de banda fue utilizada posteriormente en la reacción de PCR.

#### 4.6.4. Cuantificación del ADN

Para conocer las cantidades de ADN obtenidas a partir de la solución (paso 4.6.2) se preparó una dilución de 1:100 (5  $\mu\text{L}$  del ADN de cada muestra más 500  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril), la mezcla se colocó en una celda de cuarzo del espectrofotómetro (Perkin Elmer<sup>®</sup> Mod. Lambda Bio-10) se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Los datos se convirtieron de  $\mu\text{g/mL}$  a  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  posteriormente se diluyeron con agua desionizada estéril para obtener una concentración de 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

#### 4.7. Caracterización genética por (RAPD) Polimorfismo en el ADN amplificado al azar

Para lograr la amplificación del ADN de *B. lactucae*, los componentes fueron conjugados en la mezcla de reacción misma que fue aforada a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  constituido por 15.8  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 1 X, 1.25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP 0.2 mM, 2.0  $\mu\text{L}$  de iniciador 20 pmol, 0.2  $\mu\text{L}$  de enzima DNA polimerasa 1 U (Biotecnologías Universitarias<sup>®</sup>) y 4.0  $\mu\text{L}$  de ADN a una concentración de 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Se centrifugó por 5 seg a 14 000 rpm, posteriormente la reacción se selló con dos gotas de aceite mineral estéril para evitar la evaporación de la mezcla de reacción. Para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usó el termociclador (Modelo 2400 Perkin Elmer<sup>®</sup>), el programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de amplificación de 95° C por 2 minutos; 30 ciclos de 95° C por 1 minuto para separar 35° C por 30 segundos y un ciclo de extensión final de 72° C por 10 minutos.

Los iniciadores empleados para la amplificación fueron los de la serie A de Operon Technologies: A-01, A-02, A-03, A-04, A-05, A-06, A-15, A-16, A-17.

#### 4.8. Caracterización genética por (ISSR) Inter-Secuencias Simples Repetidas o Microsatélites.

En el caso de los Microsatélites, los componentes fueron conjugados en la mezcla de reacción misma que fue aforada a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  constituido por 14.05  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 1 X, 1.25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP 0.2 mM, 2.0  $\mu\text{L}$  de iniciador 20 pmol, 0.2  $\mu\text{L}$  de enzima DNA polimerasa 1 U (Biotecnologías Universitarias<sup>®</sup>) y 3.0  $\mu\text{L}$  de ADN a una concentración de 20 ng/ $\mu\text{L}$ . Se centrifugó por 5 seg a 14 000 rpm, posteriormente la reacción se selló con dos gotas de aceite mineral estéril para evitar la evaporación de la mezcla de reacción. Para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usó el termociclador (Modelo 2400 Perkin Elmer<sup>®</sup>), el programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de amplificación de 94° C por 1 minuto; 40 ciclos de 94° C para separar, 40° C por 1 minuto de alineación, y 72° C por 1 minuto de extensión; y un ciclo de extensión final de 72° C por 8 minutos.

Los iniciadores empleados para la amplificación de ADN de las 15 muestras de *Bremia lactucae* fueron: DBB-[CGA]<sub>5</sub>, BDD-[CCA]<sub>5</sub>, BDD-[CAC]<sub>5</sub>, BVD-[CAG]<sub>5</sub>, GGAT<sub>4</sub>, GATA<sub>4</sub>, BDB-[CAC]<sub>5</sub>, BDV-[CAG]<sub>5</sub>, HVH-[TGT]<sub>5</sub>, CAG<sub>5</sub>, seleccionados en función de los resultados obtenidos por el Dr. Stefan Wagner en 2005 (Comunicación personal).

#### 4.9. Separación y visualización de productos de amplificación

Tanto para el caso de ISSR, como para RAPD, una vez terminado el proceso de amplificación de las muestras de ADN, se retiraron del termociclador y fueron colocadas en hielo. La separación de los fragmentos obtenidos (bandas) por PCR, se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa ultrapura (Invitrogen<sup>®</sup>) al 3.5% a 85 Volts durante 1 hora. Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 40 minutos, después fue enjuagado en agua destilada estéril y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (Modelo Gel Doc 2000, Bio Rad<sup>®</sup>) y analizados con el programa Quantity One 4.0.3. La documentación de los productos

amplificados se realizó con un analizador de imágenes. Las bandas observadas para cada iniciador ISSR se codificaron mediante el código binario, asignando el valor de 1 a la presencia de una banda y 0 a su ausencia, formando así una matriz de ceros y unos, que fue empleada en el análisis correspondientes.

#### 4.10. Análisis de datos

El análisis de incidencia y severidad de *Bremia lactucae* se realizó mediante el paquete computacional SAS y el análisis de los datos moleculares, se realizó a partir de una Matriz Binaria (MB)= presencia 1 y ausencia 0, obtenida de los datos de ISSR, analizada mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico (NTSYS-pc) versión 2.10p. La distancia genética se estimó al transformar la MB en matriz de similitud, mediante el Coeficiente de Apareamiento Simple. El dendograma se obtuvo por el Método del promedio aritmético entre agrupamientos, tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Averages) (Sneath y Sokal, 1973). La confiabilidad del dendograma, se probó mediante el Bootstrap con 2000 réplicas, usando el programa WINBOOT (Yap, 1991).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Incidencia y severidad de *Bremia lactucae* en lechuga.

En Salamanca y San Miguel de Allende, las variedades muestreadas presentaron un 100 % de incidencia, presentándose mayormente en las hojas basales y menor en las internas, siendo favorecida por humedad relativa superior al 80 %, temperaturas óptimas de 10 a 15 °C; y humedad en las hojas de 2 a 4 horas tal como lo mencionan Wu *et al* (2001 a). Los riegos intensos, el tamaño de las hojas y la densidad de follaje, pudieron contribuir a la generación del microclima ideal para el desarrollo del patógeno en campo, sobre todo en las lechugas de tipo Iceberg (Hans-Jürgen y Hoyningen-Huene, 1986).

En cuanto a la severidad de *B. lactucae* en las diferentes variedades cultivadas en Salamanca fueron estadísticamente significativas con  $\alpha=0.05$ . Dicha severidad fluctuó de 8.75 % a 22.5 %, siendo las variedades Montecristo, FallGreen y Summertime las más susceptibles y Napoleón la más resistente (Cuadro 2). En lo que respecta a San Miguel de Allende, las variedades cultivadas, estadísticamente fueron altamente significativas con  $\alpha\leq 0.0001$ . La severidad fluctuó de 7.5 % a 16.25 % siendo las variedades Rayder, Siskiyou y Rayder las más susceptibles y Sundavil la más resistente (Cuadro 3).

La variación de la severidad del mildiu pudo deberse al manejo proporcionado y al genotipo, ya que según la información proporcionada por la casa comercializadora de semillas, todas las variedades de lechuga muestreadas se consideran susceptibles al mildiu, excepto la variedad Alfa la cual se caracteriza por ofrecer resistencia a las razas 1 a la 5, y probablemente por ello esta variedad fue una de las más resistentes.

Cuadro 2. Severidad del mildiu en las variedades cultivadas en el municipio de Salamanca, Guanajuato.

Variedad	Severidad	
	Nivel	%
FallGreen	2.81 a	22.50 a
Montecristo	2.68 a	20.00 a
Summertime	2.31b	16.25 b
King Henry	1.53 c	9.37 c
Napoleón	1.42 c	8.75 c
Magnum	2.10 b	13.75 b

Prueba de medias Tukey con  $\alpha=0.05$

Cuadro 3. Severidad del mildiu en las variedades cultivadas en el municipio de San Miguel de Allende, Guanajuato.

Variedades	Severidad	
	Nivel	%
Sundavil	2.21 ab	15.00 ab
Siskiyou	2.30 a	16.25 a
Rayder	2.33 a	16.25 a
Rayder	2.32 a	16.25 a
Verte Mar	2.23 ab	15.00 ab
Magnum	2.04 bc	12.50 bc
Alfa	1.81 c	11.50 c
Sundavil	1.24 d	7.50 d
Summertime	1.29 d	7.50 d

Prueba de medias Tukey con  $\alpha\leq 0.0001$

## 5.2. Efecto de factores ambientales sobre la severidad de *Bremia lactucae*.

Subbarao *et al* (1997), Hans-Jürgen y Hoyningen-Huene (1986), mencionan que algunos de los factores importantes en la incidencia y severidad del patógeno son las condiciones ambientales y el manejo, debido a ello se hizo un análisis de la temperatura, humedad relativa, humedad en la hoja y precipitación de ambos municipios.

La severidad de *Bremia lactucae* en el ciclo otoño-invierno (agosto a diciembre del 2005) en los municipios de Salamanca y San Miguel de Allende presentó variaciones a través del tiempo, encontrándose una mayor expresión de síntomas en el mes de agosto y menor en diciembre. En este período, se analizaron de forma mensual, la temperatura, humedad relativa, humedad en la hoja y precipitación en ambas localidades para tratar de evaluar su efecto sobre el patógeno. Se encontró que la temperatura media mensual fluctuó de 6 a 16 °C, la humedad relativa de 54 a 72 % y la humedad en hoja de 0.51 a 13 % en el caso de Salamanca, mientras que en San Miguel de Allende, la temperatura varió de 5 a 16 °C, la humedad relativa de 53 a 78 % y la humedad en la hoja de 2.3 a 4.7 % (Figura 4). De acuerdo con Wu *et al* (2001a), las condiciones de humedad relativa y de hoja no fueron las idóneas para la expresión de *Bremia lactucae*. Scherm y van Bruggen (1994) reportan que las condiciones ideales son: temperaturas de 14 °C a 24 °C, humedad relativa superior al 80 % y humedad en la hoja del 100 % con una duración de 2 a 4 horas, estas condiciones son idóneas para que se lleve a cabo el proceso de infección de *Bremia lactucae*, el cual se presume ocurre en la siguiente secuencia: En la mañana se da la infección, seguida de la dispersión de esporas entre las 10:00 y 12:00 p.m., mientras que la supervivencia de los esporangios se da en la tarde, para terminar con la esporulación la cual se presenta en la noche (Scherm y van Bruggen 1994 y Wu *et al*, 2001a).

