



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

Susceptibilidad/Resistencia de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary a Fungicidas

MARTHA NAYELI ROBLEDO ESQUEDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO, NOVIEMBRE DE 2014.

La presente tesis titulada: Susceptibilidad/Resistencia de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary a Fungicidas, realizada por la alumna Martha Nayeli Robledo Esqueda bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

POSTGRADO EN FITOSANIDAD FITOPATOLOGÍA

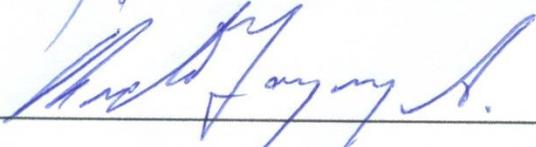
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JOSÉ SERGIO SANDOVAL ISLAS

DIRECTOR



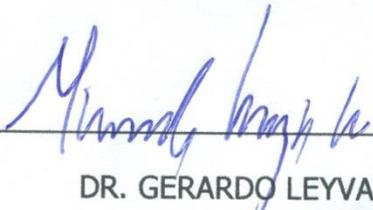
DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR



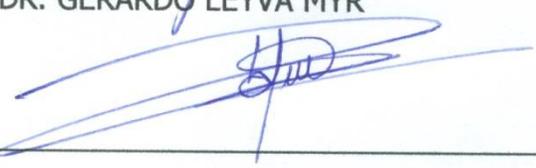
DRA. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN

ASESOR



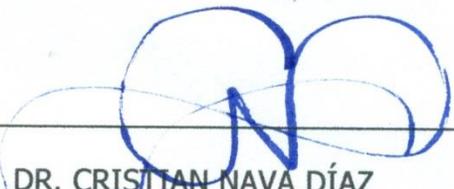
DR. GERARDO LEYVA MYR

ASESOR



DRA. PATRICIA RIVAS VALENCIA

ASESOR



DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2014.

SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary A FUNGICIDAS.

Martha Nayeli Robledo Esqueda, Dr. en Ciencias.

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN GENERAL

El manejo del oomiceto *Phytophthora infestans* Mont. de Bary causante del tizón tardío en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), es un reto por el uso extensivo e intensivo de productos químicos que representan alta presión de selección- e inducen el afloramiento de la resistencia del patógeno a los fungicidas. Considerando que en Chapingo, Estado de México, hay condiciones ideales para el desarrollo de *P. infestans*, pero sin siembras comerciales, se establecieron en el verano del 2011 y 2012 parcelas de papa con variedades susceptibles al tizón y expuestas a la infección natural del patógeno, con aplicaciones foliares de media dosis de fungicidas, con los objetivos de 1) cuantificar la infección, 2) identificar posible afloramiento de resistencia de *P. infestans* a dichos productos, y 3) comparar la relación de la resistencia del microorganismo de un ciclo a otro, y de *in vivo* con respecto a *in vitro*. Para esto último (*in vitro*), se establecieron experimentos en medio centeno agar adicionando los fungicidas utilizados en el campo a los fragmentos miceliales del oomiceto obtenido de las papas infectadas en los tratamientos con fungicidas en los ciclos de cultivo en el campo y se cuantificó su crecimiento respecto al testigo sin fungicidas. El fungicida que mejor controló la enfermedad en el campo fue mandipropamid, con 22% de infección en el 2011 y 20.95% en el 2012 (Tukey, $P = \alpha \leq 0.05$), aunque no fue así para la resistencia del microorganismo *in vitro*, identificándose poblaciones del oomiceto con diversos niveles de resistencia a este y a otros productos en el

laboratorio. En general, el comportamiento de la resistencia de los inóculos a los fungicidas fue opuesto al compararlos entre condiciones *in vivo* e *in vitro*, por lo que no se puede predecir la consistencia de su comportamiento en diversas situaciones. Estos resultados muestran la gran flexibilidad genética del oomiceto relacionada con su resistencia/susceptibilidad a los fungicidas.

Palabras clave: Tizón tardío, resistencia-susceptibilidad a fungicidas.

SUSCEPTIBILITY / RESISTANCE TO *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary TO FUNGICIDES.

Martha Nayeli Robledo Esqueda, Dr. en Ciencias

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

The oomycete *Phytophthora infestans* Mont de Bary management. which is the cause of late blight in potato crops (*Solanum tuberosum* L.) is challenging due to the intensive and extensive use of chemicals which represent high pressure of selection for the outcrop of pathogen resistance to fungicides. Considering that in Chapingo, Mexico, there are ideal conditions for the development of *Phytophthora infestans*, but without commercial plantings, in the summer of 2011 and 2012 were established pieces of ground of potato with blight susceptible varieties and exposed to natural infection of the pathogen, with foliar applications and half doses of fungicides, with the following objectives: 1) quantify infection, and 2) to identify possible emerging of resistance of *P.infestans* to such products, and 3) comparing the ratio of the resistance of the microorganisms from one cycle to another, and also in vivo compared to in vitro.

To make this comparison, experiments were performed on rye agar medium, and fungicides used in the field were added to the mycelial fragments obtained from the oomycete infected potato fungicide treatments on crop cycles in the field, besides its growth was quantified relative to the control without fungicides.

The most effective fungicide to control the disease in the crop field is mandipropamid with 22% of infection in 2011 and 20.95% in 2012 (Tukey, $P= \alpha \leq 0.05$), although it was not for the resistance of the organism in vitro, identifying oomycete populations with different levels of

resistance to this and other products in the lab. Overall, the behavior of the inoculum to fungicide resistance was compared between opposite to the conditions *in vivo* and *in vitro*, therefore it is not possible to predict its behavior consistency in various situations. These results show high genetic flexibility oomycete associated with resistance / susceptibility to fungicides.

Keywords: Late blight, fungicide resistance-susceptibility.

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros del Colegio de Postgraduados, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación en el doctorado en especial: al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por haber guiado el desarrollo de este trabajo, por compartir tanto de su experiencia, por enseñarme tanto y llegar a la culminación del mismo, al Dr. José Sergio Sandoval Islas, al Dr. Gerardo Leyva Myr, a la Dra. Patricia Rivas Valencia, a la Dra. María Teresa Colinas León y al Dr. Cristian Nava Díaz por su apoyo, consejos, aportes y tiempo ofrecido.

Al Dr. Roberto García Espinosa, quien me brindó su apoyo incondicional, gracias maestro por tantas enseñanzas, sabiduría y cariño.

A mis padres con gratitud, quienes con su dedicación y sacrificio hicieron posible mi anhelo de ser profesional, a mis queridos hermanos: Ericka, José, Tania, Samantha por su gran ayuda, porque siempre he contado con ustedes para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y la amistad ¡Gracias!

A mi pequeña Paula, razón de mi ser y sentido en la vida, ojala pueda servirte de ejemplo para tu superación, en la esperanza de que verás un mundo mejor.

A mi esposo, Oscar intentando expresarle mi gratitud por su apoyo, su comprensión generosa y su tolerancia infinita a mis pretensiones intelectuales.

A mi cuñada y cuñados que con mucho afecto, siempre me dan ánimos para seguir adelante.

A la familia Flores Hernández que con tanto cariño siempre me han visto como a una de sus hijas, gracias por su apoyo y atenciones siempre en todo momento.

Al Sr. Anastasio, por sus amables atenciones, enseñanzas y amistad, gracias por su apoyo.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al laboratorio de usos múltiples de Fitotecnia por su colaboración a la realización de este proyecto.

Al CONACYT, por apoyarme económicamente durante los años que duró mi preparación.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Presentación.....	1
1.2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos particulares.....	4
1.3. Hipótesis.....	4
1.4. Generalidades y taxonomía de <i>Phytophthora infestans</i> Mont. de Bary.....	5
1.5. Filogenia de <i>Phytophthora infestans</i>	6
1.6 centro de origen de <i>P. infestans</i> en relación al género <i>Solanum</i>	10
1.7. Fisiología del parasitismo de <i>P. infestans</i> en papa.....	11

CAPITULO II. MODOS DE ACCIÓN DE LOS FUNGICIDAS Y DESARROLLO DE LA RESISTENCIA

Resumen.....	16
Abstract.....	17
2.1. Introducción.....	18
2.2. Fungicidas de Contacto.....	19
2.2.1. Cúpricos.....	19
2.2.2. Ditiocarbamatos.....	19
2.2.3. Phtalimidas.....	20
2.2.4. Estáñicos.....	20
2.3. Fungicidas Sistémicos.....	21

2.3.1. Fosfonatos.....	21
2.3.2. Cianoacetamidas.....	21
2.3.3. Carbamatos.....	22
2.3.4. Derivados del ácido cinámico.....	22
2.3.5. Fenilamidas.....	22
2.3.6. Madelamidas.....	23
2.4. Resistencia a Metalaxil desarrollada en <i>Phytophthora infestans</i> Mont. de Bary.....	25
2.5. Materiales y Métodos.....	30
2.5.1. Colección de aislamientos de <i>P. infestans</i> y lecturas de infección.....	30
2.5.2. Determinación de Tipos de Compatibilidad.....	31
2.5.3. Evaluación <i>in vitro</i>	32
2.6. Resultados y discusión.....	34
2.6.1. Aislamientos y progreso de la curva de la enfermedad.....	34
2.6.2. Porcentaje de Infección.....	35
2.6.3. Porcentaje de aislamientos resistentes, medianamente resistentes y susceptibles <i>in vitro</i>	40
2.6.4. Correlaciones y tipos de compatibilidad entre los aislamientos y las sustancias químicas analizadas.....	43
CAPITULO III. Conclusiones.....	45
CAPITULO IV LITERATURA CITADA.....	46
APENDICES.....	66

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Genoma mitocondrial de <i>P. infestans</i> (Garet and Shaw).....	6
Figura 2. Filogenia de <i>P. infestans</i> (<i>Phytophthora</i> database).....	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>P. infestans</i> (Schumann and C.J. D'Arcy)	13
Figura 4. Respuesta bioquímica de la interacción de la planta con <i>P. infestans</i> (Stuart, <i>et. al.</i>, 2014).....	14

CAPÍTULO II

Figura 1. Modo de acción de los fungicidas de contacto y sistémicos (Homo agrícola, 2014).....	18
Figura 2. Progreso de la infección foliar, por efecto de la aplicación de media dosis de los fungicidas.....	37
Figura 3. Progreso de la infección foliar en 2012, por efecto de la aplicación de dosis completas de los fungicidas.....	39
Figura 4. Porcentaje de aislamientos susceptibles, intermedios y resistentes in vitro en medio centeno agar.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Clasificación de los fungicidas utilizados en el manejo de <i>Phytophthora infestans</i> de acuerdo a su modo de acción.....	24
Cuadro 2. Número de aislamientos y tipo de compatibilidad (A1, A2) por año.....	35
Cuadro 3. Comparación de medias de la última lectura de la infección foliar de aplicación de medias dosis y área bajo la curva de progreso de la enfermedad.....	36
Cuadro 4. Comparación de medias de la última lectura de la infección foliar de aplicación de dosis completas y área bajo la curva de progreso de la enfermedad.....	38
Cuadro 5. Análisis de correlación entre las sustancias activas utilizadas en el campo y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de <i>P. infestans</i> con la concentración de 0.1 mg L⁻¹ en 2012.....	43

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PRESENTACIÓN

Phytophthora infestans Mont. de Bary es el agente causal del tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum* L.), del jitomate (*Solanum lycopersicum*) y de otras plantas de la familia de las solanáceas. El oomiceto afecta las hojas, los tallos y los tubérculos y dispersa sus esporangios rápidamente por medio del viento si las condiciones son propicias. Si el cultivo no está protegido adecuadamente con aplicaciones planificadas de fungicidas, los campos de papa pueden ser destruidos en 10 a 15 días lo cual ocurre en algunas zonas paperas de México y del mundo y las pérdidas pueden ser totales (Abad y Ochoa, 1995). Como medidas de manejo, el uso de fungicidas sistémicos modernos revolucionó a la agricultura, sin embargo al perfeccionar estas estrategias, las poblaciones de *P. infestans* experimentaron resistencia a dichos productos, favorecida por el uso continuo de un solo producto, la cual es una de las prácticas incorrectas en el manejo de la enfermedad (Damicone, 2004). El metalaxil es un ejemplo y su introducción en 1980 es tan importante que todavía se utiliza, y por pertenecer al grupo químico de las acilalaninas actúa en sitios específicos del patógeno impidiendo la biosíntesis de proteínas mediante la interferencia en la síntesis del ARN ribosomal. Este hecho se reportó en 1981 en Europa, y en 1993 en EE. UU., Canadá, México y Ecuador (Davidse *et al.*, 1981; Drenth *et al.*, 1993; Matuszak *et al.*, 1994; Manríquez, 1995; Power *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1997), al grado de considerarlo como una variable adicional para caracterizar a *P. infestans* (Dowley y O'Sullivan, 1985; Doster *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1997; Matuszak *et al.*, 1994; Runno y Koppel, 2006).

Como consecuencia del afloramiento de resistencia al metalaxil en el mundo, en 1990 se generaron otras sustancias sistémicas para el control del tizón tardío, como la ciazofamida, que

interfiere con la cadena de respiración mitocondrial; el mandipropamid, inhibe la síntesis de celulosa de la pared celular, actúa en la proteína PiCesA3 celulosa sintetasa, y está involucrado en la formación del micelio y los haustorios durante la fase inicial de incubación de la enfermedad (Cohen *et. al.*, 2007, Blum *et. al.*, 2010). Además, mandipropamid modifica la biosíntesis de los fosfolípidos y causa alteraciones en las F- actinas (Griffiths *et. al.*, 2003), y el fosetil aluminio actúa en la planta estimulando sus mecanismos de defensa, ambos se usan para el control del oomicete y aumenta los niveles de peroxidasas, de fitoalexinas, de polisacáridos y de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (Brent y Hollomon, 2007; Gisi y Cohen, 1996). El modo de acción de este producto se basa en su influencia en la fosforilación enzimática y en el metabolismo del fosforo, afectando la síntesis de diferentes compuestos que contienen fosforo, esenciales para el crecimiento de *Phytophthora*, como el nicotinamida adenina dinucleotido (NAD), adenosin trifosfato (ATP) y nucleótidos (Gómez y Reis, 2011).

El carácter heterotalico de *P. infestans* le confiere ventajas evolutivas, ya que aumenta la variabilidad genética y el intercambio de factores de virulencia; de esta manera a escala poblacional estos eventos de recombinación generan genotipos más agresivos adaptándose así a varios nichos ecológicos y a la presencia de fungicidas (Goodwin *et al.*, 1995; Adler, *et al.*, 2004; Erwin y Ribeiro, 1996; Knapova *et. al.*, 2001).

Al respecto en el valle de México en el 2001, Grünwald y colaboradores mencionan una nueva base de datos en relación a la susceptibilidad de fungicidas para una población sexual de *P. infestans* en su centro de origen en condiciones de crecimiento naturales. En esta base de datos, el patógeno presenta una amplia gama de susceptibilidad al fungicida metalaxil, mientras que para azoxistrobina un compuesto químico de la familia de las estrobilurinas sí se presenta resistencia (Evenhuis, *et. al.*, 1996; Grünwald *et. al.*, 2001).

Por lo anterior, es pertinente hacer un estudio más amplio de otros fungicidas respecto al afloramiento de la resistencia. El presente estudio, por tanto, se propuso en Chapingo, México, pues cuenta con el clima ideal para el desarrollo de la enfermedad (Díaz de la Cruz, 2013), con poblaciones relativamente silvestres del oomiceto (Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2013) sin presión de selección sobre el patógeno debida a fungicidas ya que no hay cultivos comerciales de papa en la región.

El reporte está organizado en tres capítulos, siendo los capítulos 1 y 2 los que recopilan la contribución esencial del trabajo.

El Capítulo 1, “Introducción general”, describe la importancia y justificación del trabajo.

El Capítulo 2, “Modos de acción de los fungicidas y desarrollo de la resistencia”, describe las moléculas químicas, que efectos causan en las células del patógeno o de la planta y su relación con el desarrollo de la resistencia de *P. infestans*.