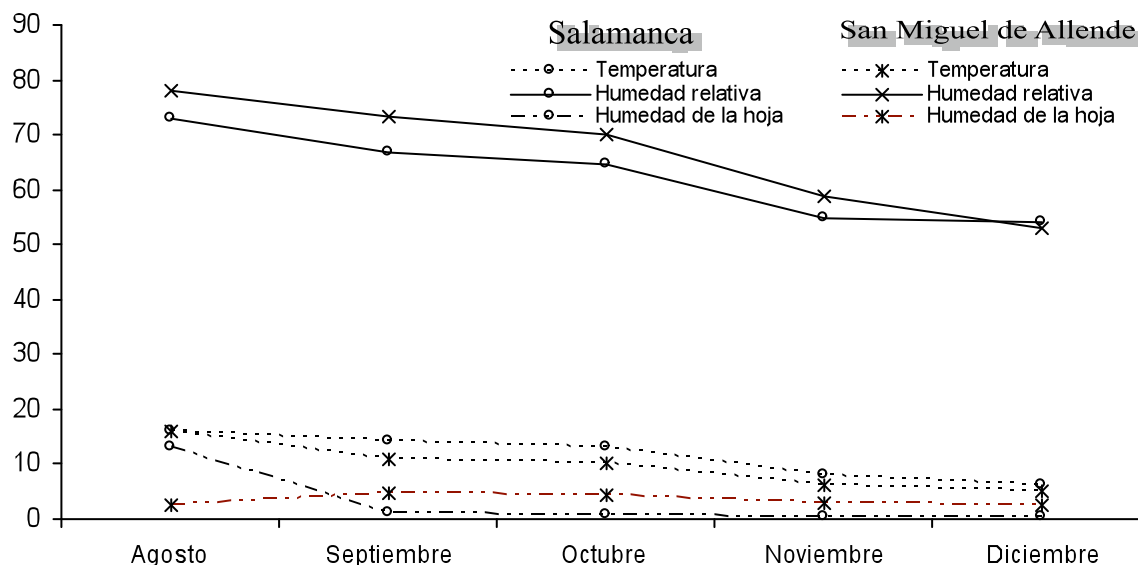


Figura 4. Comportamiento mensual de las variables temperatura, humedad relativa, humedad en la hoja y precipitación en los municipios Salamanca y San Miguel de Allende.

Tratando de entender el porque de la expresión del patógeno se optó por analizar el comportamiento de las variables a lo largo del día. En la Figura 5 se analizó un día típico en el Municipio de Salamanca correspondiente al 21 de agosto del 2005; las condiciones ideales para la expresión y proliferación de *B. lactucae* tales como humedad relativa superior al 80 %, humedad en la hoja del 100 % y temperaturas menores de 16 °C se presentaron durante un periodo de ocho horas, comprendido entre las 12 de la noche y ocho de la mañana. En tanto, en San Miguel de Allende (Figura 6), el día analizado correspondió al 20 de octubre del 2005, donde las condiciones ideales para la expresión del mildiu se presentaron durante 15 horas: de 12 de la noche a las 10 de la mañana (humedad relativa superior al 80 %, humedad en la hoja del 100 % y temperaturas de 14 y 17 °C). Esta prolongación de condiciones ideales, aparentemente, fue influida por la presencia de precipitación de 0.400 y 0.150 mm ocurrida de 4 a 5 de la mañana.



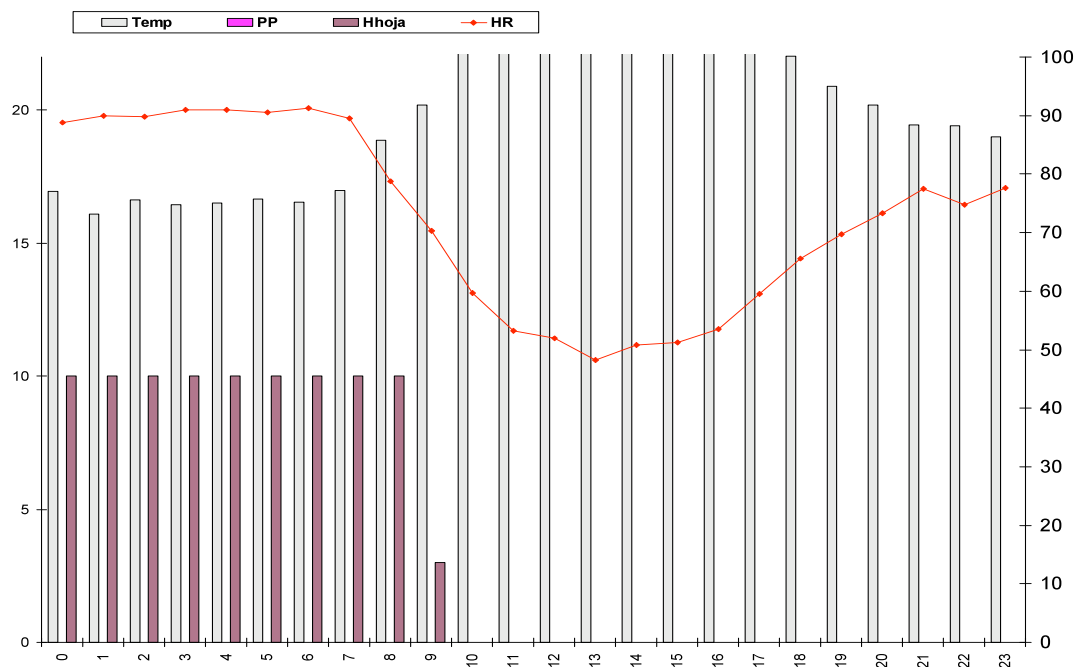


Figura 5. Condiciones ambientales del 21 de agosto en Salamanca (Temp.: temperatura, PP: precipitación, HH: humedad en la hoja, HR: humedad relativa).

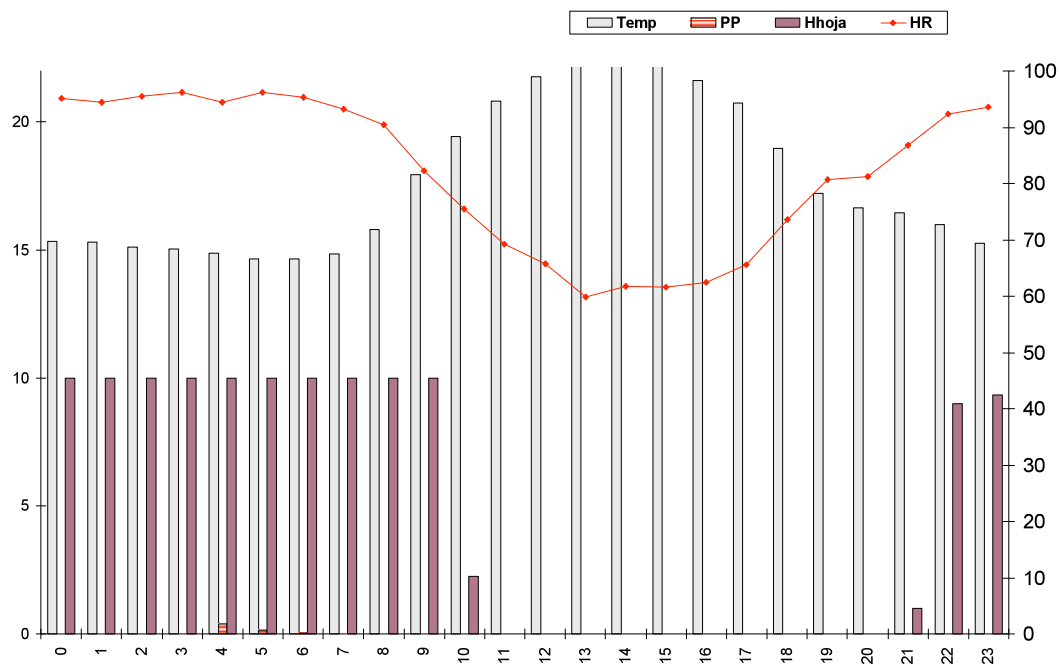


Figura 6. Condiciones ambientales del 20 de octubre en San Miguel de Allende (Temp.: temperatura, PP: precipitación, HH: humedad en la hoja, HR: humedad relativa).

El análisis diario de las condiciones microclimáticas se realizó a intervalos de cuatro horas, de la siguiente manera: 0 hr a 4:00 a.m., 4:15 a 8:00 a.m., 8:15 a 12:00 p.m., 12:15 a 16:00 p.m., 16:15 a 20:00 p.m. y 20:15 a 23:45 p.m. Esto permitió detectar el patrón que tuvieron las variables climáticas a nivel de parcela, las cuales favorecen el crecimiento del hongo. El mismo análisis fue realizado por semana durante los meses del muestreo en ambos municipios. Sin embargo, debido a que los campos de cultivo ya estaban establecidos cuando se realizaron los muestreos, no hubo manera de sincronizar la colecta en ambas localidades, por lo que no se obtuvo la misma cantidad de material. Es por ello que se realizó el análisis y muestreo en el orden que a continuación se menciona: en Salamanca, durante los meses de agosto y noviembre del 2005, y en San Miguel de Allende, de septiembre a diciembre del mismo año.

En el municipio de Salamanca, durante el mes de agosto del 2005, las condiciones ideales para la expresión de *Bremia lactucae* tuvieron el siguiente comportamiento: la humedad relativa superior al 97 % se encontró de 4:15 a 8:00 a.m. y de 77 a 85% durante las 20:15 a 23:45 p.m.

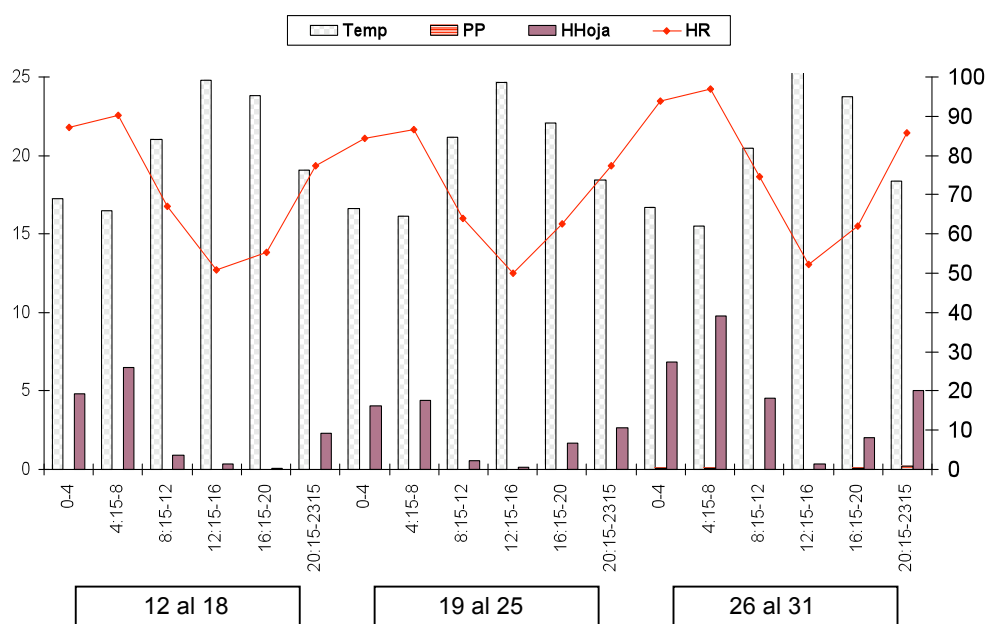


Figura 7. Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H Hoja: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de agosto del 2005 en Salamanca, Guanajuato.