El Capítulo 3, conclusión general y capítulo 4 bibliografía citada.

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* a diferentes moléculas químicas de uso común para su control.

1.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la severidad de la enfermedad bajo condiciones de infección natural.
2. Determinar *in vitro* la resistencia y la susceptibilidad del oomiceto a fungicidas.
3. Comparar la relación de la resistencia del microorganismo de un ciclo a otro, *in vivo* con respecto a *in vitro*.

1.3. HIPÓTESIS

En Chapingo México, la aplicación de medias dosis y dosis completas de químicos de uso común nos permiten detectar cepas resistentes de *P. infestans*.

Existen aislamientos con distintos tipos de compatibilidad.

1.4. GENERALIDADES Y TAXONOMÍA DE *Phytophthora infestans* MONT. DE BARY

Uno de los retos presentados para la agricultura mundial después de la hambruna de 1845 en Irlanda, fue el control de *Phytophthora infestans* Mont. de Bary. De las enfermedades más importantes en el cultivo de la papa, el tizón tardío es la más devastadora. Condiciones de clima húmedo y moderadamente frío favorecen el desarrollo de la enfermedad, que es capaz de destruir de forma rápida la totalidad del follaje (Abad, Z. G.; Abad, J. A., 1997).

Este microorganismo pertenece al Phylum Oomycota, perteneciente al Subphylum Stramenopila, comprende a más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas y los gametos masculinos, con paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres aunque siempre necesitan la presencia de agua.

Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos. (Raven, *et. al.*, 1999), lo que luego fue confirmado por filogenias moleculares, basadas en las secuencias del RNA ribosomal, datos de los aminoácidos compilados para las proteínas de la mitocondria y cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos (Figura 1), evidenciando que los Oomycetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos (Kamoun, *et. al.*, 2002).

Las características que diferencian al género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de B' 1-3 glucano en vez de

quitina, carencia de hipoxidación del esqualeno a esteroides y diferencias en las vías metabólicas, como resultado de un sistema genético único (Griffith y Shaw, 1992).

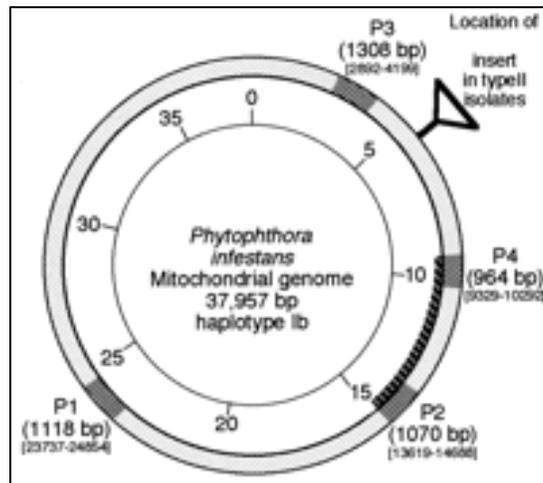


Figura 1. Genoma mitocondrial de *P. infestans* (Garet and Shaw).

1.5. FILOGENIA DE *Phytophthora infestans*

Los oomicetos, presentan procesos moleculares únicos para infectar a sus hospederos, de forma tradicional por sus hábitos de crecimiento filamentosos, a los oomicetos se les han clasificado como hongos, sin embargo los análisis moleculares y bioquímicos modernos sugieren que los oomicetos tienen poca afinidad taxonómica con hongos filamentosos, pero están más estrechamente relacionados con las algas marrones, en el reino de los Stramenopila (Baldauf, *et. al.*, 2000, Margulis y Schwartz, 2000).

P. infestans, posee un número de características biológicas notables que los distinguen de otros microorganismos eucariotas. Por ejemplo, las paredes celulares se componen principalmente de polímeros y celulosa β -1,3-glucano; a diferencia de las paredes celulares de los hongos, que contienen poca quitina (Erwin, 1983), su tamaño del genoma se calculó en aproximadamente 237 Mb (Tooley, *et. al.*, 1987), así como un análisis microscópico que reveló que *P. infestans* tiene de 8 a 10 cromosomas (Sansome, 1973).

En cuanto a su organización del genoma, *Phytophthora* se caracteriza por una abundancia de secuencias repetitivas, por ejemplo en *P. sojae*, se identificaron cinco familias de secuencias repetidas en tándem de ADN cromosómico de diferentes aislados del patógeno (Mao y Tyler, 1996). Estas secuencias variaban en el número de copias entre los aislados y fueron localizados en un solo cromosoma de *P. sojae*. En *P. infestans*, la mayoría de las familias de ADN repetidas que cubren al menos el 50% del genoma, han podido ser identificadas (Judelson y Randall, 1998).

Estos elementos repetidos fueron agrupados en 33 familias diferentes, que fueron ya sea repetidas en tándem o dispersas por todo el genoma de *P. infestans* (Judelson y Randall, 1998). Un número de estas secuencias repetidas se produjo en otras especies lejanamente relacionadas, como *Phytophthora mirabilis* (Figura 2), de esta manera dos de tales secuencias se utilizaron para desarrollar cebadores específicos para la detección sensible y fiable, así como la identificación de *P. infestans* en muestras de plantas (Judelson y Tooley, 2000). Una familia de secuencias repetidas, ICPS, también se detectó en *Phytophthora cryptogea*, estos elementos varían de 100 a 1200 pb y no fueron detectados por hibridación en otras 20 especies de *Phytophthora*, a excepción de unas pocas copias en *P. cinnamomi* (Panabieres y Le Berre, 1999).

En otros estudios, se reporta que *P. infestans* junto con otros oomicetos posee inestabilidad en su genoma porque presentan gran variación fenotípica, tanto en el campo y como en cultivos *in vitro*, incluso durante la reproducción asexual (Caten y Jinks, 1968, Francis y Clair, 1997), la base genética de este fenómeno no está clara, pero podría ser debido a la inestabilidad del genoma, tal vez causados por elementos de transposición, la conversión de genes, recombinación mitótica, y / o cromosomas prescindibles (Chamnanpant *et. al.*, 2001).

Secuencias similares a los elementos de transposición son abundantes en los genomas de *Phytophthora*. Por ejemplo, las secuencias con similitud a la copia y Gypsy / Ty clases de retrotransposones han sido descritos (Judelson, 2002), Gypsy-como secuencias se detectaron en 29 especies de *Phytophthora* y de forma variada de manera que se observaban de 10 a 10000 copias por genoma (Judelson, 2002).

Phytophthora también puede haber desarrollado mecanismos específicos para generar variación genética rápida, recientemente, se observó la conversión génica mitótica que se producía en las cepas híbridas de *P. sojae* en muy altas frecuencias, de hasta 3×10^2 conversiones por locus por núcleo por generación (Chamnanpant, *et. al.*, 2001). La conversión génica mitótica dio lugar a la recombinación de los loci que muestran una estrecha vinculación durante la recombinación meiótica, lo que sugiere que en la naturaleza este mecanismo podría generar rápidamente tipos genéticos únicos (Chamnanpant,*et. al.*, 2001). Otros mecanismos de variación genética, tales como la recombinación mitótica y parasexualidad, se han propuesto por varios autores y puede también contribuir a la inestabilidad fenotípica.

Un mapa genético detallado de *P. infestans* basados en el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) ya se reportó por Van der Lee, *et. al.*, en 1997. Los datos se generan a partir de la progenie 73 F 1 de un cruce entre dos aislamientos homocariotas y diploides de *P. infestans*. Un total de 183 marcadores AFLP, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción 7 (RFLP), y el locus de tipo de apareamiento fueron asignadas en 10 principales y 7 grupos de ligamiento menores que cubren un total de 827 centimorgans (cm).

En estudios que se refieren a las enzimas producidas por oomicetes para la degradación de pared celular en el hospedero, se ha encontrado que la familia endo-PG degradadora de pared celular, es notable en muchos aspectos. En *P. cinnamomi*, endo-PGs forma una familia

importante con al menos 19 miembros los cuales pueden haber contribuido a la evolución de esta familia estructuralmente diversa y compleja (Gotesson, *et. al.*, 2002). Los análisis filogenéticos han indicado que *Phytophthora* endo-PGs son más similares a hongos endo-PGs que a su planta y homólogos bacterianos (Gotesson *et. al.*, 2002, Torto *et. al.*, 2002). De manera similar se encontró que poseen afinidad filogenética en las secuencias para exo-1,3-β-glucanasas y una endo-1,3-β-glucanasa de *P. infestans*. Las filogenias de estas enzimas son inesperadas y el contraste con filogenias obtenidas utilizando secuencias ribosómicas o secuencias de proteínas compilados a partir de genes cromosómicos mitocondriales y de limpieza (Lang, *et. al.*, 1999, Baldauf, *et. al.*, 2000). Estas filogenias excepcionales podrían reflejar la evolución convergente a través del cual las enzimas filogenéticamente distintas evolucionaron para compartir similitud significativa, tal vez apuntando a sustratos similares. Por otro lado, los eventos de transferencia horizontal de genes pueden haber tenido lugar cuando los patógenos oomicetos de las plantas adquirieron endo-PG y los genes glucanasa (Baldauf, *et. al.*, 2000).

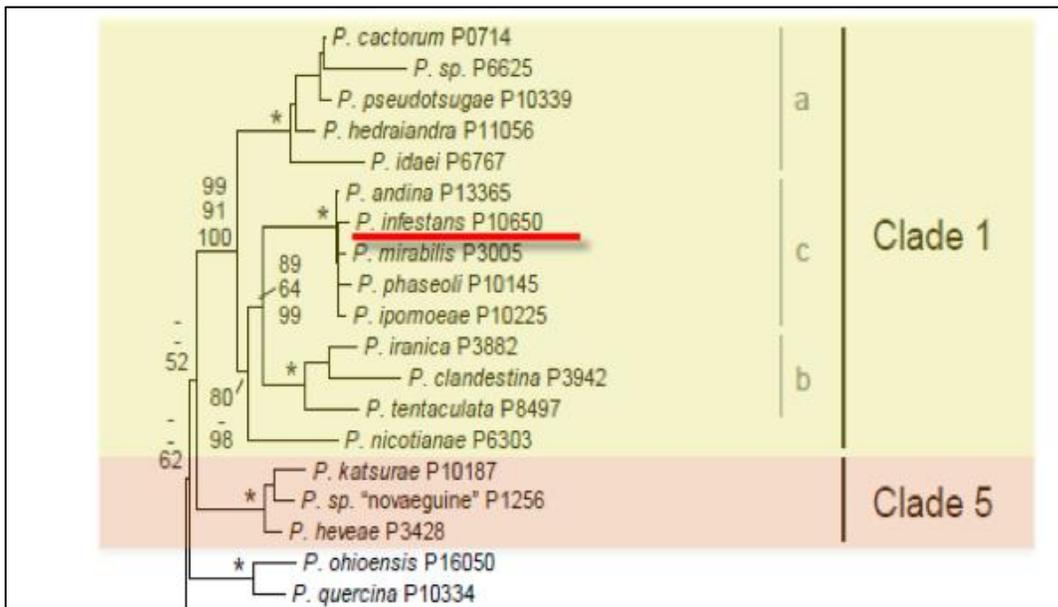


Figura 2. Filogenia de *P. infestans* (*Phytophthora* database).

1.6 CENTRO DE ORIGEN DE *P. infestans* EN RELACIÓN AL GÉNERO *Solanum*.

Se considera que *P. infestans* se originó en las zonas altas del centro de México, más específicamente dentro del valle de Toluca (Goodwin *et. al.*, 1992, Fry *et. al.*, 1993, Flier *et. al.*, 2003, Lozoya-Saldaña *et. al.*, 2001, Chacón, 2007). Actualmente se presenta en cualquier parte del mundo en la que se cultive papa y jitomate (Goodwin 1997, Fry *et. al.*, 2009). Esta especie es famosa a nivel mundial por haber causado la epidemia en papa que provocó una gran hambruna en Irlanda, la cual tuvo como consecuencia la muerte y migración de millones de Irlandeses entre 1845 y 1846 (Agrios, 2011). Se piensa que el patógeno llegó a Europa mediante una migración a principios de 1840, primero de México a Estados Unidos y después de este país a Europa (Fry *et. al.*, 1993, Goodwin *et. al.*, 1994, Goodwin, 1997). De Europa el patógeno pudo haberse distribuido al resto del mundo por medio del comercio internacional de tubérculos como semilla (Fry *et. al.*, 1993).

Antes de los 1980s únicamente el TC A1 se encontraba presente fuera de México, el linaje clonal predominante era del genotipo correspondiente al US-1 (que presenta: TC A1, haplotipo mitocondrial I-b, genotipo 86/100 para Gpi y 92/100 para Pep, un patrón de RFLP único y sensible al mefenoxam) y no se tenían evidencias de que una migración adicional a la de los 1840s hubiera ocurrido. Por lo cual se llegó a la conclusión de que este linaje había sido el causante de la epidemia del tizón tardío a mediados del siglo XIX (Goodwin *et. al.*, 1994). Sin embargo un estudio analizando ADN mitocondrial de especímenes de herbario demostró que el patógeno a mediados del siglo XIX y principios del XX en Europa poseía el haplotipo I-a, a diferencia del US-1 que es I-b. Por lo que se llegó a la conclusión de que US-1 no era el linaje

dominante antes de 1950 y por lo tanto no era posible que fuera el causante de dicha epidemia (May, *et. al.*, 2002).

En 1981 se reportó por primera vez el TC A2 fuera de México, en Suiza y poco tiempo después en otros países europeos (Fry *et. al.*, 2009) y estudios posteriores con diferentes marcadores moleculares (Haplotips mitocondriales, genotipos isoenzimáticos y patrones genéticos RFLP) mostraron la aparición de nuevas poblaciones de *P. infestans* que en algunos lugares desplazaron a las existentes en pocos años (Spielman *et. al.*, 1991). Al parecer dichas poblaciones fueron introducidas mediante una migración, transportados por una embarcación de tubérculos de papa en 1976 (Nienderhauser, 1991). Consecuentemente las nuevas poblaciones se han expandido a otras regiones del mundo por medio del comercio (Fry *et. al.*, 2009).

México tiene la mayor diversidad genética de las poblaciones de *P. infestans* en el mundo, sobre todo en las partes altas del centro del país, en estados como México, Michoacán, Morelos y Tlaxcala, donde generalmente ocurren los dos tipos de compatibilidad en una proporción de 1:1 o cercanas a esta (Goodwin *et. al.*, 1992, Grünwald *et. al.*, 2005). En el Valle de Toluca se ha comprobado que las poblaciones son sexuales, dado que se han observado oosporas producidas de manera natural tanto en suelo (Fernández- Pavia *et. al.*, 2004), como sobre folíolos, tallos (Perches y Galindo, 1969) y tubérculos (Fernandez Pavia *et. al.*, 2004) de cultivos de papa, así como de especies silvestres de *Solanum* (Flier *et. al.*, 2003).

1.7. FISIOLÓGÍA DEL PARASITISMO DE *P. infestans* EN PAPA.

P. infestans inverna en forma de micelio en los tubérculos de papa infectados. Este micelio se propaga en los tejidos de los tubérculos de papa y por último llega a los retoños que se formaron a partir de los tubérculos infectados que se utilizan como semilla, así como a plantas desarrolladas a partir de tubérculos enfermos abandonados en el campo. El micelio se propaga

hasta el tallo de las plantas a nivel de la región cortical, dando como resultado la decoloración y el colapso de las células de esa zona. Más tarde el micelio se desarrolla entre las células medulares del tallo, pero rara vez se le encuentra en el sistema vascular. El micelio crece a través del tallo y llega a la superficie del suelo. Cuando el micelio alcanza las partes aéreas de las plantas, produce esporangioforos que emergen a través de los estomas de las hojas y del tallo y se proyectan al aire.