La humedad en la hoja, en el mismo municipio (Salamanca), alcanzó valores de 44.2 % a 97.9 % entre las 12 de la noche a 8:00 a.m. y de 23 % a 50 % de 20:15 a 23:45 p.m. La temperatura más favorable para el hongo fue de 15.4 a 16.4 °C y 18.4 a 19 °C que se registró entre las 4:15 a 8:00 a.m. y 20:15 a 23:45 p.m., como se observa en la Figura 7.

En el municipio de San Miguel de Allende, durante el mes de septiembre del 2005, las condiciones ideales para la expresión de *Bremia lactucae* tuvieron el siguiente comportamiento: la humedad relativa superior al 95 % se encontró de 12 de la noche a 8:00 a.m., mientras que de 20:15 a 23:45 p.m. esta fue superior al 80 %. Para la humedad en hoja, se registraron valores del 50 al 100 % de las 0 hr. a las 12:00 p.m., y de 21 al 83 % en el periodo de 20:15 a 23:45 p.m. La temperatura ideal de 9.2 a 13.9 °C y 14 a 15 °C, se registró de 4:15 a 8:00 a.m. y 20:15 a 23:45 (Figura 8).

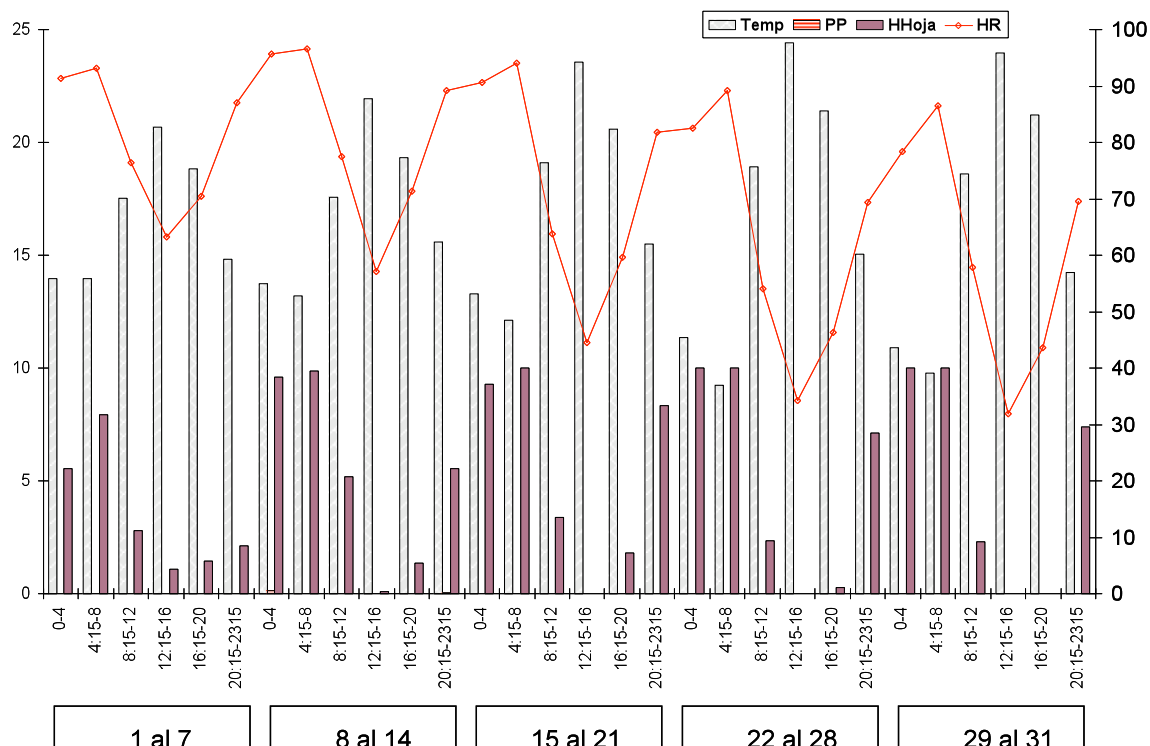


Figura 8. Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H Hoja: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de septiembre del 2005 en San Miguel de Allende, Guanajuato.

En el municipio de San Miguel de Allende durante el mes de octubre, las condiciones ideales para la expresión de *Bremia lactucae* tuvieron el siguiente comportamiento: la humedad relativa superior al 92 % se encontró de 12 de la noche a ocho de la mañana, mientras que de 20:15 a 23:45 p.m. esta fue superior al 84 %. La humedad en la hoja registró valores del 25 % al 100 % de las 12 de la noche a 12 del día y de 43 % a 88 % en el periodo de 20:15 a 23:45 p.m. Las temperaturas fluctuaron de 7,9 a 13,5 °C de 12 de la noche a ocho de la mañana, siendo la óptima (11,97 a 15,5 °C) de 20:15 a 23:45 p.m. (Figura 9).

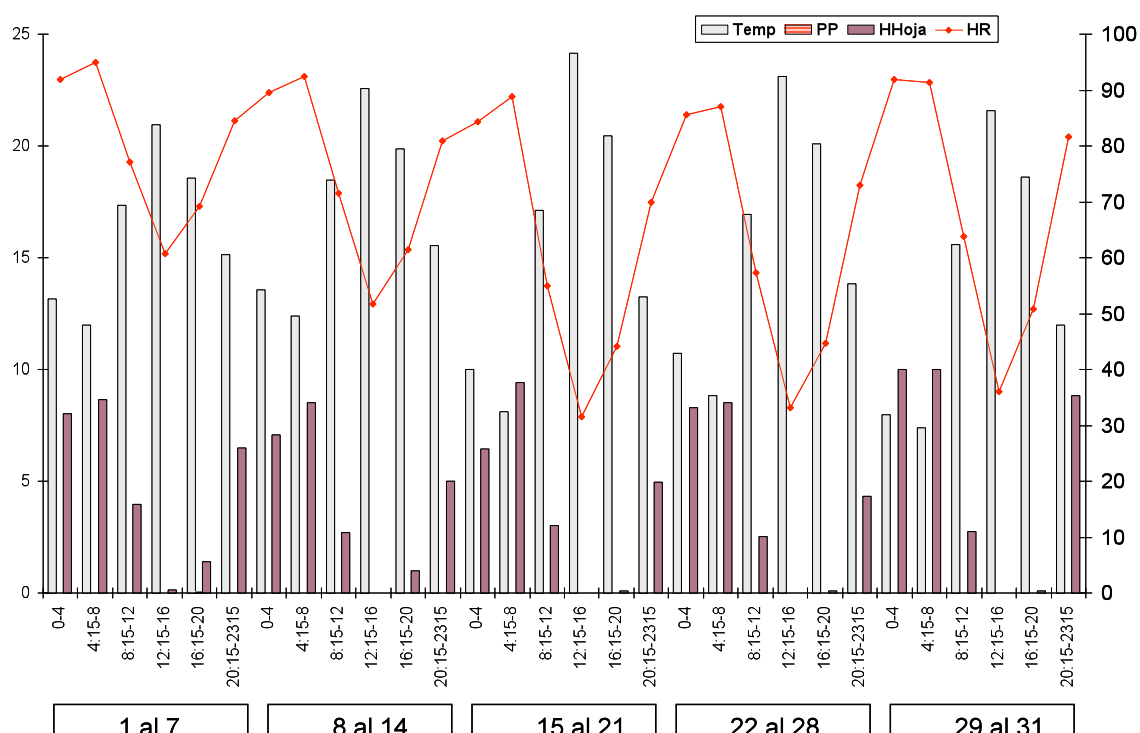


Figura 9. Condiciones ambientales (Temp.: Temperatura, PP: Precipitación, H Hoja: Humedad en la hoja, HR: Humedad relativa) promedio por semana del mes de octubre del 2005 en San Miguel de Allende, Guanajuato.



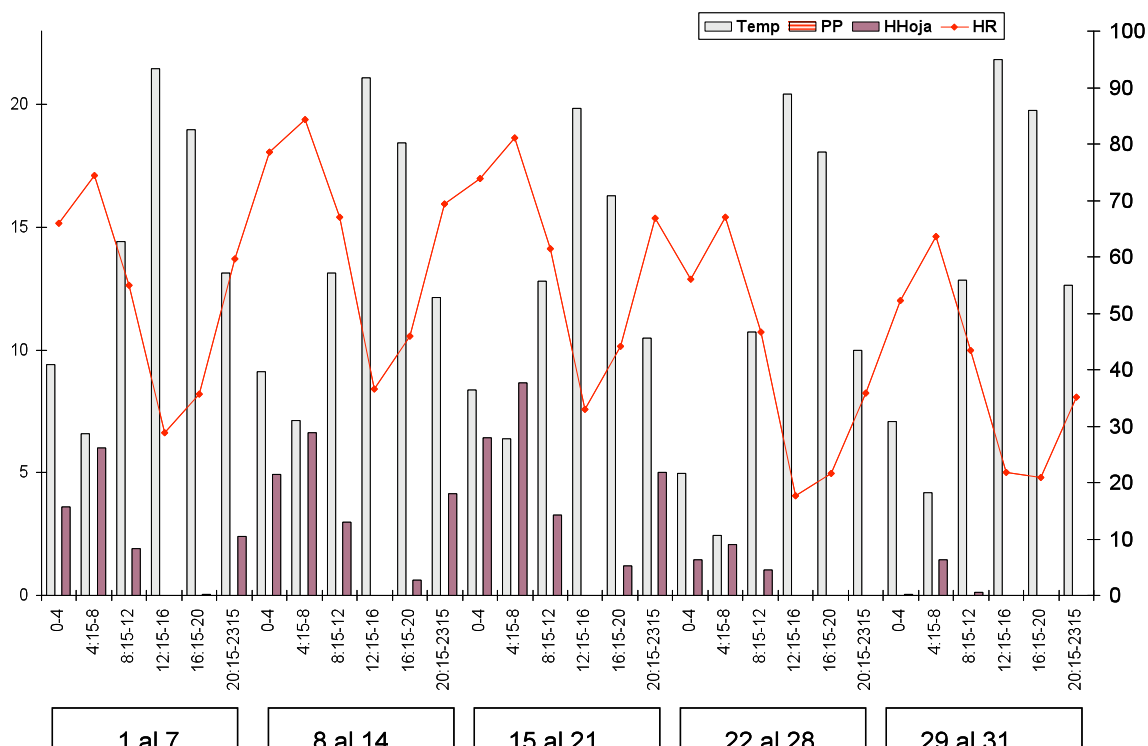


Figura 11. Condiciones ambientales promedio por semana del mes de diciembre del 2005 en San Miguel de Allende, Guanajuato.

Las temperaturas mínimas, humedad relativa y humedad en la hoja más altas se registraron en el horario de 4:15-8:00 a.m., en todos los meses, las cuales se consideran óptimas para la infección del mildiu, según Wu *et al* (2005). Estas variables fueron las óptimas para el desarrollo de *Bremia lactucae*, en los dos municipios tal como lo mencionan (Wu *et al.*, 2001a; Su *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005). De manera general, durante el periodo de muestreo (agosto a diciembre del 2005) en el período de 12:15 a 16.00 p.m., en ambos municipios tanto la temperatura como humedad relativa y humedad en la hoja no fueron las óptimas para el patógeno.