Los esporangios que se forman sobre los esporangioforos se desprenden y son diseminados por la lluvia o bien son llevados por las corrientes de aire cuando han llegado a la madurez. Al depositarse sobre las hojas o tallos húmedos de las plantas de papa, los esporangios germinan y producen nuevas infecciones. El tubo germinal penetra a la cutícula de la hoja o entra a través de un estoma y forma un micelio que crece profusamente entre las células y el cual envía largos haustorios enrollados hacia el interior de ellas. Las células en las que el micelio se nutre tarde o temprano mueren y, conforme empieza a degradarse, el micelio del hongo se propaga periféricamente en los tejidos carnosos de las hojas. Al cabo de unos cuantos días después de haberse producido la infección, emergen nuevos esporangioforos a través de los estomas de las hojas y producen numerosos esporangios que son diseminados por el viento e infectan a otras plantas. Conforme avanza la enfermedad, las lesiones previas continúan extendiéndose y aparecen otras de ellas, dando como resultado la muerte prematura del follaje de las plantas y una disminución proporcional en la producción de tubérculos de la papa (Figura 3) (Agrios, 2011).

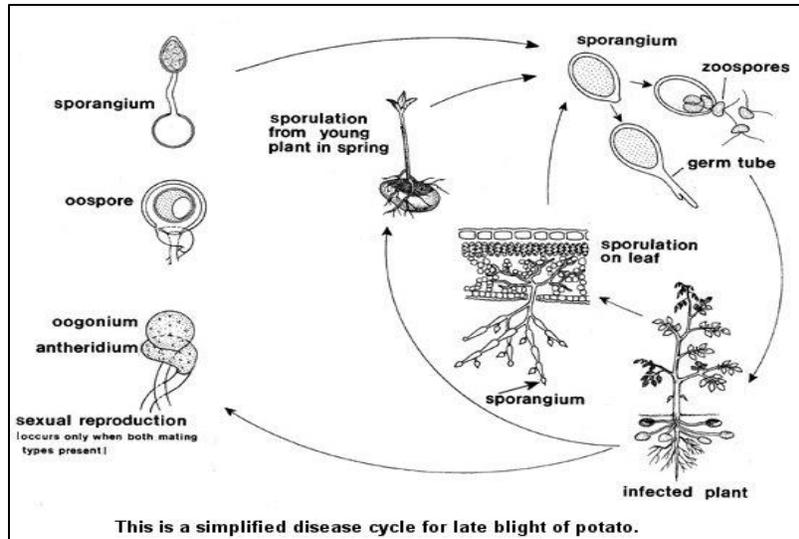


Figura 3. Ciclo de vida de *P. infestans* (Schumann and C.J. D'Arcy).

Cuando la planta hace frente al parasitismo del patógeno, la combinación de las características estructurales y reacciones bioquímicas que utilizan las plantas para defenderse de los patógenos difieren en las distintas interacciones hospedante-patógeno. Además, incluso al tratarse del mismo hospedante y patógeno, las combinaciones varían con la edad de la planta, el tipo de órganos y tejidos de esta al ser atacados y el estado nutricional de la planta así como las condiciones climáticas (Agrios, 2011).

Varios eventos celulares clave, como la adhesión a la superficie, la penetración y colonización del tejido hospedero, se llevan a cabo durante la infección de plantas por *P. infestans* manipulando los procesos bioquímicos y fisiológicos en sus plantas hospedero a través de una amplia gama de moléculas de virulencia o de avirulencia, conocidas como efectores. En plantas susceptibles, estos efectores promueven la infección por la supresión de las respuestas de defensa, mejorando la sensibilidad, o induce síntomas de la enfermedad. Alternativamente, en las plantas resistentes, efectores son reconocidos por los productos de genes de resistencia a las plantas (Figura 4), resultando en la muerte de la célula hospedero y las respuestas de defensa eficaces conocidos como la respuesta de hipersensibilidad (HR).

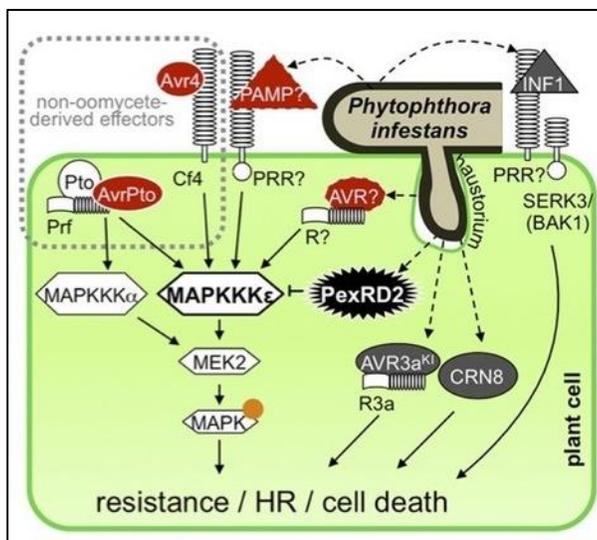


Figura 4. Respuesta bioquímica de la interacción de la planta con *P. infestans* (Stuart, *et. al.*, 2014).

En *Phytophthora*, la infección generalmente comienza cuando zoosporas móviles liberadas de esporangios alcanzan una hoja o superficie de la raíz, se enquistan, y germinan (Hardham, 2001), los tubos germinales se hinchan para formar apresorios o como estructuras que faciliten la adhesión y la penetración de la superficie de las plantas. Cuando infectan el tubérculo, la penetración puede ocurrir en entre las células sin la ayuda de un apresorio por las lenticelas.

No se sabe mucho acerca de los procesos de desarrollo que conducen a la formación de apresorios, Hardham propuso que la formación de apresorios puede ser consecuencia de la dificultad de que los esporofitos intenten penetrar superficies de las plantas. En otros estudios, se ha sugerido que una familia de genes llamada car codifican proteínas tipo mucina extracelular y son reguladas en la germinación de los quistes y apresorios poco antes de la penetración del tejido de la planta; estos podrían funcionar en la adhesión para comenzar la infección (Gornhardt, *et. al.*, 2000).

La penetración y colonización de tejido hospedero implica la secreción de una gama de enzimas degradativas que rompen las barreras físicas para llevar a cabo la infección (McIntyre y Hankin, 1978), de las que destacan cutinasas, proteasas, endo y exoglucanasas y quitinasas.

Finalmente a partir del estudio de biología molecular se ha descubierto que tan solo unos pocos genes que codifican enzimas degradativas de *Phytophthora* se han caracterizado en detalle, incluyendo genes que codifican las fosfolipasas, una β -glucosidasa / β -xilosidasa (Brunner, 2002), exo-1,3- β -glucanasas, una endo-1, 3- β -glucanasa , y endopoligalacturonasas (endo-PGs) (Gotesson, *et. al.*, 2002).

CAPITULO II: MODOS DE ACCIÓN DE LOS FUNGICIDAS Y DESARROLLO DE LA RESISTENCIA

RESUMEN

Los mecanismos de resistencia a fungicidas por los patógenos se producen debido a que la naturaleza de los químicos en especial los sistémicos tienen una acción específica, afectando a un evento o a dos del proceso metabólico genéticamente controlado por el hongo y como resultado puede surgir rápidamente una población resistente de ese patógeno, ya sea mediante mutación o por la selección de individuos resistentes.

Los mecanismos más comunes por los cuales los patógenos desarrollan resistencia a los fungicidas son por: una menor permeabilidad de sus membranas celulares al compuesto químico, detoxificación del químico por modificación de su estructura o por su unión a un componente celular, disminución en la conversión del compuesto tóxico real, disminución de la afinidad a nivel de sitio activo de la célula, desviación de una reacción bloqueada por un cambio en el metabolismo y amortiguamiento del efecto inhibitorio por la producción de una mayor cantidad del producto inhibido (enzimas).

Palabras clave: resistencia, fungicidas, sistémicos, metabolismo

CHAPTER II: MODES OF ACTION FUNGICIDES AND DEVELOPMENT OF RESISTANCE

ABSTRACT

The mechanisms of fungicide resistance against pathogens occur due to the chemical nature of the products, particularly the systemic ones, that have a specific action. These condition affects an event or two in the genetically controlled metabolic process by the fungus and this can quickly result in the emergence of a resistant population of the pathogen, either by mutation or by selection of resistant individuals. The most common mechanism by which pathogens become resistant to fungicides are often for the following reasons: a lower permeability of cell membranes to chemicals, detoxification due to chemical modification of the structure or by binding to a cellular component, decrease in the conversion of the actual toxic compound, decreased affinity at the level of the active site of the cell, a blocked reaction deviation due to a change in the metabolism and damping of the inhibitory effect by producing more of the inhibited product (enzymes).

Keywords: resistance, fungicides, systemic metabolism.

2.1. INTRODUCCIÓN

Dos tipos de fungicidas son utilizados para el control químico del tizón: los de contacto, presentando su acción directa afectando las estructuras del patógeno en la superficie de la planta, actuando en sus fases de germinación y penetración (Cuadro 1). Su acción será efectiva siempre que persistan en la hoja y no sean lavados por la lluvia, esta es una de las limitantes que presenta este tipo de fungicida, además del hecho que comúnmente el agricultor no realiza las aplicaciones debidamente por cuanto no cubre bien la planta, por desconocimiento de esta necesidad y por falta de tiempo, la eficacia de la acción de estos fungicidas es afectada en forma significativa. El otro tipo de fungicidas son los sistémicos, estos penetran en la planta y se movilizan traslaminarmente del haz al envés o viceversa y luego del punto donde cayeron hacia la parte superior de la planta es decir tienen un movimiento acropétalo (Figura 1) (Fernández-Northcote *et al.*, 1999).



Figura 1. Modo de acción de los fungicidas de contacto y sistémicos (Homo Agrícola, 2014).

2.2. FUNGICIDAS DE CONTACTO

2.2.1. CÚPRICOS

De los fungicidas de contacto Schwinn y Margot en 1991 reportan la acción de los fungicidas cúpricos (caldo bordelés, oxiclورو de cobre y óxido cuproso) en los esporangios y las zoosporas del patógeno en las que desnaturalizan enzimas de la cadena respiratoria, sin embargo presentan desventajas retrasando el desarrollo vegetativo de las plantas, por ese motivo es recomendable su aplicación hasta después de la floración.

2.2.2. DITIOCARBAMATOS

Los ditiocarbamatos (zineb- etileno y zinc, maneb- etileno manganeso, mancozeb – etileno, zinc y manganeso, metiram –etileno y zinc y propineb- propileno y zinc), son otro tipo de fungicidas de contacto también reportados en su modo de acción por Schwinn y Margot en 1991, durante la germinación de los esporangios y zoosporas, así como en el desarrollo micelial inactivando aminoácidos o procesos bioquímicos importantes que involucran enzimas con grupos tioles, a diferencia de los cúpricos, los ditiocarbamatos no son fitotóxicos por lo que pueden ser utilizados en cualquier etapa de desarrollo de la planta, pero son fácilmente lavados por la lluvia, son de bajo costo, sin embargo no son recomendables en zonas de tizón ya que tienen que realizarse aplicaciones frecuentes, Emmerman en 1996 y Jorgensen en el mismo año, reportan que el uso del maneb y el propineb son extremadamente tóxicos para la salud humana e incluso cancerígenos y en general con el medio ambiente, es por ese motivo que en países como Dinamarca y Suecia han sido suspendidos.

2.2.3. PHTALIMIDAS

Las Phtalimidias (Folpet, captafol y captan) ejercen su modo de acción en la superficie de las hojas afectando la movilidad de las zoosporas y su germinación reaccionando con grupos tioles que llevan a una serie de efectos bioquímicos no específicos que afectan la efectividad enzimática (Schwinn y Margot, 1991).

Phtalonitrilos (clorotalonil), ejerciendo su modo de acción en las células fungosas atrapando al glutatión libre, previniendo la activación (reducción) de la gliceroaldehido-3-fosfato dehidrogenasa y quizá otras enzimas generales (ISK-Biotech, 1990).

Piridineaminas (Fluazinam) inhibiendo la germinación de esporas, la formación de apresorios, la penetración y el crecimiento de hifas, así como la esporulación, Guo et al., en 1990 lo reportan como un desacoplador potente en la fosforilación oxidativa inhibiendo la transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial.

2.2.4. ESTÁÑICOS

Los compuestos estáñicos (trifenilestaño acetato y trifenilestaño hidróxido) son la última clase de fungicidas de contacto reportados y que son efectivos para el control del tizón, actúan sobre las esporas e hifas afectando la fosforilación oxidativa (Schwinn y Margot, 1991), sin embargo presentan fitotoxicidad hacia el final en el desarrollo del cultivo, además la Comunidad Europea los consideran como productos químicos que deben ser prohibidos porque contaminan los mantos freáticos (The Pesticides Trust, 1994).

2.3 FUNGICIDAS SISTÉMICOS

2.3.1. FOSFONATOS

Solo uno de los fungicidas sistémicos que se utilizan en el control del tizón, el fosetil-aluminio se moviliza también en dirección basipétala, es decir de donde penetra hacia la parte inferior de la planta. En el caso de los fungicidas sistémicos una aplicación constante y uniforme no es tan importante como en los fungicidas de contacto, luego de su aplicación el fungicida sistémico penetra en la planta y luego se moviliza acropetalamente aun hacia partes de la planta no alcanzadas por la aplicación. El intervalo entre aplicaciones puede ser distanciado y el fungicida no es lavado por las lluvias poco después de su aplicación, esta es una gran ventaja de los fungicidas sistémicos sobre los fungicidas de contacto especialmente en las zonas muy favorables al tizón, las desventajas son su mayor costo y la selección e incremento de resistencia en el patógeno cuando se les utiliza inapropiadamente.

Los Fosfitos (Fosetil-alumino) es el único fungicida sistémico que posee movimiento acropétalo y basipetalo, presenta una doble acción ya que además de ser un fungicida cuyo modo de acción es la de inhibición de la germinación de las esporas o bloqueando el desarrollo del micelio o incluso la esporulación, Gómez y Reis en el 2011, describen al fosetil aluminio como fungicida explicar su influencia en la fosforilación enzimática del patógeno, también actúa indirectamente activando mecanismos de defensa propios de la planta de papa, finalmente tiene una larga persistencia, lo que permite alargar el intervalo entre aplicaciones (Agrios, 2011).

2.3.2. CIANOACETAMIDAS

En cuanto a los fungicidas sistémicos para el control del tizón, son importantes los compuestos químicos Cianoacetamida-oximas (cimoxanil), Ziogas *et al.*, en 1987, reportan su

modo de acción sobre el patógeno afectando la síntesis de ADN y en menor grado la de ARN, este fungicida presenta la peculiaridad de presentar un movimiento de tipo traslaminar sin movimiento acropetal, su persistencia en la planta está limitada a unos pocos días por lo que su aplicación apropiada es similar a los fungicidas de contacto.

2.3.3. CARBAMATOS

Los carbamatos (Propanocarb) no presentan efectividad en plantas ya infectadas y no ejerce control cuando incluso tienen tres días de infectadas (Samoucha y Cohen, 1990). Sin embargo, Papavizas *et al.*, en 1978, encontraron que tiene poca acción en la germinación del esporangio, actúa sobre el micelio joven afectando la permeabilidad de la membrana celular, pero no es efectivo cuando el micelio ya está desarrollado.

2.3.4. DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO

Otro de los fungicidas sistémicos para el control del tizón son los derivados del ácido cinámico (dimetomorf) Leroux, *et al.*, en 1993, lo reportan como una buena opción, ya que se considera de bajo riesgo en cuanto a promotor de desarrollo de resistencia del patógeno, este fungicida es traslaminar con actividad anti esporulante que previene la producción de esporangios y oosporas, los derivados de ácido cinámico también afectan la formación de la pared celular promoviendo su lisis y la muerte de la célula.

2.3.5. FENILAMIDAS

El último tipo de fungicida sistémico utilizado en el manejo del tizón es el compuesto químico perteneciente al grupo de las fenilamidas (Metalaxil, azoxistrobin, ofurace, benalaxil y oxadixil).

Este grupo es altamente sistémico con traslocación hacia arriba o hacia abajo, pues el tratamiento al follaje da buena protección a los tubérculos, posiblemente por la traslocación del ingrediente activo, el metalaxil además es menos susceptible de ser lavado por las lluvias (Egan *et al.*, 1995).