En el transcurso de ciclo de muestreo se detectó que el comportamiento de las condiciones ambientales para los últimos meses noviembre y diciembre, no fueron tan favorables para el patógeno, situación que coincidió con la severidad detectada en campo, lo cual concuerda con lo sostenido por Crute (1987), quien menciona que el mildiu es la enfermedad más importante de la lechuga y un problema particularmente fuerte en los meses de agosto a noviembre. Wu *et al* (2001a), al

respecto señala que las lechugas son más susceptibles durante las estaciones con temperaturas de frescas a frías.

Al correlacionar las variables ambientales de temperatura, humedad relativa y humedad en el municipio de Salamanca (Anexo 8.1), los resultados estadísticos muestran que tanto la temperatura ( $r = 0.9847$  con  $\alpha = 0.0023$ ) como la humedad relativa ( $r = 0.9735$  con  $\alpha = 0.0051$ ), tuvieron una correlación significativa sobre la severidad del patógeno, debido a que estas condiciones microclimáticas favorecieron la presencia de este en el campo de cultivo. La falta de precipitación permitió deducir que probablemente los riegos fueron los precursores de prolongar la humedad relativa y la humedad en la hoja, influyendo negativamente en la sanidad de la planta, tal como lo señala Scherm y van Bruggen (1994). Al respecto, Subbarao *et al* (1997) reportaron que con el riego por goteo tanto la humedad relativa como la humedad en la hoja son menores en comparación con el riego por gravedad.

En San Miguel de Allende (Anexo 8.2), se encontró una correlación positiva de la temperatura ( $r=0.9651$  con  $\alpha \leq 0.0078$ ) sobre la severidad de *B. lactucae* en las variedades de lechuga cultivadas en esta zona. En lo que respecta a la humedad en la hoja tanto en el municipio de Salamanca (Anexo 8.1) como en San Miguel de Allende (Anexo 8.2) esta no tuvo una correlación significativa sobre la severidad de *B. lactucae*, contrario a lo reportado por Wu *et al* (2005), quienes mencionan una correlación positiva entre la humedad de hoja con la severidad e incidencia del mildiu. Esto fue debido a que los sensores que registran la humedad de la hoja se encuentran fuera de la parcela y la humedad en si es generada dentro del cultivo.

### 5.3. Aislamiento del ADN

La primera etapa del análisis molecular consistió en la extracción del ADN de *Bremia lactucae*, en la cual, las modificaciones hechas por Rojas-Martínez (1998) resultaron ser los métodos más rápidos y eficientes.

La evaluación cualitativa se hizo en un gel de agarosa (Ultrapura Invitrogen®) al 1%, en la Figura 12, se observan los resultados de la extracción, evidenciando buena calidad del ADN así como en algunos casos la presencia de contaminantes.

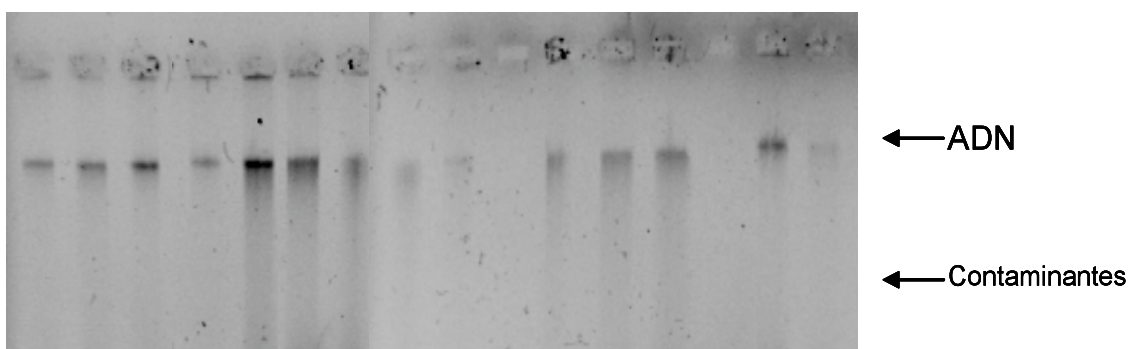


Figura 12. Presencia de ADN en gel de agarosa al 1 %.

### 5.4. Análisis de los marcadores moleculares RAPD en los aislados de *B. lactucae*

Ninguno de los iniciadores de RAPD utilizados logro amplificar los 15 aislados de *B. lactucae*. Esto debido a que las secuencias del iniciador no reconocieron ningún sitio blanco en el genoma de *Bremia lactucae* (Valádez y Kahl, 2000).

### 5.5. Análisis de los marcadores moleculares Microsatélites en los aislados de *B. lactucae*.

Al analizar los polimorfismos obtenidos por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se encontró que el número de bandas amplificadas con cada uno de los iniciadores en los aislados de *Bremia lactucae* varió de 1 a 20 bandas, de las cuales, la gran mayoría fueron polimórficas en los aislados analizados procedentes de Salamanca y San Miguel de Allende. En el cuadro 4 se presentan los resultados



completos. Se obtuvieron 96 bandas polimórficas (91.6 %). Los iniciadores que presentaron mayor número de bandas fueron: DBB-[CGA]<sub>5</sub> (19 bandas), BDD-[CAC]<sub>5</sub> (17 bandas), BVD-[CAG]<sub>5</sub> (20 bandas), BDD-[CCA]<sub>5</sub> (19 bandas), con un porcentaje de polimorfismo de 100 %, 94.1 %, 100 % y 100 % respectivamente. El nivel de polimorfismo aquí detectado puede dar una estimación de la alta variabilidad genética existente entre los aislados (Tapia *et al.*, 2005; Legaria *et al.*, 2005). En cuanto al nivel de polimorfismo, los ISSR resultaron más informativos, situación que concuerda con lo encontrado por Moreno *et al.* (1998), quienes mencionan que los ISSR superan a los RAPD en cuanto al nivel de polimorfismo; así mismo Pietrek y Zinkernagel (2002) al analizar especies de *Peronospora valerianellae*, encontraron que los RAPD son menos reproducibles que los ISSR. Por su parte Salimat *et al.* (1995) al trabajar con *Eleusine corocana*, mencionan que la técnica de ISSR detecta más regiones polimórficas, por lo tanto son los indicados para detectar variabilidad genética.

Cuadro 4. Número de bandas de ADN amplificadas y polimórficas obtenidas con los aislados de *B. lactucae*.

Iniciador	Número total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
DBB-[CGA] <sub>5</sub>	19	19	100
BDD-[CAC] <sub>5</sub>	17	16	94.1
BVD-[CAG] <sub>5</sub>	20	20	100
BDD-[CCA] <sub>5</sub>	19	19	100
GGAT <sub>4</sub>	No amplificó		
GATA <sub>4</sub>	No amplificó		
BDB-[CAC] <sub>5</sub>	7	5	71
BDV-[CAG] <sub>5</sub>	8	6	75
HVH-[TGT] <sub>5</sub>	4	1	25
CAG <sub>5</sub>	2	1	50
Total	96	88	91.6

Dónde: H = A, C, T; B = C, G, T; V = A, C, G; D = A, G, T.

Debido a que sólo fueron cuatro los iniciadores que presentaron mayor polimorfismo, en el siguiente análisis sólo se hace mención de ellos. Con el iniciador DBB-CGA<sub>5</sub> (5' DBB-CGA- CGA- CGA- CGA- CGA 3') el número de bandas amplificadas de ADN obtenido varió de 1 a 19 bandas de las cuales todas fueron polimórficas en Salamanca y de 2 a 15 en San Miguel de Allende con un peso molecular entre 12216 y 396 pb.

Los aislados B-M y B-FG procedentes de las variedades Montecristo y FallGreen compartieron ocho y 10 bandas respectivamente con un peso molecular entre 12216 y 396 pb. En el caso del aislado B-SM obtenido de la variedad Summertime amplificó solamente 1 banda de 396 pb, lo cual indica la gran variabilidad existente en la zona, a pesar de proceder de la misma localidad, estos aislados fueron colectados en el mes de agosto, lo cual podría indicar que se agruparon en base a las condiciones ambientales predominantes en la zona, lo cual concuerda con lo encontrado por McDonald *et al.* (1999) quienes detectaron alta diversidad genética en aislados de *Rynchosporium secalis* procedentes del mismo lugar.

En lo que respecta al aislado B-MG, fue el único que amplificó 13 bandas, mientras que los aislados B-KG y B-N presentaron 10, estos tres aislados se colectaron durante el mes de noviembre, en el cual la temperatura promedio mensual fue de 15 °C, humedad relativa de 54 % y humedad en la hoja de 0.2 % (Figura 13 a).

En el municipio de San Miguel de Allende, también hubo mucha diversidad genética, es decir, todos los aislados presentaron variación, desde 9 en el caso del aislado B-SD hasta 15 bandas en el aislamiento B-V, con un peso entre 12216 y 396 pb; cabe mencionar, que este último aislado se obtuvo del lote Nacimiento 4 y fue el único procedente de este lugar (Figura 13 b).

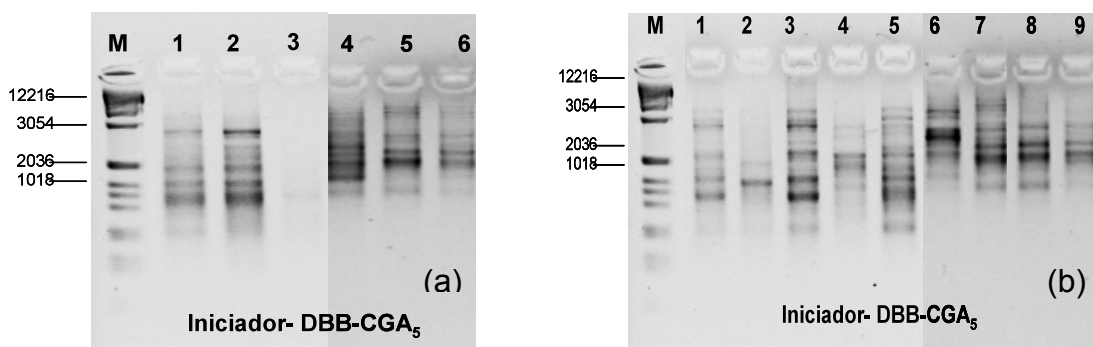


Figura 13 (a). Productos de amplificación con el iniciador DBB-CGA<sub>5</sub>, en seis aislados de *Bremia lactucae* procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.

Al emplear el iniciador BVD-CAG<sub>5</sub> (5' BVD- CAG- CAG- CAG- CAG- CAG 3') el número de bandas amplificadas fue de 4 a 12 en Salamanca (Figura 14 a) y para San Miguel de Allende de 8 a 16 (Figura 14 b).

A pesar de que los aislados B-M, B-FG y B-SM proceden de la misma localidad de Salamanca, los tres presentan un perfil de bandeo diferente, es decir, que entre ellos mismos hay variación genética, como se puede observar en la Figura 14 a, de igual que en los aislados B-MG, B-KG y B-N. En lo que respecta a los aislados procedentes de San Miguel de Allende, todos presentan variabilidad entre ellos mismos.

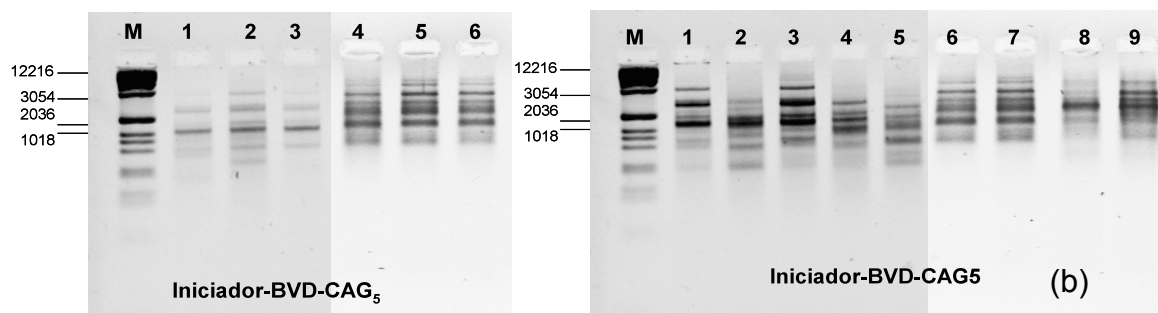


Figura 14 (a). Productos de amplificación con el iniciador BVD-CAG<sub>5</sub>, en seis aislados de *Bremia lactucae* procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.

En la Figura 15 a y b, se aprecian las bandas obtenidas con el iniciador BDD-CAC<sub>5</sub> (5' BDD- CAC- CAC- CAC- CAC- CAC 3') las cuales variaron de 7 a 17 para los aislados de Salamanca y de 8 a 17 para San Miguel de Allende, predominando una banda de 2036 pb en los aislados B-SD, B-R, B-SK y B-V.

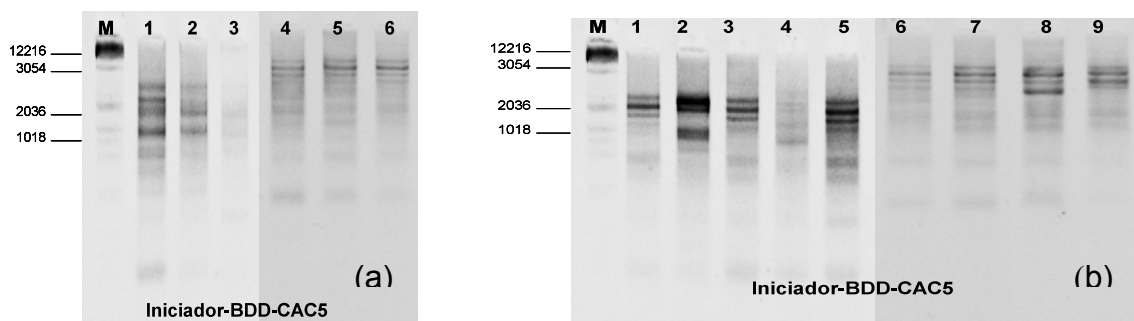


Figura 15 (a). Productos de amplificación con el iniciador BDD-CAG<sub>5</sub>, en seis aislados de *Bremia lactucae* procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.

Con el iniciador BDD-CCA<sub>5</sub> (5' BDD- CCA- CCA- CCA- CCA- CCA 3'), el número de bandas amplificadas de ADN en los aislados de *Bremia lactucae* procedentes de Salamanca fue de 3 a 19 (Figura 16 a) y en San Miguel de Allende de 0 a 19 (Figura 16 b).

En los aislados de Salamanca se pudo observar una banda de 3054 pb, la cual estuvo presente en el aislado B-FG, mientras que en el aislado B-SM se observó una banda de 2036 pb., estos aislados fueron colectados en el mes de agosto, por lo que tal vez las condiciones ambientales predominantes, temperatura de 20 °C, humedad relativa de 71 %, humedad en la hoja del 2 %, influyeron para que se observe esa diversidad. En lo que respecta a los aislados B-MG, B-KG y B-N a pesar de proceder del mismo lote y mes de colecta noviembre presentaron un perfil de bandeo diferente (Figura 16 a).

Sólo los aislados B-SD, B-R y B-SK procedentes del lote Santa Martha en San Miguel de Allende compartieron una banda de 1018 pb, la cual estuvo ausente en todos los demás. El aislado B-V obtenido de la variedad VerteMar no presentó ninguna banda, lo cual es indicativo de la gran variación en esta localidad, esto coincide con Sicard *et al.* (2003), quienes reportaron la existencia de variabilidad en 38 aislados de *B. lactucae* procedentes de California, aun cuando procedían de la misma localidad.

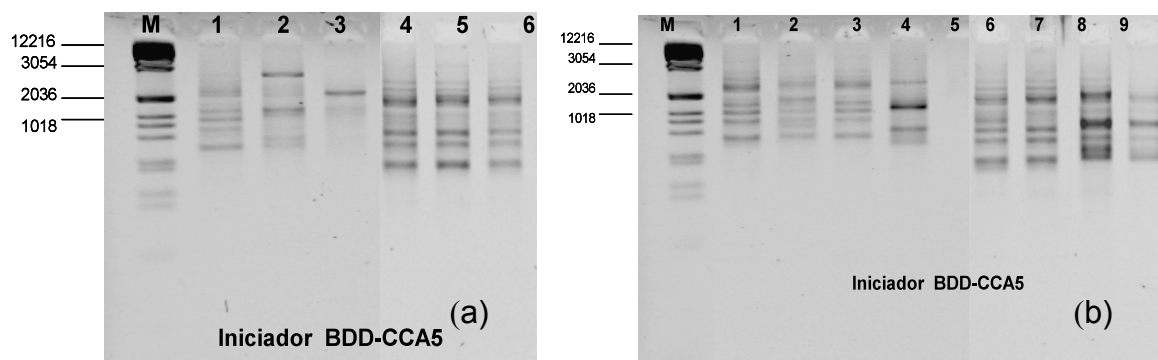


Figura 16 (a). Productos de amplificación con el iniciador BDD-CCA<sub>5</sub>, en seis aislados de *Bremia lactucae* procedentes de Salamanca. M=Marcador 1kb, 1:B-M:Montecristo, 2:B-FG:FallGreen, 3:B-SM:Summertime, 4:B-MG:Magnum, 5:B-KG:King-Henry, 6:B-N:Napoleón (b) Nueve aislados procedentes de San Miguel de Allende, M=Marcador 1kb, 1:B-SD:Sundavil, 2:B-R:Rayder, 3:B-SK:Siskiyou, 4:B-RR:Rayder, 5:B-V:VerteMar, 6:B-A:Alfa, 7:B-MG:Magnum, 8:B-S:Sundavil, 9:B-SM:Summertime.

La extensa variabilidad genética de *Bremia lactucae* en la zona de interés podría dar margen a la identificación de razas o grupos presentes apoyándose tanto con las plantas diferenciales que actualmente se tienen en el Área de Microbiología, ubicada en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco y lograr la caracterización de razas o grupos y una vez caracterizados, someter los aislados al análisis molecular empleando los iniciadores que en esta investigación resultaron más prometedores.

### 5.5. 1. Análisis de agrupamiento molecular de los aislados de Salamanca

Una vez analizada la matriz de ceros y unos generada a partir de los datos moleculares de las bandas de ISSR (Anexo 8.3.1) se obtuvo una matriz de distancias genéticas (Anexo 8.3.2), con valores entre 0.40 y 1.00.

Los aislados de Salamanca B-FG y B-M presentaron mayor similitud genética con una distancia de 0.78, colectadas en el mes de agosto. Estas distancias concuerdan con lo encontrado por Tenzer *et al.* (1999) en *Venturia inaequalis*, quienes mencionan que valores cercanos a 1 significan que son poblaciones muy emparentadas genéticamente, mientras que los cercanos a 0, se refiere a poblaciones poco emparentadas.

Los aislados B-KG Y B-SM tuvieron menor similitud genética con una distancia de 0.40, las cuales, aunque procedieron del mismo municipio (Salamanca), se colectaron en diferente época: B-KG en noviembre y B-SM en agosto, esta similitud baja posiblemente fue debida a que los aislados fueron colectados en diferente época en la cual las condiciones ambientales también eran distintas, tal como lo señala McDonald *et al.* (1999).

En la Figura 17 se muestra el dendograma del análisis realizado para el municipio de Salamanca, este análisis integró las poblaciones del patógeno en tres grupos. El grupo I correspondió al de mayor severidad, el cual al parecer fue influenciado por los factores ambientales imperantes en el mes de agosto (temperatura de 16 °C, HR de 91 % y HH de 6.91 %) y conformado por los aislados B-M, B-FG, B-SM; las dos primeras variedades Montecristo y FallGreen presentaron similitud en sus valores de severidad. El grupo II fue conformado por el aislado B-MG, de la variedad Magnum la cual mostró un grado de severidad menor al encontrado en el grupo I. Este grupo fue determinado por las condiciones ambientales imperantes en el mes de muestreo (temperatura de 7.9 °C, HR de 80 % y HH de 0.91 %). En tanto el grupo III, conformado por los aislados B-KG y B-N, de las variedades King-Henry y Napoleón,

presentaron la mayor resistencia al ataque del mildiu y, al igual que los demás grupos, este tendió a agruparse por las condiciones ambientales imperantes durante la colecta (temperatura de 7.9 °C, HR de 80 % y HH de 0.91 %).