El Metalaxil tiene poco efecto en la germinación del esporangio o de las zoosporas o en la movilidad de las zoosporas. La penetración y la formación de haustorios en la planta de papa no son afectadas, el metalaxil ejerce su efecto fungitóxico solo en el interior de la planta (Staubs *et al.*, 1980). Las fenilamidas inhiben severamente la esporulación y en grado menor el desarrollo del micelio (Bruck *et al.*, 1980), interfieren en la síntesis de ARN inhibiendo la enzima RNA polimerasa, la síntesis de ARN ribosomal y por ende la síntesis de proteínas y reducción del crecimiento del micelio, más que las zoosporas, las cuales pueden ser controladas por un fungicida de contacto como mancozeb, antes de penetrar al tejido, condición que se aprovechó en Inglaterra para mejorar el control del tizón en hojas viejas y el control a la par de *Alternaria solani* (Nunninger *et al.*, 1995). La mejor redistribución y la mayor persistencia de las fenilamidas en las plantas se logra en las plantas jóvenes de crecimiento activo. Entre los pesticidas evaluados por la EPA oxadixil figura como posible cancerígeno en humanos (The pesticides trust, 1994).

2.3.6. MADELAMIDAS

Pertenecen al grupo de las madelamidas, dentro del grupo de las amidas del ácido carboxílico, su modo de acción corresponde a la inhibición de la síntesis de la celulosa de la pared celular a nivel de la proteína PiCesA3 celulosa sintetasa, de esta manera es posible que tanto los esporangios como las zoosporas germinen, se ha registrado que existe inhibición de la formación de haustorios y de micelio (Blum, *et al.*, 2010, Cohen *et al.*, 2007).

Cuadro1. Clasificación de los fungicidas utilizados en el manejo de *Phytophthora infestans* de acuerdo a su modo de acción.

Fungicidas	Modo de acción	Efectos en el patógeno
Cúpricos	Contacto	Desnaturalización de enzimas de la cadena respiratoria, en esporangios y zoosporas.
Ditiocarbamatos	Contacto	Inactiva aminoácidos y enzimas, evita germinación de esporangios y zoosporas y desarrollo micelial.
Phtalimidas	Contacto	Afecta actividad enzimática, es un desacoplador de la fosforilación oxidativa inhibiendo la transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial. Reduce movilidad de zoosporas y su germinación, formación de apresorios, crecimiento de hifas.
Estañicos	Contacto	Afectan la fosforilación oxidativa inhibiendo la germinación de esporas y desarrollo de hifas.
Fosfonatos	Sistémico	Penetra a la planta y se moviliza en dirección basipétala y acropetala. El modo de acción como fungicida se basa en la influencia de la fosforilación enzimática del patógeno afectando síntesis de diferentes compuestos que contienen fosforo en la planta.
Cianoacetamidas	Sistémico	Presenta movimiento traslaminar en la planta, afecta síntesis de ADN y ARN en el patógeno.
Carbamatos	Sistémico	Posee poca acción en la inhibición de la germinación del esporangio, afecta la permeabilidad de la membrana celular del micelio.

Fungicidas	Modo de acción	Efectos en el patógeno
Derivados del ácido cinámico	Sistémico	De acción traslaminar, afecta la formación de la pared celular promoviendo la lisis del patógeno.
Fenilamidas	Sistémico	Se trasloca por la planta, su acción se ejerce solo en el interior de la planta inhibiendo la esporulación y en menor grado el desarrollo del micelio, interfiere en la síntesis de RNA ribosomal y síntesis de proteínas del patógeno.
Madelamidas	Sistémico	Inhiben síntesis de celulosa de la pared celular del patógeno, así como la formación de haustorios.

2.4. RESISTENCIA A METALAXIL DESARROLLADA EN *Phytophthora infestans*

MONT. DE BARY

Davidse *et al.*, 1981 y Dowley y O' Sullivan en 1985, mencionan que su introducción fue en 1977 y que al principio se creó una gran expectativa al mostrar una acción post-infeccional y actividad sobresaliente bajo condiciones muy favorables para la enfermedad, esto provocó el uso extensivo e intensivo del metalaxil como único fungicida en el control del tizón, esta situación especial creó una presión para la aparición de variantes de *P. infestans*, a los tres años de su introducción, la rápida generación de resistencia del patógeno a este producto, obligó a su retiro del mercado por algún tiempo, en varios países de Europa como Suiza, Irlanda y Holanda, donde fue nuevamente reintroducido en forma de mezclas con productos de contacto y otros sistémicos, ya que a los cuatro o cinco años las poblaciones de *P. infestans* se vuelven nuevamente susceptibles al producto.

En Holanda en 1980 la resistencia a fenilamidas en las poblaciones de *P. infestans* era del 77% de los aislamientos y decreció en la medida que el producto fue retirado del mercado. En 1984 se aplicó en mezcla con mancozeb y luego se hicieron mezclas con maneb y fentinacetatos, con un manejo limitado, pues solo se recomendaba y se recomienda hacer dos aplicaciones por ciclo del cultivo en situaciones críticas para el manejo de epidemias severas, pero se debe evitar las aplicaciones en estado avanzado de la enfermedad (Davidse *et al.*, 1981).

Posteriormente para 1985 Wade y Delp reportan el uso del metalaxil en mezclas con otras fenilamidas para el control efectivo y eficiente y estable del tizón, Según Grohman y Hoffman en 1989, el Metalaxil estimula la formación de fitoalexinas capsidiol en el chile (*Capsicum annum*) y glyceolina en soya (*Glicine sojajae*), pero no se observaron cambios ultraestructurales en las hojas de la papa, después de ser tratados con dosis de 10, 100 y 200 µg/ml, lo que indica un efecto secundario sobre los mecanismos de defensa de las plantas.

En 1990, un nuevo trabajo por Doster, Milgroom y Fry, mediante un estudio computacional en donde predicen el efecto de la mezcla de metalaxy-clorotalonil, dan como resultado simulando las aplicaciones, menos enfermedad causada tanto por cepas sensibles o resistentes al metalaxil, ellos concluyen que entre menor sea el número de aplicaciones, será mejorado sustancialmente el control del patógeno resistente al metalaxil.

El uso de mezclas en este momento, resulto ser lo más eficiente y conveniente, sin embargo en 1995, un nuevo reporte por Nuninger *et al.* y Dowley y O' Sullivan, encuentran que estas mezclas ya no son tan eficientes ya que descubren que de las variantes estudiadas de *P. infestans* presentan resistencia a las fenilamidas de un 30% a un 50%.

A pesar del uso de mezclas, en países como Estados Unidos de Norteamérica, se prefería en parcelas comerciales, el uso de metalaxil, es así que en Washington en 1990 se presentaron

brotos de tizón tardío en campos comerciales de papa, que después alcanzaron niveles de epidemia en donde se habían recibido de 2 a 4 aplicaciones de metalaxil , al final de la temporada, existía la posibilidad que las razas patogénicas de *Phytophthora infestans* hubieran desarrollado resistencia a este fungicida sistémico, al comprobar esta teoría, pudieron determinar la virulencia de los aislamientos sobre folíolos desprendidos de ocho genotipos diferenciales (gen-R) de papa. Si bien se recobraron sólo razas simples (solas y dobles), hubo también una alta frecuencia de combinaciones complejas de razas. Cuando se probaron en medios con adición de metalaxil que contenía una alta dosis de $10\text{g}/\text{cm}^3$, 81% de los 73 aislamientos obtenidos de los tejidos afectados, fueron altamente resistentes, 19% mostraron resistencia intermedia. No se obtuvieron aislamientos sensibles, 55% de 40 aislamientos esporularon sobre discos de tubérculos de papa en presencia de metalaxil, 20 de los aislamientos en un porcentaje del 85% sobre tejidos de hojas, finalmente se observó que el 50% de los aislamientos esporularon a una alta dosis de $100\text{ g}/\text{cm}^3$ (Deahl, *et. al.*, 1993).

En 1994, en México, Matuszak, Fernandez y Villarreal (1994) reportaron la sensibilidad de *P. infestans* al metalaxil de siete localidades en los estados de Chiapas, Coahuila, Estado de México, Michoacán, Sinaloa, Puebla y Veracruz, en donde se determinó *in vitro* la sensibilidad para 966 aislamientos colectados en cultivos con tratamientos de metalaxil entre los años de 1983 a 1989, como resultados se reporta que el Estado de México (área principal de producción de papa), la frecuencia de los aislamientos sensibles al metalaxil fue más alta en 1983, 1984 y 1986 que en 1987, 1988 y 1989, la frecuencia de los aislamientos sensibles permaneció estable durante epidemias sobre papas sin tratamiento que se muestrearon repetidamente durante 1988 en el Valle de Toluca al oeste del Estado de México.

Un estudio similar, fue realizado por Goodwin, Sujkowski y Fri en 1995, en donde fue utilizando metalaxil (Ridomil) como control de *P. infestans*, ellos colectaron de muchas regiones de Norteamérica entre los años de 1987 a 1993, en 15 estados y en British Columbia en Canadá aislamientos de este patógeno y se determinó por estudios *in vitro* que 13 de 15 de los aislamientos colectados en British Columbia de los años 1992 y 1993, presentaban resistencia al metalaxil. En este nuevo estudio, además de utilizar cultivos *in vitro*, se utilizaron con fines de determinar la sensibilidad al metalaxil, allozyme genotype y análisis DNA fingerprint, detectando además de la sensibilidad que existía un linaje clonal US-1 presente en Estados Unidos y en Canadá por varios años y que presentaba sensibilidad uniforme, otros aislamientos clonales detectados fueron llamados: US-7 y US-8 con resistencia a metalaxil, un último aislamiento clonal US-6 fue detectado en California en 1990 totalmente resistente al metalaxil, sin embargo presentaba una peculiaridad: el aislamiento US-6 presentaba polimorfismo no determinado. Estos hechos presentaron para los investigadores nuevas herramientas para determinar que los aislamientos resistentes a metalaxil, se distribuyeron unimodalmente en linajes clonales y que se limitaron a los que recientemente habían emigrado. Esto apoyaba a su hipótesis la cual vislumbraba que la resistencia en Estados Unidos y Canadá se originó por inmigración, más que por mutación y la selección después de la migración, sin embargo este estudio está limitado, ya que las pruebas para la selección de mutantes resistentes a metalaxil en linajes clonales se detectó en una muestra limitada de aislamientos. Al respecto Shattock (1988) considera que no hay claridad en los mecanismos por los cuales surge la resistencia de *P. infestans* al metalaxil, dado que es un patógeno diploide.

Diferentes estudios han mostrado que aunque la frecuencia de las variantes resistentes a las fenilamidas aumente durante una campaña en la magnitud de la presión que se ejerza para su

selección, la frecuencia disminuye al inicio de la siguiente campaña debido probablemente a una menor capacidad de supervivencia en comparación con las variantes no resistentes a las fenilamidas (Williams y Gisi, 1992).

2.5. MATERIALES Y MÉTODOS

2.5.1. COLECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *P. infestans* Y LECTURAS DE INFECCIÓN

En el verano del 2011, en Chapingo Edo. de México, se estableció una parcela de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad snowden, cuyo diseño experimental consistió en cinco unidades experimentales con una repetición a las que se les aplicó semanalmente a partir de 45 días después de la siembra, media dosis de cinco fungicidas en aspersión foliar en el siguiente orden: metalaxil, fosetil aluminio, mandipropamid, propamocarb y ciazofamida; cabe señalar que se sembró una sexta parcela sin protección química como testigo. A partir de la primera semana después de la aplicación de los fungicidas y hasta la quinta semana, fueron tomadas lecturas de infección semanales de acuerdo a la escala de Henfling (1987) y se colectaron muestras de hojas y tallos elegidos totalmente al azar de cada uno de los tratamientos que tenían signos y síntomas recientes, estas fueron llevadas al laboratorio de usos múltiples del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo y fueron sometidas a cámaras húmedas a temperatura ambiente durante 24 horas para inducir la formación de esporangios; al observar la formación de estos, las hojas y tallos con signos más desarrollados fueron colocados debajo de rebanadas de papa previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 20%, al transcurso de cinco días se pudieron observar crecimientos miceliales que atravesaban las rebanadas de papa; al percibir este crecimiento y con ayuda de una aguja de disección fue retirado este micelio y sembrado en medio centeno agar según la metodología descrita por Garay Serrano en el 2005, pero adicionado con el antibiótico oxitetraciclina para evitar el desarrollo de bacterias gram positivas y gram negativas; después fueron conservados en una incubadora en oscuridad a una temperatura constante de 17°C, al transcurso de una semana se observó el desarrollo de múltiples colonias del patógeno.

En el siguiente ciclo de cultivo (verano del 2012), se estableció en lotes de 14 surcos de 30 metros en el mismo terreno otro ensayo en un diseño experimental en bloques completos al azar con dos variedades de papa: Agata y Fiana y se aplicó semanalmente durante cinco semanas desde 45 días después de la siembra, los mismos fungicidas, esta vez, aplicando medias dosis y dosis completas, agregando al ensayo dos tratamientos más: fluoxastrobin y azoxistrobin. Simultáneamente a las aplicaciones, se tomaron lecturas de infección semanales de acuerdo a la escala de Henfling (1987) y se siguió la misma metodología para la obtención de colonias del patógeno que en el verano del 2011.

Al final de cada ciclo se consideró la comparación de medias de la última lectura, en un diseño completamente al azar, en donde un individuo era la parcela útil y las diez lecturas fueron las repeticiones. Se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC, siglas en inglés) de acuerdo con Shaner y Finney (1977) y a Campbell y Madden (1990), usando la fórmula:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i - y_{i+1} + 1}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde, el valor final del AUDPC es la sumatoria de las áreas por lapsos, que resultan de la multiplicación del promedio de lecturas de dos fechas consecutivas (valor de y) por el lapso (días, valor de t) entre lecturas.

2.5.2. DETERMINACIÓN DE TIPOS DE COMPATIBILIDAD

Al término de la obtención de aislamientos de *P. infestans* de cada uno de los ciclos de cultivo y para determinar los tipos de compatibilidad presentes en el verano del 2011 y 2012; cada uno de los aislamientos se sembró en un extremo de una caja de Petri que contenía medio centeno

agar; en la misma caja, se sembró un aislamiento con un aislado de referencia conocido como J104 (A1) y en otra repetición con el aislado de referencia J204 (A2), amablemente proporcionados por la Dra. Sylvia P. Fernández Pavía, (UMSNH) a manera de enfrentamiento *in vitro* y mantenidos a una temperatura de 17°C en oscuridad. Al término de una semana, los crecimientos coloniales enfrentados en cada una de las cajas de Petri se encontraron, desarrollándose estructuras de reproducción sexual (oogonios, anteridios y oosporas). La presencia de oosporas se interpretó como que el aislamiento desconocido era de un grupo de compatibilidad opuesto al del enfrentamiento. La presencia de oosporas al enfrentar el aislamiento con ambos tipos de compatibilidad conocidos, o sin el enfrentamiento, se interpretó como homotálico (H).