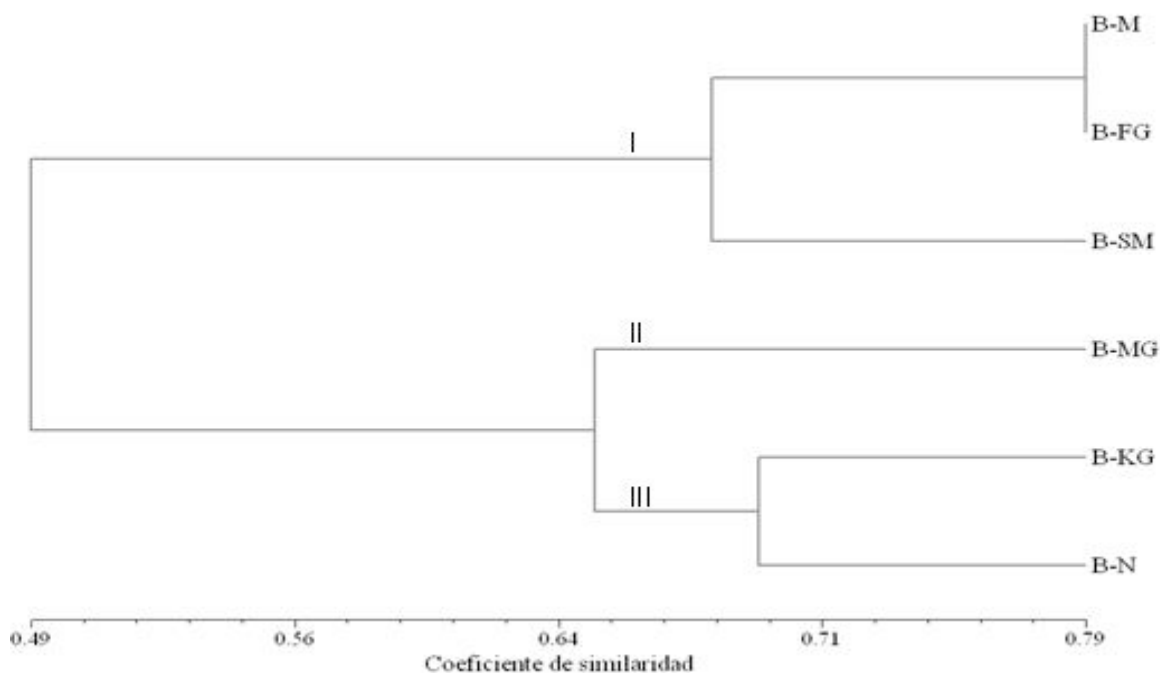


Figura 17. Agrupamiento de los aislados de *Bremia lactucae* provenientes de las variedades de lechuga cultivadas en Salamanca, Guanajuato y obtenidos del análisis de las Inter-Secuencias Simples Repetidas.

#### 5.5.2. Análisis de agrupamiento molecular de los aislados de San Miguel de Allende

Para la generación y análisis se siguió el mismo procedimiento descrito en el punto 5.5.1. Sólo que la matriz de ceros y unos generada a partir de los datos moleculares de las bandas de ISSR se observa en (8.4.1), con la cual se obtuvo una matriz de distancias genéticas (Anexo 8.4.2), con valores entre 0.46 y 1.

En lo que respecta al análisis realizado en San Miguel de Allende, los aislados con mayor similitud genética fueron B-A y B-MG con una distancia de 0.82. Esto



probablemente debido a que los dos aislados de *Bremia lactucae* fueron del lote Mina 3 colectadas en octubre.

Los aislados con menor similitud genética fueron B-V y B-R, con una distancia de 0.46. Estos valores son similares a los reportados por Gobbin *et al.* (2003) basados en los marcadores moleculares de SSR en *Plasmopara viticola*, cuyas distancias genéticas estuvieron en el rango de 0.24 a 0.89.

En San Miguel de Allende, las poblaciones de *Bremia lactucae* se integraron en cinco grupos (Figura 18), esto concuerda con lo reportado por Heilmann *et al.* (2006), quienes al trabajar con aislados de *Colletotrichum coccodes* encontraron que cuando hay la formación de varios grupos indica la existencia de alta variabilidad genética en la zona, situación que también fue encontrada en Salamanca. El grupo I correspondió al de mayor severidad y fue determinado por los factores ambientales predominantes en septiembre (temperaturas de 11 °C, HR de 92 % y HH de 9.6 %). En el se ubicaron los aislados B-SD y B-SK, provenientes de las variedades Sundavil y Siskiyou. El grupo II conformado por los aislados B-A y B-MG, provenientes de las variedades Alfa y Magnum respectivamente y ubicados en el lote Mina 3, en el mes de octubre con temperaturas de 10 °C, HR de 91 % y HH de 8.9 %. El comportamiento del aislado B-A de la variedad Alfa era de esperarse ya que según la casa productora de semillas, esta variedad sólo posee resistencia a las razas 1 a la 5 de *B. lactucae*, por eso se dio esta separación. El grupo III conformado por aislados B-S y B-SM, de las variedades Sundavil y Summertime, consideradas como unas de las más resistentes al mildiu, se colectaron en octubre, cuando las condiciones ambientales no fueron tan óptimas para su desarrollo (temperaturas de 5.3 °C, HR de 74 % y HH de 4.7 %). El grupo IV estuvo conformado por los aislados B-R y B-RR, de las variedades Rayder, una procedente del lote Santa Martha y la otra de Mina 5; ambas variedades mostraron el mismo valor de severidad, a pesar de una fue colectada en septiembre y otra en octubre. El grupo V, estuvo integrado por el aislado B-V, de la variedad VerteMar, la cual manifestó el menor grado de severidad del patógeno; al parecer este comportamiento fue influenciado por los factores

ambientales predominantes del mes de octubre (temperaturas de 10 °C, HR de 91 % y HH de 8.9 %).

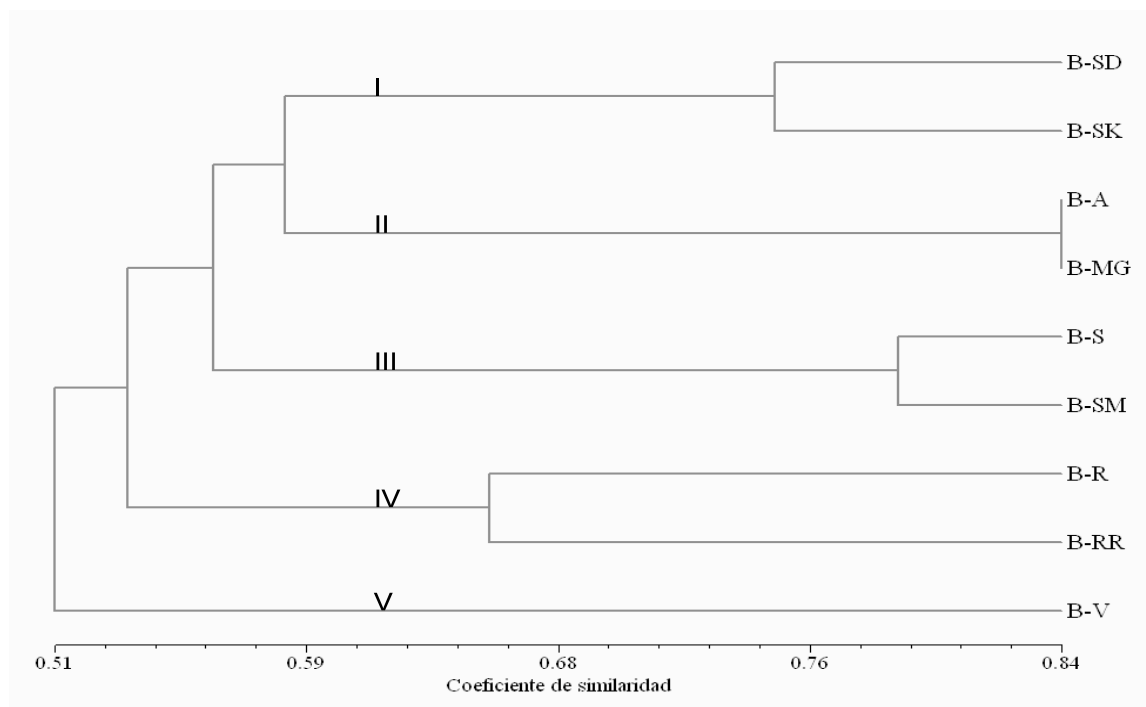


Figura 18. Agrupamiento de los aislados de *Bremia lactucae* provenientes de las variedades de lechuga cultivadas en San Miguel de Allende, Guanajuato y obtenidos del análisis de las Inter-Secuencias Simples Repetidas.

En términos generales, los agrupamientos obtenidos en los municipios de Salamanca y San Miguel de Allende, se dieron en base a la severidad del mildiu y a los factores ambientales imperantes en los diferentes meses de muestreo, es decir, que los genotipos se comportan de acuerdo con el ambiente, coincidiendo con lo señalado por Legaria *et al.* (2005), al estudiar variabilidad genética de la pitahaya, encontraron que los genotipos se distribuyen espacialmente de acuerdo con las características del ambiente, situación que también fue encontrada por McDonald *et al.* (1999) al trabajar con poblaciones de *Rynchosporium secalis*, en dónde los aislados se distribuyen por las condiciones ambientales. Sólo en algunas excepciones como en el caso del grupo IV, dicho agrupamiento fue determinado por la variedad tal como lo menciona Bardin *et al.*, (1999) al trabajar con *Erysiphe cichoracearum* en el cultivo de melón.

## 6. CONCLUSIONES

Los factores ambientales tales como temperaturas de 15 °C, humedad en la hoja del 100 % y humedad relativa superior al 80 %, fueron determinantes para la presencia de *Bremia lactucae* en los campos de cultivo en Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato.

Los marcadores moleculares ISSR fueron útiles para detectar variabilidad genética del mildiu (*Bremia lactucae*), sin embargo, los iniciadores BVD-CAG<sub>5</sub>, DBB-CGA<sub>5</sub>, BDD-CAC<sub>5</sub>, BDD-CCA<sub>5</sub> fueron los más idóneos para dicho propósito.

Los agrupamientos presentados en los dendogramas indicaron la existencia de variabilidad genética en las poblaciones de *Bremia lactucae* presentes en las variedades de lechuga cultivadas en Salamanca y San Miguel de Allende, Guanajuato.

## 7. LITERATURA CITADA

- Achar, P. N. 1996. First report of downy mildew disease in lettuce caused by *Bremia lactucae* in Natal Southern Africa. Department of Microbiology, University of Durban Westville, Private Durban, South Africa. *Plant Disease* 80:464-466.
- Adachi, Y., H. Watanabe, and T. Tsuge. 1996. Relationships between genetic polymorphisms and fungicide resistance within *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 86:1248-1254.
- Agrios N, G. 1998. Fitopatología. Trad. Manuel Guzman Ortiz. Ed. Limusa. México. pp.121-127.
- Agrios N, G. 2004. Fitopatología. Trad. Manuel Guzmán Ortiz. Ed. Limusa. México. pp.121-127.
- Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Bardin, M., J. Carlier, and P.C. Nicot. 1999. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Plant Pathology* 48:531-540.
- Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733.
- Bayman, P., and P. J. Cotty. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany* 71:23-31.

- Bentley, S., K. G. Pegg, and J. L. Dale. 1995. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research* 99:1378-1384.
- Botstein, D., R. L. White, M. H. Skolnick, and R. W. Davies. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal Human Genetic* 32:314-331.
- Bridge, P. D., D. K. Arora, C. A. Reddy, and R. P. Elander. 1998. Interpretation of PCR. Methods for species definition. *In: Applications of PCR in Mycology* Bridge, P. D., and D. K. Arora. CAB International. 63-84 pp.
- Brown, S., S. T. Koike, E. O. Ochoa, F. Laemmlen, and R. W. Michelmore. 2004. Insensitivity to the Fungicide Fosetyl-Aluminum in California Isolates of the Lettuce Downy Mildew Pathogen, *Bremia lactucae*. *Plant Disease* 88:502-508.
- Brunel, D. 1994. A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology* 24:397-400.
- Burdon, J. J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 31:305-323.
- Campbell, L. C., and V. L. Madden. 1991. Introduction to plant disease epidemiology. Printed in the United States of América. 1-4 pp.
- Cobelli, L., M. Collina, and A. Brunelli. 1998. Occurrence in Italy and characteristics of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) resistant to phenylamide fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 104:449-455.
- Crute, R. I. 1987. The occurrence, characteristics, distribution, genetics, and control of a metalaxil-resistant pathotype of *Bremia lactucae* in the United Kingdom. Special Report/Industry. *Plant Disease* 77:763-767.
- Davis, M. R., K. V. Subbarao, R. N. Raid., and A. E. Kurts. 2002. Plagas y enfermedades de la lechuga. The American Phytopathological Society. 75 pp.