2.5.3. EVALUACIÓN *in vitro*

Para evaluar si los aislamientos obtenidos en el verano del 2011 y 2012 presentaban resistencia o sensibilidad a las sustancias químicas evaluadas en el campo, se llevó a cabo un ensayo de resistencia *in vitro*, utilizando la metodología empleada por Shattock (1988) y Deahl y Demuth (1995) la cual consistió en la inoculación de medios selectivos de centeno agar adicionados de micro concentraciones de fungicidas (0.1 mgL^{-1} y 10 mgL^{-1}) con fragmentos miceliales del oomiceto aislado en los dos ciclos de cultivo, Sozzi, *et. al.*, 1992 y Manriquez en 1995 consideran el rango mínimo para determinar sensibilidad de metalaxil en 0.1 mgL^{-1} , mientras que Locher y Lorenz en 1991 en pruebas de sensibilidad *in vitro* con las sustancias activas fluazinam, fosetil aluminio y propamocarb consideran un rango de 0.1 mgL^{-1} a 100 mgL^{-1} , Rekanović y colaboradores en el 2011 al probar las mismas sustancias activas, muestran que en una concentración de 10 mgL^{-1} es posible determinar la sensibilidad o resistencia del patógeno, es por ese motivo que al realizarse pruebas previas con los aislamientos del 2011 y

2012 de Chapingo Edo. de México, se determinó utilizar la dosis mínima de Shattock de 1988 y Deahl y Demuth de 1993 y la dosis máxima de 10 mgL⁻¹ como Rekanović y colaboradores en 2011. El crecimiento in vitro de cada aislamiento fue medido después de un periodo de incubación de 10 días a 17°C y el resultado fue evaluado utilizando la siguiente ecuación:

$$PC = \frac{DMCM - 5 \text{ mm}}{DMCA} \times 100$$

Donde PC = porcentaje de crecimiento; DMCM = diámetro medio colonia, 5 mm = diámetro del cilindro con micelio sembrado originalmente al centro de la caja petri; y DMCA = diámetro del crecimiento del testigo sin fungidas. El criterio empleado por Shattock (1988) y Deahl *et al.*, (1995b) califica como resistentes a metalaxil a los aislamientos con porcentaje de crecimiento igual o mayor a 60%, intermedios de 10% a 60%, y como susceptibles a aquellos con un porcentaje de crecimiento radial menor al 10%. La comparación por categorías se hizo en un diseño completamente al azar (SAS System for Windows 9.0 SAS Institute Inc. 2002).

2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.6.1. AISLAMIENTOS Y PROGRESO DE LA CURVA DE LA ENFERMEDAD

Los números de lecturas de infección tuvieron una semana de desfase con respecto a la aplicación de los productos. Así, la primera lectura correspondió a la segunda semana de aspersión, la quinta lectura fue a la sexta semana después de la primera aspersión, y la sexta y última lectura se hizo dos semanas después de la quinta (y última) aplicación de los productos.

En el ciclo 2011 se obtuvieron 29 aislamientos, todos del tipo de compatibilidad A1. Del 2012 se lograron 164, todos homotáticos (Cuadro 2). El grupo o tipo de apareamiento A1 es el más abundante en la naturaleza, es el que se dispersó por el mundo a mediados del siglo XIX, pero está limitado genéticamente, por lo que tiende a conservarse clonalmente, sin mucha variación. Considerando la ausencia de presión de selección en la zona previa a los ensayos por no haber cultivos comerciales de papa, era de esperarse que la población de *P. infestans* fuera silvestre, predominando el tipo de compatibilidad mencionado y poca infección en los tratamientos con los agroquímicos, razón por la que se obtuvieron pocos en el 2011. Para el siguiente año todos fueron homotáticos, incluyendo al testigo, como evidencia de la presencia de estos tipos que afloraría como consecuencia de la situación del año anterior, pues ambos ensayos se establecieron en los mismos lotes los dos años consecutivos. El carácter homotático se reportó en Chapingo (Alarcón Rodríguez *et al.*, 2013) y en el valle de Toluca (López-Orona *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Número de aislamientos () y tipo de compatibilidad (A1, A2) por año.

Principio activo	Número de aislamientos y tipo de compatibilidad	
	2011	2012
Metalaxil	3 A1	52 H †
fosetil aluminio	3 A1	21 H
mandipropamid	5 A1	19 H
Ciazofamida	7 A1	11 H
Propamocarb	6 A1	
Azoxistrobin		2 H
Fluoxistrobin		29 H
Testigo	5 A1	30 H
Total	29 A1	164 H

† H, homotático

2.6.2. PORCENTAJE DE INFECCIÓN

El 100% de infección, o la totalidad del follaje infectado, se detectó en el testigo sin protección, a la quinta lectura, o sea, a las seis semanas después de la primera aplicación de los fungicidas en los dos ciclos de cultivo en dosis medias y completas. En el 2011, los tratamientos que mostraron mayor protección fueron: mandipropamid y metalaxil, con un 22 y 39 % de infección respectivamente, que se reflejó directamente en el valor del AUDPC (44 y 99, respectivamente, Figura 2 a, Cuadro 3). En el 2012 el tratamiento con mayor protección con medias dosis, en la variedad Agatha fue azoxistrobin con 16.5 % y fluoxistrobin con 31.75%. En la variedad Fiana con medias dosis, el mejor tratamiento fue con mandipropamid, con 6.85% y

azoxistrobin con 18.75% de infección final, el resto de los fungicidas permitió mayor infección el segundo año con respecto al primero (Figura 2 a, b, Cuadro 3). Esto pudiera deberse a la presión de selección de los productos sobre el patógeno durante el ciclo anterior, además, en este segundo año toda la población de *P. infstans* fue homotática, lo que sugiere que el patógeno podría poseer mayor variabilidad genética que durante el año previo.

Cuadro 3. Comparación de medias de la última lectura de la infección foliar de aplicación de medias dosis y área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

	Última lectura 2011	AUDPC 2011	Última lectura Agatha media dosis 2012	AUDPC 2012	Ultima lectura Fiana media dosis 2012	AUDPC 2012
Tratamiento						
Metalaxil	39.0 c†	99	84.5 b	149.5	93.50 a	195
Fosetil-Al	83.2 b	185	94.5 ab	229.5	96.75 a	190
Mandipropamid	22.0 d	44	39 d	40	6.85 d	2.5
Propamocarb	78.5 b					
Ciazofamida	99.5 a	231	71.25 c	150	93.50 a	285
Azoxistrobin			16.5 e	10	18.75 c	20
Fluoxistrobin			31.75 d	65	31 b	96
Testigo	100.0 a	265	100.0 a	225.25	100 a	135
†Cifras con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).						

PORCENTAJE DE INFECCIÓN

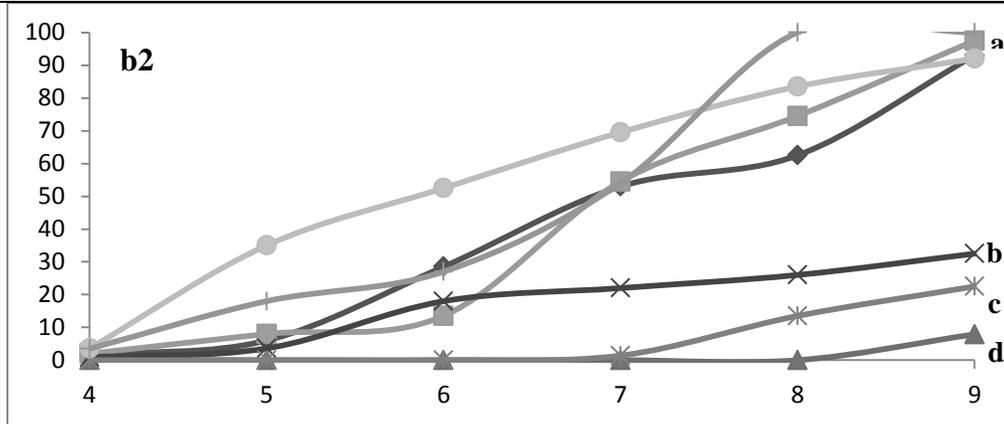
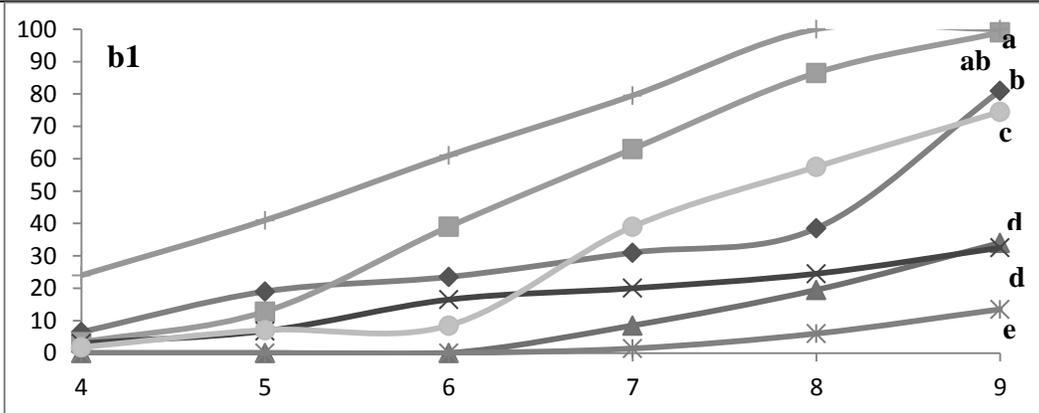
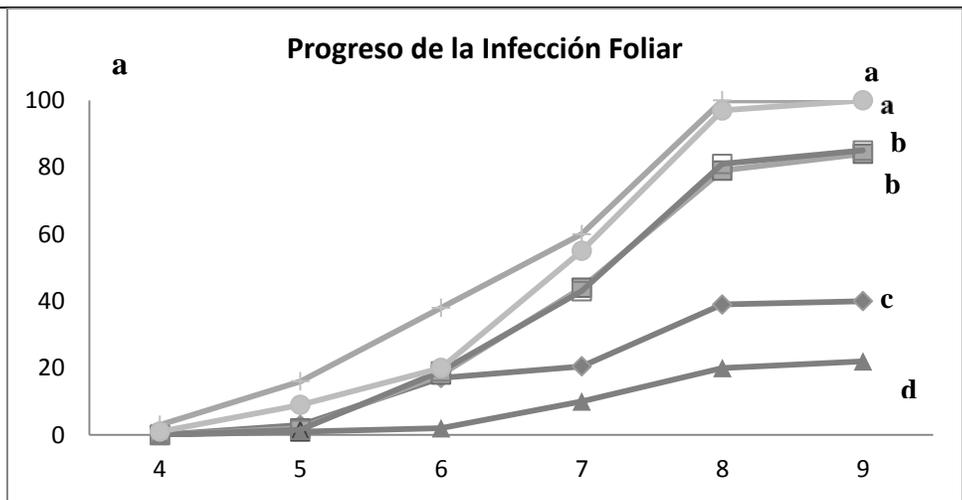


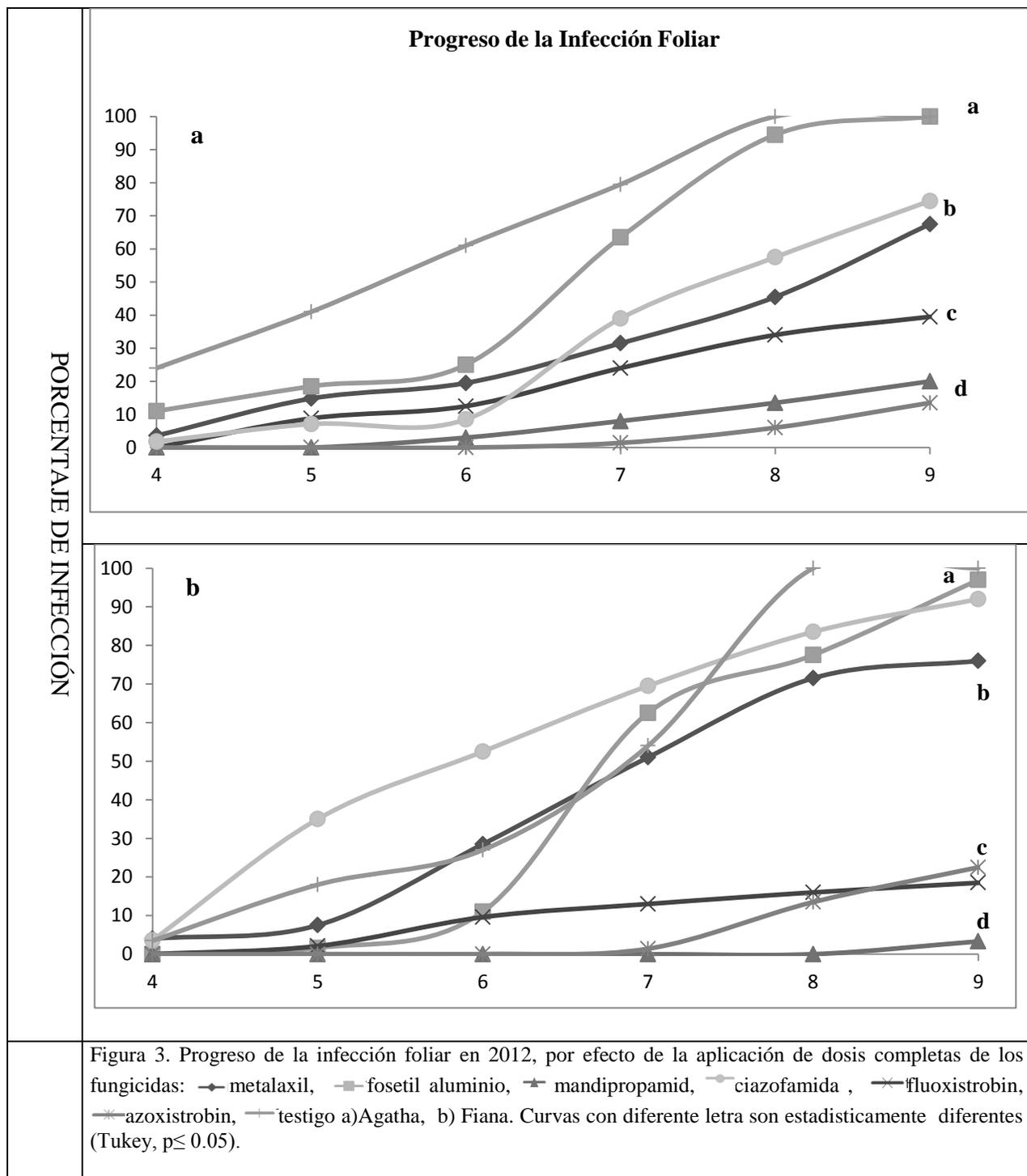
Figura 2. Progreso de la infección foliar, por efecto de la aplicación de media dosis de los fungicidas:
 —◆— metalaxil, —■— fosetil aluminio, —▲— mandipropamid, —●— ciazofamida, —□— propamocarb,
 —×— fluoxistrobin, —*— azoxistrobin, —+— testigo : a) verano de 2011, b) medias dosis 2012,
 1) Agatha, 2) Fiana. Curvas con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En dosis completas, se encontró que en la variedad Agatha, el mejor tratamiento empleado fue el de azoxistrobin con 16.5% de infección final, mientras que en la variedad Fiana, el mejor tratamiento fue el de mandipropamid con 3.25% de infección final (Figura 2 a y b, cuadro 3).

Cuadro 4. Comparación de medias de la última lectura de la infección foliar de aplicación de dosis completas y área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

	Última lectura Agatha dosis completa 2012	AUDPC 2012 Agatha	Última lectura Fiana dosis completa 2012	AUDPC 2012 Fiana
Tratamiento				
Metalaxil	60.75 b	130	74.25 b	190.5
Fosetil-Al	100 a	260	96.50 a	195.5
Mandipropamid	22.50 d	22.5	3.25 d	1.5
Ciazofamida	71.25 b	147	93.50 a	287.5
Azoxistrobin	16.50 d	10	18.75 c	21.5
Fluoxistrobin	39.75 c	82.5	16.50 c	48.5
Testigo	100 a	242.5	100 a	142.5

†Cifras con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



2.6.3. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS RESISTENTES, MEDIANAMENTE RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES *in vitro*

En los experimentos *in vitro* los aislamientos crecieron sobre agar centeno con 0.1 mgL⁻¹ y 10 mgL⁻¹ de los principios activos. Estas dosis se definieron en función de reportes de Shattock (1988), Deahl *et al.* (1995 a), Sozzi *et al.* (1992), Manriquez (1995), Locher y Lorentz (1991) y Rekanović *et al.* (2011) que muestran colonias con crecimiento de 2 a 100% con respecto a los testigos.

El mayor porcentaje de aislamientos resistentes *in vitro* en el 2011 correspondió a los expuestos a 0.1 mgL⁻¹ de fosetil aluminio con el 62.85% de la población expuesta. El 51.42% de los aislamientos expuestos a metalaxil, y el 37.14% de los que crecieron en medio con fosetil-Al, resultaron con resistencia intermedia ese año. Finalmente, las poblaciones que resultaron totalmente susceptibles fueron las expuestas a mandipropamid. No obstante, el esquema cambió para el siguiente año, pues en el 2012, con la misma concentración, afloró el 19.29% de la población resistente y el 49.12% intermedia para mandipropamid, 14% y 7% intermedia y resistente, respectivamente, para fosetil-Al, y el 100% de los aislamientos expuestos al metalaxil y a ciazofamida fue susceptible (Figura 4a).

Al exponer al patógeno a 10 mgL⁻¹, casi no se registró resistencia a los productos en ambos años, pero el 88% y el 46% de los aislamientos fue intermedio para fosetil-Al en 2011 y 2012, respectivamente, así como el 39% de los expuestos a mandipropamid en 2012. Los aislamientos en donde la totalidad de la población fue susceptible fueron los expuestos a mandipropamid y ciazofamida en 2011 y a metalaxil y ciazofamida en 2012. También en el 2011, el 94% de los aislamientos fueron susceptibles a metalaxil (Figura 3b). Páez *et al.*, en el 2001, Gissi *et al.*, en

el 2002 y Deahl *et. al.* (1995b), encontraron niveles de resistencia a metalaxil entre el 40% y 60% de los aislamientos debido en gran medida a la presencia de ambos tipos de apareamiento (A1 y A2), y a la alta presión de selección cuando se utiliza como único medio de control químico al metalaxil. Sin embargo, en Chapingo la totalidad de la población en el segundo año resultó resistencia a metalaxil vía reproducción sexual (Sattock, 1988).

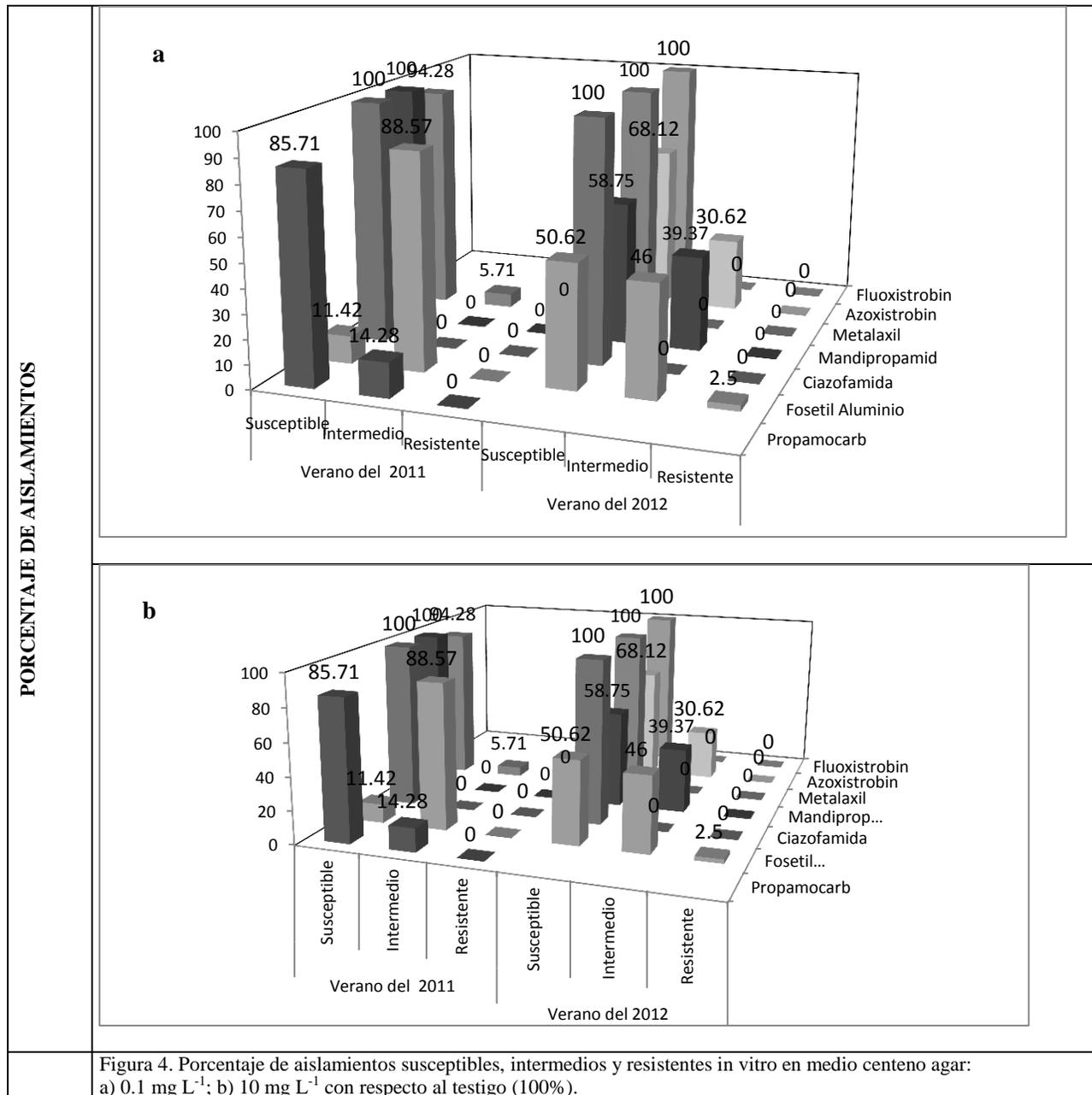


Figura 4. Porcentaje de aislamientos susceptibles, intermedios y resistentes in vitro en medio centeno agar: a) 0.1 mg L⁻¹; b) 10 mg L⁻¹ con respecto al testigo (100%).

Fosetil aluminio controla a la mayoría de los oomycetos excepto *P. infestans* (Cohen *et al.*, 1995; Gisi *et al.*, 2002). En el caso del control químico de la marchitez del tomate fue más eficaz cuando se aplicó de manera preventiva con respecto a la acción curativa, ya que en la planta genera la producción de enzimas que inducen mecanismos de defensa. El modo de acción como fungicida se basa en la influencia de la fosforilación enzimática del patógeno afectando síntesis de diferentes compuestos que contienen fósforo esencial para el crecimiento y desarrollo de *P. infestans* (Gómez y Reis, 2011). A pesar de este modo de acción fungicida, en nuestros ensayos se corroboró el mismo resultado de Cohen *et al.* (1995) y Gisi *et al.* (2002), con un considerable número de aislamientos resistentes e intermedios, e incluso no fue tan efectivo el tratamiento en el campo.

Con respecto a los aislamientos expuestos a ciazofamida en campo e *in vitro*, la totalidad de los aislamientos fue susceptible en ambos ciclos de cultivo. El modo de acción como fungicida es fundamental para no desarrollar resistencia en el patógeno, ya que está relacionado con la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, en la reducción de ubiquinona (Qi) y la oxidación del ubiquinol (Qo) en el citocromo b (Temperli, *et al.*, 1990), con disminución de ATP. La ciazofamida limita la movilidad de las zoosporas, así como la germinación de esporangios y la formación de oosporas (Ziogas, *et al.*, 2006).

El mejor tratamiento en el campo fue mandipropamid, con consistencia de control del patógeno en ambos años, pero los estudios *in vitro* no arrojaron los mismos resultados, pues aunque todas las poblaciones fueron susceptibles al producto *in vitro* el primer año, afloraron poblaciones intermedias y resistentes a este producto en el laboratorio para el año siguiente. El resto de los productos mostró inconsistencias en las curvas de avance de la enfermedad en el campo de un año a otro. Metalaxil, por ejemplo, permitió una infección del 39% en un año y

87% en otro, además, hubo infección casi total en el tratamiento con ciazofamida el primer año y en el de fosetil aluminio el segundo. Esto se reflejó de igual manera en los ensayos *in vitro*, en donde las poblaciones expuestas a ciazofamida fueron consistentemente las más susceptibles, sin afloramiento de resistencia, que sería justo lo opuesto a lo que se esperaría cuando en el campo este producto no controló la enfermedad, pero con fosetil aluminio, que tampoco controló al tizón en el campo en ambos años, si hubo poblaciones del oomiceto intermedias y resistentes *in vitro*.

2.6.4. CORRELACIONES Y TIPOS DE COMPATIBILIDAD ENTRE LOS AISLAMIENTOS Y LAS SUBSTANCIAS QUÍMICAS ANALIZADAS.

Los datos analizados entre las sustancias activas y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de *P. infestans* mostró que con la concentración de 0.1 mg L⁻¹ no existe asociación o resistencia significativa entre los fungicidas utilizados en los aislamientos de 2011, sin embargo para los aislamientos del 2012 si se muestra asociación y resistencia significativa en la misma concentración con los fungicidas mandipropamid y azoxistrobin (Cuadro 4). Cuando fue utilizada la concentración de 10 mg L⁻¹ en los aislamientos del 2011 y 2012 se comprobó que no existe asociación y resistencia entre ninguna de las sustancias utilizadas

Cuadro 5. Análisis de correlación entre las sustancias activas utilizadas en el campo y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de *P. infestans* con la concentración de 0.1 mg L⁻¹ en 2012.

	metalaxil	fosetil aluminio	mandipropamid	fluoxistrobin	azoxistrobin	ciazofamid
metalaxil	1	0	0	0	0	0
fosetil aluminio		1	0.0017	0.6091	0.1655	0
mandipropamid			1	0.2355	0.8646	0
fluoxistrobin				1	0.1699	0
azoxistrobin					1	0
ciazofamid						1

Las correlaciones entre variables se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0.05$

En los aislamientos homotálicos encontrados en el 2012 en Chapingo Edo. de México se observó que se produjeron órganos de reproducción sexual distinguiéndose estructuras características como anteridios anfiginos y oogonios dentro de las mismas cajas de Petri, estos aislamientos a su vez, mostraron asociación y resistencia en pruebas *in vitro* utilizando la concentración de 0.1 mg L^{-1} de los fungicidas mandipropamid y azoxistrobin. No se tienen reportes de alguna asociación entre estos fungicidas y el tipo de compatibilidad homotálico, sin embargo Groves y Ristaino en el 2000 reportan que la producción masiva de oosporas podría estar ligada al uso intensivo de fungicidas en el tipo de compatibilidad heterotálico, otros reportes afirman que la presencia de aislados homotálicos podrían estar ligados al uso del metalaxil (Fernandez *et. al.*, 2005), pero en Chapingo Edo. de México en el verano del 2011 y 2012 no se reporta resistencia al metalaxil mostrándose todos los aislamientos sensibles a esta substancia química.

CAPITULO III

CONCLUSIONES

Se presentó alta severidad por *Phytophthora infestans* en ambos años en el campo (*in vivo*), donde tres de los tratamientos presentaron curvas y valores diferentes de progreso de la enfermedad de un año a otro. Las medias dosis de los agroquímicos protegieron parcialmente al follaje, retardando la epidemia pero permitiendo la infección y el afloramiento de cepas de *P. infestans* resistentes a los productos. La resistencia *in vitro* del oomiceto a los fungicidas fue parcial, dependiente de las dosis a las que se expuso, sin coincidencia de resistencia/susceptibilidad al compararla con su comportamiento *in vivo* (campo). La inconsistencia del comportamiento de *P. infestans* a estos dos aspectos (*in vivo* e *in vitro*), no permite anticipar respuestas del oomiceto ante diversas situaciones de presión de selección por agroquímicos, lo cual demuestra su gran plasticidad genética en este aspecto.

CAPITULO IV

LITERATURA CITADA

- Abad, Z. G., Abad J. A, and Ochoa, C. 1995. Historical Evidence on Occurrence of the Late Blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. P: 36-41. En *Phytophthora infestans* 150. Dowlwey, L.j., Bannon E., Cooke. R. L., Keane T. and O' Sullivan E., eds., Boole Press Ltd. Dublin.
- Abad, Z.G. & Abad, J.A. 1997. Another Look at the Origin of Late Blight of Potatoes, Tomatoes, and Pear Melon in the Andes of South America. *Plant Disease*/ 81 (6) pag. 682-688.
- Adler, N. F, L. J. Erselius, M. G. Chacón, W. G. Flier, M. E. Ordóñez, L. Kroon, and G. A. Forbes. 2004. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology*. 94: 154-162.
- Agrios, G.N. 2011. *Plant pathology*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Alarcón-Rodríguez, N. M., H. Lozoya-Saldaña, E. Valadez-Moctezuma, R. García-Mateos, and M. T. Colinas-León. 2013. Genetic diversity of potato late blight, *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, at Chapingo, México. *Agrociencia* 47: 593-607.
- Baldauf, SL, AJ Roger, I. Wenk-Siefert, and WF Doolittle. 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290: 972 -977.
- Blum, M., Boehler, M. Randall, E., Young, V., Csukai, M., Kraus, S., 2010 Mandipropamid targets the cellulose synthase like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans* *Molecular Plant Pathology* 11, 227-243.
- Brent K. J. and Hollomon D. W. 2007. Fungicide Resistance in crop pathogens: How can it be managed?. Second edition. Fungicide Resistance Action Committee. 55 p.
- Bruck, R. I., Fry, W. E., Apple, A. E. 1980. Effect to metalaxyl, an acylanine fungicide on developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 70: 597-601.
- Brunner, F., W. Wirtz, JK Rose, AG Darvill, F. Govers, D. Scheel, and T. Nurnberger. 2002 . A beta-glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry* 59 : 689 -696.
- Chacón Acosta, M. G. L. (2007). Variability of *Phytophthora infestans* sensu lato in the highland tropics of Ecuador. Quito, Swiss Federal Institute of Technology Zurich: 151.

- Chamnanpant, J., WX Shan, and BM Tyler. 2001 . High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 14530 -14535.
- Campbell, C. L. and L.V Madden. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley, New York, USA. 532 p. ISBN 0471832367.
- Caten, CE, and JL Jinks. 1968 . Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans* . I. Cultural variation. Can. J. Bot. 46 : 329 -347.
- Cohen, Y., Rubin, E., Hadad, T., Gotlieb, D., Sierotzki, H. and Gisi, U. 2007. Sensitivity of *Phytophthora infestans* to mandipropamid and the effect of enforced selection pressure in the field. Plant Pathology 56, 836 – 842.
- Damicone, J. 2004. Fungicide resistance management. Cooperative Oklahoma Extension Service EPP-7663. Stillwater, OK. Duncan, J.M. 1999. *Phytophthora* an abiding threat to our crops. Microbiol. Today 26, 114-116.
- Davidse, L.C., D. Looijen, L.J. Turkesnteen, and D.Van Der Wal. 1981. Occurrence of metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato field. Neth. J. Plant Pathol. 87:65–68.
- Deahl, K. L., D. A. Inglis, S. P. DeMuth. 1993. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from Northwestern Washington. American Potato Journal. Vol.70, 779-794.
- Deahl, K. L., S. P. Demuth, W. E. Fry. 1995a. Genetic and phenotypic diversity in populations of *Phytophthora infestans* in the United States of America. In: Dowley L. J., E. Bannon, L. R. Cooke, T. Keane, E. O’ Sullivan. (eds). *Phytophthora infestans* 150. Dublin. Ireland. EAPR, Boole Press. 362p.
- Deahl K. L, S. P. Demuth, S. L. Sinden and A. Rivera. 1995b. Identification of mating types and metalaxyl resistance in North American populations of *Phytophthora infestans*. Amer. Potato J. 72: 35–49.
- Díaz de la Cruz, J. B., H. Lozoya-Saldaña, J. Sahagun-Castellanos, A. Peña-Lomelí. 2014. The pathosystem *Solanum tuberosum* L.-*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo. México. Expected, observed, and simulated. Potato Res. 91: 312-326.
- Doster, M. A., Milgroom, M. G., and Fry, W. E. 1990. Quantification of factors influencing potato late blight suppression and selection for metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: A simulation approach. Phytopathology 80:1190-1198.
- Dowley, L.J., and E. O’Sullivan. 1985. Monitoring metalaxyl resistance in population of *Phytophthora infestans*. Potato Res. 28:531–534.
- Drenth, A., S.B. Goodwin, W.E. Fry, and L.C. Davidse. 1993. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism. Phytopathology 83:1087–1092.