- De Dios Delgado I. 2003. Efecto de aplicaciones foliares de calcio y silicio en la severidad del mildiu y vida de anaquel en lechuga. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 47-48.
- DeScenzo, R. A., and T. C. Harrington. 1994. Use of (CAT)<sub>5</sub> as a DNA fingerprinting probe for fungi. *Phytopathology* 84:534-540.
- Dixon, G. R. 1981. Vegetable crop disease. *Horticultura*. División School of Agricultura. Aberdeen. UK. 215-221 pp.
- Dobrowolsky, M. P., and P. A. O'Brien. 1993. Use of RAPD-PCR to aislate a species specific DNA probe for *Phytophthora cinnamomi*. *FEMS Microbiology Letters*. 113:43-48.
- Duncans, S., J. E. Barton, and P. A. O'Brien. 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycological Research* 97:1075-1082.
- Erlich, A. H., and N. Arnheim. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual Review Genetics* 26:479-506.
- Ferreira, M. and D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Brasil. Embrapa Cenargen 220 p
- Gaunt, R. E. 1987. Measurement of disease and pathogens. pp. 2-18. *In*. Crop Loss Assessment and Pest Management. Teng, P.S. ed.. APS Press. St. Paul, Minnesota. 270 p.
- Georgopoulos, S. G. 1987. The development of fungicide resistanse. pp. 239-251 in: *Populations of Plant Pathogens: Their Dinamics and Genetics*. M. S. Wolfe and C. E. Caten, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Gobbin, D., I. Pertot, and C. Gessler. 2003. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109:153-164.
- González-Chavira, M., R. Rodríguez Guerra, F. Hernández-Godínez, J. A. Acosta-Gallegos, O. Martínez de la Vega, and J. Simpson. 2004. Análisis of pathotipos

- of *Colletotrichum lindemuthianum* found in the central region of Mexico and resistance in elite germ plasm of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease* 88:152-156.
- Groppe, K., I. Sanders, A. Wiemken, and T. Boller. 1995. A Microsatellite Marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloë* spp.) in grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3943-3949.
- Grube, C. R., and E. O. Ochoa. 2005. Comparative genetic analysis of field resistance to downy mildew in the lettuce cultivars 'Grand Rapids' and 'Iceberg'. *Euphytica* 142:205-215.
- Gull, D. D., J. K. Brecht, L. E. Datnoff, R. N. Raid, and V. L. Guzman. 1990. Storability of California and Florida crisphead lettuce. II. Fungicide treatments. *Florida State Horticultural Society Proceedings* 102:175-177.
- Gupta, P. K., H. S. Balyan, P. C. Sharma, and Ramesh. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70:45-54.
- Hans-Jürgen, A., J. V. Hoyningen-Huene. 1986. Microclimate in relation to epidemics of Powdery Mildew. *Annual Review Phytopathology* 24:491-510.
- Hartl, D. L., A. G. Clark. 1997. Molecular population Genetics. *In: Principles of Population Genetics*. Third Edition. Sinauer Associates. MA, USA. pp. 315-395.
- Heilmann, L. J., N. Nitzan, D. A. Johnson, J. S. Pasche, C. Doetkott, and N. C. Gudmestad. 2006. Genetic variability in the potato pathogen *Colletotrichum coccodes* as determined by amplified fragment length polymorphism and vegetative compatibility group analyses. *Phytopathology* 96: 1097-1107.
- Herrera-Estrella, L., J. Simpson. 1995. Genetically engineered resistance to bacterial and fungal pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11:383-392.
- Hoelzel, A. R. 1994. *Molecular Genetic Analysis of populations. A practical Approach*. IRL Press. Oxford, USA. 315 p.



- Huff, D. R., T. E. Bunting, and K. A. Plumley. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Magnaporthe poae*. *Phytopathology* 84:1312-1316.
- Hulbert, S. H., T. W. Iltot, E. J. Legg, E. S. Lincoln, S. E. Lander, and R. W. Michelmore. 1988. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using Restriction Fragment Length polymorphisms. *Genetics* 120:947-958.
- Hulbert, S. H. and R. W. Michelmore. 1988. DNA Restriction Fragment Length Polymorphism and Somatic Variation in the Lettuce Downy Mildew Fungus, *Bremia lactucae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:17-24.
- Iltot, T. W., M. E. Durgan, and R. W. Michelmore. 1987. Genetics of virulence in Californian populations of *Bremia lactucae* (Lettuce downy mildew). *Phytopathology* 77:1381-1386.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein. 1985. Hipervariable "minisatelite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Johnson, R. 1984. A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 22:309-330.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David, and J. A. Stalpers. 2001. *Diccionario of the Fungi* 9<sup>th</sup> Edition Great Britain. pp.18.
- Koch, E., K. Song, T. C. Osborn, and P. H. Williams. 1991 Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 4:341-349.
- Large, E. C. 1966. Measuring plant disease. *Annual Review Phytopathology* 4:9-28.
- Lanfranco, L., P. Wyss, C. Marzachi, and P. Bonfante. 1993. DNA probes for the identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. *FEMS Microbiology Letters* 114:245-251.

- Lee, S. J., G. A. Pender, and K. W. Devos. 1995. Characterization of loci containing microsatellite sequences among canadian wheat cultivars. *Genome* 38:1037-1040.
- Lee, I. M., E. R. Davis, and C. Hiruki. 1991. Genetic Interrelatednes among clover proliferation mycoplasmalike organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hibridization and restriction fragment length polymorphism analises. *Applied and Enviromental Microbiology* 57: 3565-3569.
- Lebeda, A., and Petrzelova, I. 2004. Variation and distribution of virulence phenotypes of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. *Plant Pathology* 53:316-324.
- Legaria S. P., C. M. E. Alvarado y H. R. Gaspar. 2005. Diversidad genética en Pitahaya (*Hylocereus undunatus* Haworth. Britton and Rose). *Revista Fitotecnica Mexicana* 28:195-202.
- Litt, M., and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetic* 44:397-401.
- Maisonneuve, B., Y. Bellec, P. Anderson, and R. W. Michelmore. 1994. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theorical Applied Genetics* 89:96-104.
- Manulis, S., N. Bogan, M. Reuven, and Y. Ben-Yephet. 1994. Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathology* 84:98-101.
- Maroto B. J. V., M. A. Gómez, y B. C. Soria. 2000. La lechuga y la escarola. Coedición. Ed. Aedos, Mundi-Prensa, Barcelona. pp. 175-181.
- Mendoza, Z. C., y B. C. Pinto. 1985. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. *Parasitología Agrícola*, UACH.
- Mendoza, Z. C. 1999. Diagnóstico de Enfermedades Fungosas. Departamento. *Parasitología Agrícola*. Universidad Autónoma de Chapingo. 168 pp.

- Meyer, W., R. Morawetz, T. Borner, and C. P. Kubicek. 1992. The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma aggregate*. *Current Genetic* 21:27-30.
- Michelmore, W. R., H. S. Hulbert. 1987. Molecular Markers for Genetic Analysis of Phytopathogenic Fungi. *Annual Review Phytopathology* 25:383-404.
- Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34:457-477.
- McDonald, B. A., and J. P. Martínez. 1990. DNA restriction fragment length polymorphism among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology* 80:1368-1373.
- McDonald, B. A., and J. M. McDermott. 1993. The population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience* 43:311-319.
- McDonald, B. A., C. C. Mundt, and R. S. Chen. 1996. The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: Evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. *Euphytica* 92:73-80.
- McDonald, B. A. 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. *Phytopathology* 87:448-453.
- McDonald, B. A., J. Zhan, J. J. Burdon. 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology* 89:639-645.
- McDermott, J. M., and B. A. McDonald. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31:353-373.
- Moore, A. G. and R. E. Durham. 1992. Molecular markers. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. Ed. by Hammerschlag, F. A. CAB. International UK. 1992. pp. 105-139.
- Moreno, S., P. J. Martin, and M. J. Ortiz. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101:117-125.

- Narváez, C., J. Valenzuela, C. Muñoz, and P. Hinrichsen. 2000. Comparación de métodos de identificación genética de vid basada en fragmentos genómicos anónimos (RAPD y AFLP). *Agricultura Técnica (Chile)* 60:320-340.
- Niks, R. E., and W. H. Lindhout. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Pedruza, Quito, Ecuador. 216 pp.
- Nutter, F.W., P. S. Teng, and F. M. Shokes. 1991. Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* 75:1187-1188.
- Pérez, G. M., F. S. Márquez, y A. L. Peña. 1997. Mejoramiento genético de hortalizas. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 313-318.
- Pipe, N. D., K. W. Buck, and C. M. Brasier. 1995. Genomic fingerprinting supports the separation of *Ophiostoma piceae* into two species. *Mycological Research* 99:1182-1186.
- Pietrek, G., and V. Zinkernagel. 2002. Differentiation of the physiological races of *Peronospora valerianellae* with a differential set of cultivars and RAPD-PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection* 109:329-337.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Ratnaparkhe, M. B., M. Tekeoglu, and F. J. Muehlbauer. 1998a. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical Applied Genetics* 97: 515-519.
- Ratnaparkhe, M. B., D. K. Santra, A. Tullu, and F. J. Muehlbauer. 1998b. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with *Fusarium* wilt resistance gene in chickpea. *Theoretical Applied Genetics* 96: 348-353.
- Ryder, E. J. 1979. Leafy Salad Vegetables. AVI Publishing Co., Wesport, C.7

- Rosewich, U. L., R. E. Pettway, T. Katan, and H. C. Kistler. 1999. Population genetic analysis corroborates dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* from Florida to Europe. *Phytopathology* 89: 623-630.
- Rojas-Martínez, R. I. 1998. Identificación del fitoplasma de la filodia del cempazúchil (*Tagetes erecta*) mediante PCR y RFLP y alteraciones fisiológicas en plantas sintomáticas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 97 p.
- Salimath, S. S., A. C. D. Oliveira, I. D. Godwin and J. L. Bennetzen. 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38:757-763.
- SAGARPA. 1997 Anuario estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Centro de Estadística Agropecuaria Tomo 1, pp. 332-338.
- Seem, R. C. 1984. Disease incidence and severity relationships. *Annual Review Phytopathology* 22:133-150.
- Sicard, D., E. Legg, S. Brown, N. K. Babu, O. Ochoa, P. Sudarshana, and R. W. Michelmore. 2003. A genetic map of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*, constructed from molecular markers and avirulence genes. *Fungal Genetics and Biology* 39:16-30.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Smith, I. M. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Trad. Fernando García Arenal. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 265-267.
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 573 pp. © 2000 by Applied Biostatistics, Inc.
- Staub, T. 1991. Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29: 421-442.