- Egan A.R, Murray A, Mullins S, 1995. Past history and future prospects for fungicides for the control of *Phytophthora infestans* on potatoes. In: Dowley LJ, Bannon E, Cooke LR, Keane T, O'Sullivan E, eds. *Phytophthora infestans* 150. Dublin, Irish Republic: Boole Press, 160–70.
- Erwin, DC, S. Bartnicki-Garcia, and PH Tsao. 1983 . *Phytophthora : its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. APS Press, St. Paul, Minn.
- Emmerman, A. 1996, Sweden's reduced risk pesticide policy. *Pesticides News*. No. 34:6
- Erwin, D., and O. Ribeiro. 1996 . Introduction to the genus *Phytophthora*. In: Edwin D. and O. Ribeiro (eds.). *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp 1 – 7.
- Evenhuis, A., H. T. Schepers, C. B. Bus, W. Stegeman. 1996. Synergy of cymoxanil and mancozeb when used to control potato late blight. *Potato Research*. 39: 551-559.
- Fernández-Northcote, E.N., Navia, O. y Gandarillas, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón tardío de la papa desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11: 1-25.
- Fernández Pavia, S. P., G. Rodríguez Alvarado, E. Garay Serrano. C. R. Belmar Díaz, A. K. Sturbaum, y H. Lozoya Saldaña. 2005. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 193-199.
- Fernández-Pavía, S.P., Grünwald, N.J., Díaz-Valasis, M., Cadena-Hinojosa, M., and Fry, W.E. 2004. Soil-borne oospores of *Phytophthora infestans* in central Mexico survive intercropping periods and infect potato plants in the field. *Plant Disease* 88:29-33.
- Flier, W.G., Van Den Bosch, G.B.M. & Turkensteen, L.J. 2003. Epidemiological importance of *Solanum sisymbriifolium*, *S.nigrum* and *S.dulcamara* as alternative hosts for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 52, 595-603.
- Forbes, G.A., X.C. Escobar, C.C. Ayala, J. Revelo, M.E. Ordoñez, B.A. Fry, K. Dovcett, and W.E Fry. 1997. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87:375–380.
- Francis, DM, and DA St Clair. 1997 . Population genetics of *Pythium ultimum* . *Phytopathology* 87 : 454 -461.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A. & Sandlan, K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*-chronology, pathways and implications. *Plant Disease*, 77, 653-661.
- Fry, W.E., Grünwald, N.J., Cooke, D.E.L., Mcleod, A., Forbes, G.A. & Cao, K. 2009. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: Lamour, K & Kamoun, S (eds.) *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and research tools*.

- Garay- Serrano, E. 2005. Variabilidad genética de poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en México. Tesis de Maestría. Instituto de Fitosanidad, C P. Montecillo, Edo. De México. 79 pp.
- Gareth, W. and D. Shaw. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes are Detected After PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 4007-4014.
- Gisi, U., and Cohen, Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:549-572.
- Goodwin, SB 1997 . The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87 : 462 -473.
- Goodwin, S. B.; Cohen, B. A.; Deahl, K. L.; Fry, W. E. 1994. Migration from northern México was the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84(6):553-558.
- Goodwin, S.B., Drenth, A. & Fry, W.E. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetics*, 22, 107-115.
- Goodwin SB, Sujkowski LS, Fry WE. 1995. Rapid evolution of pathogenicity with clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85:669-76.
- Gómez, D. E. y E. M. Reis. 2011. Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química viva*. Vol. 10, núm.1. pp: 6-17.
- Gornhardt, B., I. Rouhara, and E. Schmelzer. 2000 . Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 : 32 -42.
- Gotesson, A., JS Marshall, DA Jones, and AR Hardham. 2002 . Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* . *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 907 -921.
- Griffiths, R. G., Dancer, J., O' Neill, E. and Harwood, J. L. 2003 A madelamide pesticide alters lipid metabolism in *Phytophthora infestans*. *New Phytologist.* 158, 345-353.
- Griffith, G.W and Shaw, D. S.,1992. Polimorphysm in *Phytophthora infestans*:Four mitochondrial Haplotips are detected after PCR Amplification DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied of Enviromental Microbiology* 64(10):4007-4014.
- Grohmann, U.J. & Hoffman, G.M., 1989. Blattinfektion und gewebebesiedelung durch *Phytophthora infestans* an kartoffeln unter Einflu steigender dosierungen von metalaxil (leaf infection and tissue colonization in potato plants by *Phytophthora infestans* influenced by increasing dosages of metalaxyl. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 96:585-603.

- Groves CT and Ristaino JB, 2000. Commercial fungicide formulations induce in vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90: 1201-1208.
- Grünwald, N. J., W. G. Flier, A. K. Sturbaum, E. Garay, T. B. Van Den Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, H. Lozoya, L. J. Turkensteen, and W. E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathology*. 91:882-890.
- Grünwald, N.J. & Flier, W.G. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*. Palo Alto: Annual Reviews.
- Grünwald, N. J., A. K. Sturbaum, G. Romero, E. Garay, H. Lozoya, W. E. Fry. 2006. Selection for Fungicide Resistance within a Growing Season in Field Populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. *Ecology and Epidemiology*. Vol. 96, No. 12.
- Guo, Z., Miyoshi, H., Komoyoji, T., Haga, T., Fujita, T. 1990. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, Fluazinam. *Biochemica et Biophysica Acta* 1056: 89-92.
- Hardham, AR 2001. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australas. Plant Pathol.* 30 : 91 -98
- Henfling, J. W. 1987. Late Blight of Potato: *Phytophthora infestans*. Technical Information Bulletin 4. International Potato Center, Lima, Peru. (Second edition, revised). 25 p.
- Homo agrícola, <http://elhocino-adra.blogspot.mx/2013/04/hongos-fitopatogenos-enemigos.html>, consultado el 09/11/14.
- ISK-Biotech. 1990. Bravo. Daconil 12787. Broad Spectrum fungicide. ISK-Biotech corporation. Ohio, USA.
- Jorgensen, L. N. 1996. Measures to cut Danish fungicide use. *Pesticides News* No. 34:7.
- Judelson, HS, and TA Randall. 1998 . Families of repeated DNA in the oomycete *Phytophthora infestans* and their distribution within the genus. *Genome* 41 : 605 -615.
- Judelson, HS, and PW Tooley. 2000 . Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. *Phytopathology* 90 : 1112 -1119.
- Knapova, G., I. Tenzer, C. Gessler, U. Gisi. 2001. Characterization of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with molecular markers. *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology (Biodiversity in Plant Pathology)*. Taormina, Italy: SIVP, 6–9.
- Kamoun S., Hraber, P., Sobral, B., Nuss D. and Govers, F. Initial Assessment of Gene Diversity for the Oomycete pathogen *Phytophthora infestans* Based on Expressed Sequences. *Fungal genetics and Biology*. 28: 94-106.

- Kato, M., E. S. Mizubuti, S. B. Goodwin, and W. E. Fry. 1997. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87: 973-980.
- Lang, BF, E. Seif, MW Gray, CJ O'Kelly, and G. Burger. 1999 . A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 : 320 -326.
- Leroux P., Chabane, K., Bompeix, G.1993. Selection and characterization of *Phytophthora parasitica* mutants with ultraviolet induced resistance to dimetomorph or metalaxyl. *Pesticide Science* 39: 325-329.
- Locher, P. and G. Lorentz. 1991. Methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to ditiocarbimide fungicides. In: *FRAC Methods for Monitoring Fungicide Resistance*. EPPO Bulletin. 21: 341-345.
- López-Orona, C. A., A. R. Martínez, T. T. Arteaga, H. G. García, D. Palmero, A. Ruiz, y C. G. Peñuelas. 2013. First report of homothallic isolates of *Phytophthora infestans* in commercial potato crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley, México. *Plant Disease* 97: 1112.
- Lozoya-Saldaña, H., and A. Hernández-Vilchis. 2001. Registered and section 18 compounds for control of late blight (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) in potatoes in Toluca, México. *Agrociencia* 35: 451-458
- Manríquez, R. 1995. Resistance of *Phytophthora infestans* strain to phenylamides in Spain. In *Phytophthora infestans* 1985-1995/European Association for Potato Research. Boole Press Ltd., Dublin, Ireland.
- Mao, Y., and BM Tyler. 1996 . The *Phytophthora sojae* genome contains tandem repeat sequences which vary from strain to strain. *Fungal Genet. Biol.* 20 : 43 -51.
- Margulis, L., and KV Schwartz. 2000 . Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth. WH Freeman and Co., New York, NY.
- Matuszak, J. M., J. Fernández- Elquezabel, W. K. Gu, M. J. Villareal- González y W. E. Fry. 1994. Sensivity of *Phytophthora infestans* population to Metalaxyl in México; distribution and dynamics. *Plant Disease* 78: 911-916.
- May, K., S. Whisson, R. Zwart, I. Searle, J. Irwin, D. Maclean, B. Carroll, and A. Drenth. 2002 . Inheritance and mapping of 11 avirulence genes in *Phytophthora sojae* . *Fungal Genet. Biol.* 37 : 1 -12.
- McIntyre, JL, and L. Hankin. 1978 . An examination of enzyme production by *Phytophthora* spp. on solid and liquid media. *Can J. Microbiol.* 24 : 75 -78.

- Niederhauser, J.S. 1991. *Phytophthora infestans*: The Mexican connection. In: Lucas, JA, Shattock, RC, Shaw, DS & Cooke, LR (eds.) *Phytophthora*. Cambridge, UK Cambridge University Press.
- Nuninger, C., Steden, C., and Staub, T. 1995. The contribution of metalaxyl-based fungicide mixtures to potato late blight control. *Phytophthora infestans* 150. Pages 122-129 in: L.J. Dowley, E. Bannon, L.R. Cooke, T. Keane, and E. O'Sullivan, eds. European Association for Potato Research-Pathology Section Conference. Dublin, Ireland, September 1995. Boole Press Ltd.
- Páez, O., R. Valverde, L. Gómez y A. Brenes. 2001. Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en el cultivo de la papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 25: 33-44.
- Panabieres, F., and J. Y. Le Berre. 1999 . A family of repeated DNA in the genome of the oomycete plant pathogen *Phytophthora cryptogea* . *Curr. Genet.* 36 : 105 -112.
- Papavisaz, G. C., O' Neill, N. R., Lewis, J. A. 1978. Fungistatic activity of propyl- N-(alpha-dimethyl aminopropyl) carbamate of *Pythium* spp. And its reversal by sterols. *Phytopathology* 68: 1667-1671.
- Phytophthora database, <http://www.phytophthoradb.org/species.php?a=dv&id=16>, consultado el 08/11/14.
- Power, R.J., R.A. Hamlen, and L.A. Morehart. 1995. Variation in sensitivity of *Phytophthora infestans* field isolates to cimoxanil, chlorothalonil and metalaxyl. In European Association for Potato Research. *Phytophthora infestans*. 1845– 1995. Boole Press Ltd., Dublin, Ireland.
- Raven P. H., Evert R. F. and Eichhorn S. E. 1999. *Biology of Plants*. Six Edition. New York. W H Freeman and Company. 944 pp. 370.
- Rekanović, E., I. Potočnik, S. Milijašević-Marčić, M. Stepanović, B. Todorović, M. Mihajlović. 2011. Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from Serbia. *J. Environ Sci Health B*. 47:403-409.
- Runno E., Koppel M., 2006. The question of metalaxyl resistance on late blight fungus in Estonia. *Agronomy Research* 4: 341-344.
- Samoucha, Y., Cohen, Y. 1990. Toxicity of propamocarb to the late bligh fungus on potato. *Phytoparasitica* 18 (1): 27-40.
- Sansome, E., and CM Brasier. 1973 . Diploidy and chromosomal structural hybridity in *Phytophthora infestans*. *Nature* 241 : 344 -345.

- Schumann and C.J. D'Arcy. Reproduced with permission from Schumann, G. L. and C. J. D'Arcy. 2000. Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01, http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/benrud_jaco/index_files/Page521.htm, consultado el 08/11/2014.
- Schwinn, F. J., Margot, P. 1991. Control with chemicals. *Phytophthora infestans* the cause of late blight potato. Advances in Plant Pathology. D. S. Ingram and P. H. Williams, (eds.) Academic Press, London. pp. 225-265.
- Shaner, G. and R.E. Finney. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.
- Shattock, R. C. 1988. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 37: 4-11.
- Staubs, T., H. Dahmen and F. J. Schwinn. 1980. Effects of Ridomil on the development of *Plasmopara viticola* and *Phytophthora infestans* on their host plant. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* Vol. 87 No. 2 pp. 83-91.
- Stuart R. F., H. McLellan, P. C. Boevink, M. R. Armstrong, T. Bukharova, O. Sukarta, J. Win, S. Kamoun, P. R. J. Birch, M. J. Banfield. 2014. *Phytophthora infestans* RXLR Effector PexRD₂ Interacts with Host MAPKKKε to Suppress Plant Immune Signaling. *The Plant Cell.* 26(9):1-15.
- Sozzi D., F. J. Schwinn, U. Gisi. 1992. Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* to the phenylamides: a leaf disc method EPPO – *Bull.* 22:306-9.
- Spielman, L., Drenth, A., Davidse, L., Sujkowski, W., Tooley, P. & Fry, W.E. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathology*, 40, 422-430.
- The Pesticides Trust. 1994. The List of List. The Pesticides Trust. London, U K.
- Temperli, E., U. P. Roos, and H. R. Ithl. 1990. Actin and tubulin cytoskeletons in germlings of the oomycete fungus *Phytophthora infestans*. *European Journal of Cell Biology.* 53(1):75-88.
- Tooley, PW, and CD Therrien. 1987 . Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans* . *Exp. Mycol.* 11 : 19 -26.
- Torto, TA, L. Rauser, and S. Kamoun. 2002 . The *pipg1* gene of the oomycete *Phytophthora infestans* encodes a fungal-like endopolygalacturonase. *Curr. Genet.* 40 : 385 -390.

- Wade, M., and Delp, C.J. 1985. Aims and activities of industry's fungicide resistance action committee (FRAC). EPPO Bulletin 15: 577-583.
- Williams, R.J., and Gisi, U. 1992. Monitoring pathogen sensitivity to phenylamide fungicides: principles and interpretation. EPPO Bulletin 22: 297-322.
- Ziogas, B. N., A. N. Markoglou, D. I. Theodosiou, A. Anagnostou, and S. Boutopoulou. 2006. A high multi-drug resistance to chemically unrelated oomycete fungicides in *Phytophthora infestans*. European Journal of Plant Pathology. 115:283-292.

APENDICES

OBSERVACIONES EN CAMPO

Cuadro 1. Porcentajes de infección registrados semanalmente en plantas de papa variedad snowden después de haberse observado los primeros síntomas en campo de *P. infestans* en cada uno de los tratamientos evaluados en campo en medias dosis.