- Schlick, A., K. Kuhls, W. Meyer, E. Lieckfeld, T. Borner, and K. Messner. 1994. Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 26:74-78.
- Sharma, T. R., J. P. Tewari. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research* 102:807-814.
- Scherm, H., and A. H. C. van Bruggen. 1993. Response surface models for germination and infection of *B. lactucae*, the fungus causing downy mildew of lettuce. *Ecological Modelling* 65:281-296.
- Scherm, H., and A. H. C. van Bruggen. 1994. Weather variables associated with infection of lettuce by downy mildew (*Bremia lactucae*) in coastal California. *Phytopathology* 84:860-865.
- Subbarao, K. V., J. C., Hubbard, and K. F. Schulbach. 1997. Comparison of lettuce diseases and yield under subsurface drip and furrow irrigation. *Phytopathology* 87:877-883.
- Su, H., A. H. C. van Bruggen, K. V. Subbarao, and H. Scherm. 2004. Sporulation of *Bremia lactucae* affected by temperature, relative humidity, and wind in controlled conditions. *Phytopathology* 94:396-401.
- Tanksley, S. D., N. D. Young, A. H. Paleson, and M. W. Boniezbball. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7:251-265.
- Tapia C. E., A. H. Guillen, y E. M. A. Gutiérrez. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas* spp.) mediante RAPD e ISSR. *Revista Fitotécnica Mexicana* 28:187-194.
- Teng, P.S. 1987. Quantifying the relationship between disease intensity and yield loss. *In*. Teng, P.S. ed. *Crop Loss Assessment and Pest Management*. pp. 105-113. APS Press. St. Paul, Minnesota. 270 p.

- Tsumura, Y., K. Ohba, and S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Crytomeria japonica*). *Theoretical Applied Genetic* 92:40-45.
- Tenzer, I., S. Degli Ivanissevich, M. Morgante, and C. Gessler. 1999 Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89:748-753.
- Vavilov, W. I. 1951. The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. *Chron. Bot*, 13 (1/6), 1-366.
- Verhoeff, K. 1960. On the parasitism of *Bremia lactucae* Regel on lettuce. 66:133-144.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van der Lee, M. Hornes, A. Frijtens, J. Pot, J. Peleman, M. Kiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Villamon, F. 2000. Caracterización de microsatélites de *Solanum tuberosum* Subs. *tuberosum* y en las otras especies de papa cultivada. Tesis para obtener el Título de Biólogo. Facultad de Ciencias biológicas. UNMSM. Lima-Perú.
- Valádez, M. C., y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi Prensa, S. A. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 147 pp.
- Wagner, S. 2005. Molecular Identification of Races of *Bremia lactucae* with ISSR-Primer. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. Institute for Plant Protection in Horticulture Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany.
- Ward, E., A. Tahiri-Alaoui, and J. F. Antoniw. 1998. Applications of PCR in fungal-plant interactions. In: *Applications of PCR in Mycology* Bridge, P. D., D. K. Arora, C. A. Reddy, R. P. Elander. (eds). CAB International 1998. pp. 289-307.
- Walker, C. J. 1965. *Patología vegetal*. Trad. Antonio Aguirre Azpeitia. Ed. Omega, S. A. Barcelona, España, pp. 231-238.

- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plant and fungi. CRC Press Boca Raton.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. K. Livak, J. A. Rafalsky, and V. S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Wolfe, M. S. 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 23:251-273.
- Wu, K., R. Jones, L. Danneberger, and P. A. Scolnik. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* 22: 3257-3258.
- Wu, B. M., K. V. Subbarao, and A. H. C. van Bruggen. 2000. Factors affecting the survival of *Bremia lactucae* sporangia deposited on the lettuce leaves. *Phytopathology* 90:827-833.
- Wu, B. M., K. V. Subbarao, A. H. C. van Bruggen, and S. T. Koike. 2001a. Comparison of three fungicide spray advisories for lettuce downy mildew. *Plant Disease* 85:895-900.
- Wu, B. M., A. H. C. van Bruggen, K. V. Subbarao, and G. G. H. Pennings. 2001b. Spatial analysis of lettuce downy mildew using geostatistics and geographic information system. *Phytopathology* 91:134-142.
- Wu, B. M., K. V. Subbarao, and A. H. C. van Bruggen. 2005. Analyses of the relationships between lettuce downy mildew and weather variables using geographic information system techniques. *Plant Disease* 89:90-96.
- Yap I. V. 1991. WinBoot: UPGMA bootstrapping for binary data. By the University of Washington.
- Yuen, J. E., and J. W. Lorbeer. 1987. Natural and experimental production of oospores of *Bremia lactucae* in lettuce in New York. *Plant Disease* 71:63-64.
- Yourman, L. F., S. N. Jeffers, and R. A. Dean. 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 90:851-859.



Zink, F. W., and J. E. Welch. 1962. Postharvest deterioration of the downy mildew-susceptible lettuce variety Great Lakes and the resistant variety Calmar. *Plant Disease Report* 46:719-721.

Zietkiewicz, E., A. Rafalsky, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

## 8. ANEXOS

8.1. Correlación de variables ambientales con la severidad de *Bremia lactucae* en Salamanca, Guanajuato.

	Sev	T	HR	HH
Sev	1.00000	0.98474	0.97357	0.62657
T	0.98474	1.00000	0.99086	0.57158
HR	0.97357	0.99086	1.00000	0.65975
HH	0.62657	0.57158	0.65975	1.00000
	0.0023	0.0023	0.0051	0.2580
	0.0023	0.0010	0.0010	0.3141
	0.0051	0.0010	0.0051	0.2257
	0.2580	0.3141	0.2257	

8.2. Correlación de variables ambientales con la severidad de *Bremia lactucae* en San Miguel de Allende, Guanajuato.

	Sev	T	HR	HH
Sev	1.00000	0.96517	0.59506	0.14081
T	0.96517	1.00000	0.39046	-0.06097
HR	0.59506	0.39046	1.00000	0.86259
HH	0.14081	-0.06097	0.86259	1.00000
	0.0078	0.0078	0.2898	0.8213
	0.0078	0.5158	0.5158	0.9224
	0.2898	0.5158	0.2898	0.0599
	0.8213	0.9224	0.0599	

**8.3.1.** Matriz de datos obtenidos mediante los microsátélites en las variedades de lechuga cultivadas en Salamanca.

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0

```

0 1 1 1 0 0 1 1 0 1 1 0
0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 1
0 1 0 1 1 0 1 1 0 1 0 0
1 1 1 0 0 1 1 0 1 1 1 1
0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0
0 0 0 1 1 1
0 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1
0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 0 1 0 0
0 1 1 0 0 1
0 0 0 0 0 0
1 1 0 0 0 0
0 1 0 1 1 1
0 0 0 1 1 1
0 0 0 0 1 0
0 0 0 0 1 0
1 1 0 0 1 1
1 0 0 1 1 1
0 0 0 1 1 1
0 0 0 1 1 1
1 0 0 1 1 0
1 1 1 0 0 1

```

---

1= Montecristo, 2= FallGreen, 3= Summertime, 4= Magnum, 5= King-Henry, 6= Napoleón

### 8.3.2. Matriz de distancias genéticas de los aislados de *Bremia lactucae* en Salamanca, calculada de los datos moleculares de Microsatélites.

---

	Montecristo	FallGreen	Summertime	Magnum	King-Henry	Napoleón
Montecristo	1,000					
FallGreen	0,786	1,000				
Summertime	0,653	0,707	1,000			
Mágnum	0,440	0,493	0,493	1,000		
King-Henry	0,533	0,480	0,400	0,667	1,000	
Napoleón	0,440	0,520	0,573	0,627	0,693	1,000

---

**8.4.1. Matriz de datos obtenidos mediante los Microsatélites en las variedades de lechuga cultivadas en San Miguel de Allende, Guanajuato.**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
1	1	1	0	1	1	1	1	1							
1	1	1	1	0	0	0	1	1							
1	1	1	1	1	1	1	1	0							
0	0	0	0	1	0	0	1	1							
0	1	1	1	1	0	0	1	1							
0	1	0	1	0	0	1	0	0							
1	0	1	0	1	0	0	1	1							
1	1	0	1	0	0	0	0	1							
0	0	0	0	1	0	0	0	1							
0	0	0	0	1	1	1	1	1							
0	1	0	0	1	1	1	1	1							
1	0	0	0	0	0	0	0	0							
0	0	1	0	0	1	1	0	0							
1	0	1	1	0	1	1	1	0							
1	1	1	1	0	1	1	1	1							
1	1	1	1	0	1	1	1	1							
0	1	1	1	0	1	1	1	1							
1	0	1	0	0	1	1	1	1							
1	1	1	1	0	0	0	1	1							

---

1= Sundavil, 2= Rayder, 3= Siskiyou, 4= Rayder, 5= Vertemar, 6= Alfa, 7= Magnum, 8= Sundavil, 9= Summertime.

**8.4.2. Matriz de distancias genéticas de los aislados de *Bremia lactucae* en San Miguel de Allende, calculada de los datos moleculares de Microsatélites.**

	Sundavil	Rayder	Siskiyou	Rayder	VerteMar	Alfa	Magnum	Sundavil	Summertime
Sundavil	1,000								
Rayder	0,547	1,000							
Siskiyou	0,787	0,507	1,000						
Rayder	0,627	0,653	0,533	1,000					
VerteMar	0,520	0,467	0,587	0,413	1,000				
Alfa	0,613	0,507	0,600	0,560	0,533	1,000			
Magnum	0,547	0,467	0,560	0,547	0,547	0,827	1,000		
Sundavil	0,520	0,547	0,640	0,493	0,547	0,640	0,573	1,000	
Summertime	0,480	0,533	0,547	0,480	0,560	0,547	0,480	0,800	1,000

### 8.5. Escala De Dios (2003) para *B. lactucae*.

	%		%		%
0	Sin daño				
0,1	0,625	1,1	6.87	2,1	13,75
0,2	1,25	1,2	7.5	2,2	15
0,3	1,87	1,3	8.12	2,3	16,25
0,4	2,5	1,4	8.75	2,4	17,5
0,5	3,12	1,5	9.37	2,5	18,75
0,6	3,75	1,6	10	2,6	20
0,7	4,37	1,7	10.62	2,7	21,25
0,8	5	1,8	11.25	2,8	22,5
0,9	5,62	1,9	11.87	2,9	23,75
<b>1</b>	<b>6,25</b>	<b>2</b>	<b>12.5</b>	<b>3</b>	<b>25</b>
3,1	27,5				
3,2	30				
3,3	32,5				
3,4	35				
3,5	37,5				
3,6	40				
3,7	42,5				
3,8	45				
3,9	47,5				
<b>4</b>	<b>50</b>				
4,1	50,1				
<b>5</b>	<b>Más del 50 %</b>				