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
metalaxil	media	0	3	20	25	30	40
metalaxil	media	0	3	20	30	35	50
metalaxil	media	0	3	20	10	35	30
metalaxil	media	0	3	10	20	35	40
metalaxil	media	0	3	10	20	35	40
metalaxil	media	0	3	10	20	35	40
metalaxil	media	0	3	20	20	35	40
metalaxil	media	0	3	20	20	50	40
metalaxil	media	0	3	20	20	50	40
metalaxil	media	0	0	20	20	50	40
Fosetil-al	media	0	0	20	30	80	80
Fosetil-al	media	0	0	20	30	70	80
Fosetil-al	media	0	0	20	50	70	80
Fosetil-al	media	0	0	20	50	70	80
Fosetil-al	media	0	5	20	50	70	80
Fosetil-al	media	0	0	20	50	70	80
Fosetil-al	media	0	0	20	70	70	80
Fosetil-al	media	0	3	20	30	70	80
Fosetil-al	media	0	3	10	25	70	75
Fosetil-al	media	0	3	10	25	70	80
mandipropamid	media	0	0	5	10	20	30
mandipropamid	media	0	0	5	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	5	10	20	25
mandipropamid	media	0	0	5	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	20
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	20

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
propamocarb	media	0	3	20	35	80	85
propamocarb	media	0	3	20	35	70	85
propamocarb	media	0	3	20	35	90	85
propamocarb	media	0	3	20	35	80	85
propamocarb	media	0	3	20	50	80	85
propamocarb	media	0	0	20	50	80	85
propamocarb	media	0	0	20	50	80	85
propamocarb	media	0	0	10	50	80	85
propamocarb	media	0	0	20	50	80	90
propamocarb	media	0	0	20	40	80	85
ciazofamida	media	5	10	20	50	95	100
ciazofamida	media	5	10	20	50	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	50	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	50	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	70	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	70	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	50	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	50	95	100
ciazofamida	media	0	10	20	30	95	100
ciazofamida	media	0	0	20	30	95	100
testigo		10	20	60	60	100	100
testigo		5	10	60	60	100	100
testigo		5	10	30	60	100	100
testigo		5	30	30	60	100	100
testigo		5	10	30	60	100	100
testigo		0	10	30	60	100	100
testigo		0	10	30	60	100	100
testigo		0	20	30	60	100	100
testigo		0	20	50	60	100	100
testigo		0	20	50	60	100	100

Cuadro 2. Porcentajes de infección registrados semanalmente en plantas de papa variedad Agatha, después de haberse observado los primeros síntomas en campo de *P. infestans* en cada uno de los tratamientos evaluados en campo en dosis completas y medias dosis.

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
metalaxil	completa	3	15	15	30	50	100
metalaxil	completa	3	30	30	50	70	100
metalaxil	completa	0	10	25	35	55	55
metalaxil	completa	0	3	5	35	50	70
metalaxil	completa	5	20	20	50	70	70
metalaxil	completa	5	20	20	35	55	70
metalaxil	completa	10	25	30	30	35	75
metalaxil	completa	5	10	20	20	30	50
metalaxil	completa	5	10	20	20	30	50
metalaxil	completa	0	5	10	10	10	35
metalaxil	media	10	30	30	40	50	90
metalaxil	media	0	5	15	50	75	75
metalaxil	media	0	10	20	20	20	75
metalaxil	media	0	5	5	10	15	50
metalaxil	media	0	10	10	15	15	55
metalaxil	media	10	15	20	20	35	100
metalaxil	media	10	20	30	35	40	100
metalaxil	media	5	20	30	35	40	95
metalaxil	media	10	35	35	40	45	95
metalaxil	media	20	40	40	45	50	75
Fosetil -al	completa	10	20	25	50	100	100
Fosetil -al	completa	5	15	30	70	100	100
Fosetil -al	completa	0	0	5	70	100	100
Fosetil -al	completa	0	0	5	70	100	100
Fosetil -al	completa	0	0	5	70	75	100
Fosetil -al	completa	15	20	25	70	100	100
Fosetil -al	completa	10	15	20	50	80	100
Fosetil -al	completa	50	70	75	80	90	100
Fosetil -al	completa	10	20	30	50	100	100
Fosetil -al	completa	10	25	30	55	100	100
Fosetil -al	media	10	35	50	70	100	100
Fosetil -al	media	5	20	70	90	100	100
Fosetil -al	media	3	10	35	70	95	100
Fosetil -al	media	0	5	45	75	100	100
Fosetil -al	media	5	10	35	50	95	100
Fosetil -al	media	0	5	50	75	80	95
Fosetil -al	media	0	20	35	50	80	95
Fosetil -al	media	10	15	20	50	75	100
Fosetil -al	media	0	5	15	50	70	100
Fosetil -al	media	0	3	35	50	70	100

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
mandipropamid	completa	0	0	20	30	30	30
mandipropamid	completa	0	0	0	10	15	20
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	0	10	30
mandipropamid	completa	0	0	0	10	30	30
mandipropamid	completa	0	0	0	0	10	30
mandipropamid	completa	0	0	10	20	20	30
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	10	20	30
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	media	0	0	0	10	35	50
mandipropamid	media	0	0	0	5	15	35
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	media	0	0	0	10	15	30
mandipropamid	media	0	0	0	5	20	35
mandipropamid	media	0	0	0	15	25	40
mandipropamid	media	0	0	0	0	5	15
mandipropamid	media	0	0	0	15	25	50
mandipropamid	media	0	0	0	10	20	35
mandipropamid	media	0	0	0	15	35	50
ciazofamida	completa	0	10	10	20	35	35
ciazofamida	completa	0	15	20	20	35	50
ciazofamida	completa	0	20	25	30	35	35
ciazofamida	completa	0	15	20	35	40	45
ciazofamida	completa	0	10	15	25	35	35
ciazofamida	completa	0	10	10	30	45	50
ciazofamida	completa	0	5	10	30	35	35
ciazofamida	completa	0	3	10	25	35	50
ciazofamida	completa	0	0	5	15	25	30
ciazofamida	completa	0	0	0	10	20	30
ciazofamida	media	5	10	20	25	30	35
ciazofamida	media	10	15	30	30	35	50
ciazofamida	media	15	20	30	30	30	35
ciazofamida	media	0	5	15	25	30	35
ciazofamida	media	0	5	15	25	30	35
ciazofamida	media	0	5	15	20	30	35
ciazofamida	media	0	0	10	10	15	30
ciazofamida	media	0	0	5	10	10	15
ciazofamida	media	0	3	10	10	15	25
ciazofamida	media	0	5	15	15	20	30

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	10
Azoxystrobin	media	0	0	0	3	10	20
Azoxystrobin	media	0	0	0	3	15	30
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	0
Azoxystrobin	media	0	0	0	5	20	30
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	0
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	0
Azoxystrobin	media	0	0	0	3	15	30
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	10
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	5
Fluoxistrobin	media	3	10	45	45	50	70
Fluoxistrobin	media	0	5	15	35	75	80
Fluoxistrobin	media	0	3	10	50	70	80
Fluoxistrobin	media	10	15	45	50	75	85
Fluoxistrobin	media	0	5	20	55	70	90
Fluoxistrobin	media	0	10	25	35	55	70
Fluoxistrobin	media	0	5	0	30	50	70
Fluoxistrobin	media	0	5	0	35	50	75
Fluoxistrobin	media	0	3	10	35	50	75
Fluoxistrobin	media	5	10	15	20	30	50
TESTIGO		15	35	55	70	100	100
TESTIGO		30	50	70	85	100	100
TESTIGO		15	30	35	70	100	100
TESTIGO		20	35	55	75	100	100
TESTIGO		20	35	50	75	100	100
TESTIGO		35	55	75	90	100	100
TESTIGO		35	50	70	75	100	100
TESTIGO		20	35	70	90	100	100
TESTIGO		15	30	55	75	100	100
TESTIGO		35	55	75	90	100	100

Cuadro 3. Porcentajes de infección registrados semanalmente en plantas de papa variedad Fiana, después de haberse observado los primeros síntomas en campo de *P. infestans* en cada uno de los tratamientos evaluados en campo en dosis completas y medias dosis.

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
metalaxil	completa	0	0	15	35	50	75
metalaxil	completa	0	5	20	50	70	70
metalaxil	completa	5	10	35	50	75	75
metalaxil	completa	10	15	25	55	80	75
metalaxil	completa	10	15	35	55	80	70
metalaxil	completa	5	15	30	55	75	70
metalaxil	completa	0	0	35	50	70	75
metalaxil	completa	0	0	30	55	75	75
metalaxil	completa	0	5	25	50	70	100
metalaxil	completa	5	10	35	55	70	75
metalaxil	media	0	0	10	55	70	75
metalaxil	media	3	5	15	50	55	100
metalaxil	media	3	5	15	55	70	100
metalaxil	media	0	5	30	55	60	100
metalaxil	media	0	3	25	35	55	100
metalaxil	media	5	10	35	50	50	90
metalaxil	media	5	15	35	50	50	90
metalaxil	media	0	5	35	55	70	90
metalaxil	media	0	5	50	75	90	90
metalaxil	media	0	5	35	50	55	95
Fosetil -al	completa	0	3	5	50	70	95
Fosetil -al	completa	0	3	10	55	75	95
Fosetil -al	completa	0	5	10	55	70	100
Fosetil -al	completa	0	5	15	70	80	100
Fosetil -al	completa	0	0	30	55	80	95
Fosetil -al	completa	0	0	10	75	85	95
Fosetil -al	completa	0	0	5	70	80	100
Fosetil -al	completa	0	0	10	75	80	95
Fosetil -al	completa	0	0	15	70	80	95
Fosetil -al	completa	0	0	0	50	75	100
Fosetil -al	media	0	5	15	50	70	100
Fosetil -al	media	5	15	20	35	55	100
Fosetil -al	media	5	10	10	50	70	95
Fosetil -al	media	5	10	15	55	75	90
Fosetil -al	media	10	15	25	70	80	100
Fosetil -al	media	0	5	10	55	90	95
Fosetil -al	media	0	5	10	55	75	100
Fosetil -al	media	0	5	10	50	75	100
Fosetil -al	media	0	5	10	55	80	95
Fosetil -al	media	0	5	10	70	75	100

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	10
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	15
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	5
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	3
mandipropamid	completa	0	0	0	0	0	0
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	5
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	3
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	15
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	10
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	15
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	15
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	5
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	5
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	3
mandipropamid	media	0	0	0	0	0	3
ciazofamida	completa	0	5	15	20	35	35
ciazofamida	completa	0	5	10	20	30	30
ciazofamida	completa	0	5	20	20	25	25
ciazofamida	completa	0	3	15	20	20	20
ciazofamida	completa	0	3	15	20	20	20
ciazofamida	completa	0	0	5	5	5	10
ciazofamida	completa	0	0	5	5	5	10
ciazofamida	completa	0	0	5	10	10	15
ciazofamida	completa	0	0	3	5	5	10
ciazofamida	completa	0	0	3	5	5	10
ciazofamida	media	3	5	25	30	35	50
ciazofamida	media	0	5	15	20	30	45
ciazofamida	media	0	0	10	15	25	35
ciazofamida	media	0	0	15	25	30	35
ciazofamida	media	3	5	25	25	30	30
ciazofamida	media	3	5	25	30	30	30
ciazofamida	media	0	5	20	20	20	25
ciazofamida	media	0	5	20	20	20	25
ciazofamida	media	0	3	15	20	25	30
ciazofamida	media	0	3	10	15	15	20

tratamiento	dosis	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	15	20
Azoxystrobin	media	0	0	0	3	20	25
Azoxystrobin	media	0	0	0	3	25	25
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	30	35
Azoxystrobin	media	0	0	0	5	0	15
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	15
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	0	15
Azoxystrobin	media	0	0	0	3	10	25
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	15	25
Azoxystrobin	media	0	0	0	0	20	25
Fluoxistrobin	media	0	20	35	55	70	75
Fluoxistrobin	media	0	25	30	55	75	95
Fluoxistrobin	media	0	35	50	70	75	90
Fluoxistrobin	media	5	35	55	75	100	100
Fluoxistrobin	media	5	35	55	75	100	100
Fluoxistrobin	media	5	35	55	75	100	100
Fluoxistrobin	media	10	30	50	70	75	90
Fluoxistrobin	media	3	30	50	65	70	90
Fluoxistrobin	media	3	55	70	75	80	85
Fluoxistrobin	media	5	50	75	80	90	95
TESTIGO		15	25	35	50	100	100
TESTIGO		20	30	45	70	100	100
TESTIGO		0	0	0	55	100	100
TESTIGO		0	10	15	40	100	100
TESTIGO		0	5	10	35	100	100
TESTIGO		0	5	10	45	100	100
TESTIGO		0	25	45	70	100	100
TESTIGO		0	35	50	75	100	100
TESTIGO		0	25	35	45	100	100
TESTIGO		0	20	25	55	100	100

OBSERVACIONES *in vitro*

Cuadro 4. Medidas de crecimiento *in vitro* de los aislamientos obtenidos en el verano del 2011, en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 0.1 mgL⁻¹

AISLAMIENTO	Testigo	Propamocarb 0.1	Fosetil 0.1	Ciazofamida 0.1	Mandipropamid 0.1	Metalaxil 0.1
T2(1)R	2.3	0.7	2	0.2	0	0.5
T3(1)R	2.2	0.8	1.9	0.5	0	0.7
T4(1)R	2.4	1	1.8	0	0	0.3
T5(1)R	1.9	0.7	1.4	0	0	0.7
T5(1)E	1.8	0.7	1.6	0	0	0.5
T2(2)R	1.7	0.7	1.6	0	0	0.5
T3(2)E	2.2	0.6	1.6	0.4	0	0.3
T3(2)R	1.8	0.7	1.4	0.3	0	0.2
T5(2)E	1.8	1	1.8	0.1	0	0.5
T5(2)R	1.6	0.6	1.5	0	0	0.5
T6(2)R	2.1	0.6	2	0.2	0	0.6
T6(2)E	2.1	1	2	0.1	0	0.3
T1(3)R	2.3	0.8	1.9	0	0	0.4
T3(3)E	2.2	0.9	2.1	0	0	0.1
T4(3)R	2.2	0.5	1.7	0.9	0	0.9
T4(3)E	2.1	0.8	1.9	0	0	0.6
T5(3)E	2.2	0.9	1.8	0	0	1
T6(3)R	1.8	0.5	1.5	0	0	1.2
JT(3)R	2.3	1	1.6	0.1	0	0.5
SP(3)R	1.9	0.7	1.9	0	0	0.8
T1(4)R	2	0.7	1.9	0	0	1.2
T1(4)E	2	0.6	1.9	0	0	1.1
T3(4)R	2.4	0.7	2	0.4	0	1.2
T4(4)R	2	0.8	2	0.8	0	1.3
T5(4)R	2	0.7	2	0.3	0	1
T6(4)R	1.9	0.8	1	0.2	0	0.9
JT(4)R	1.8	0.5	1	0	0	0.2
SP(4)R	1.3	0.5	1	0	0	0.1
T2(5)R	2.2	0.8	1.8	0.5	0	1.3
T3(5)R	2.3	0.7	1.9	0.3	0	1
T4(5)R	2.3	1	2.2	0.4	0	1.4
T5(5)R	1.6	0.9	1.3	0.4	0	0.7
T6(5)R	1.8	0.8	1.6	0	0	0.9
JT(5)R	2.3	0.8	2.2	0.1	0	1.5
SP(5)R	2.4	0.9	2.4	0.4	0	0.9

Cuadro 5. Medidas de crecimiento *in vitro* de los aislamientos obtenidos en el verano del 2011, en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 10 mgL⁻¹

AISLAMIENTO	Testigo	Propamocarb 10	Fosetil 10	Ciazofamida 10	Mandipropamid 10	Metalaxil 10
T2(1)R	2.3	0.2	1.2	0	0	0
T3(1)R	2.2	0.1	1.2	0	0	0
T4(1)R	2.4	0.4	1.1	0	0	0
T5(1)R	1.9	0.2	1.3	0	0	0
T5(1)E	1.8	0.2	0.7	0	0	0
T2(2)R	1.7	0.1	0.9	0	0	0
T3(2)E	2.2	0	1	0	0	0
T3(2)R	1.8	0.2	1	0	0	0.2
T5(2)E	1.8	0.3	0.5	0	0	0.3
T5(2)R	1.6	0	0.5	0	0	0.5
T6(2)R	2.1	0.1	1.2	0	0	0.2
T6(2)E	2.1	0.5	1.3	0	0	0.1
T1(3)R	2.3	0.3	1.4	0	0	0
T3(3)E	2.2	0.2	1.3	0	0	0
T4(3)R	2.2	0.1	1	0	0	0
T4(3)E	2.1	0.2	1.1	0	0	0.3
T5(3)E	2.2	0.3	1.1	0	0	0.3
T6(3)R	1.8	0	0.9	0	0	0.2
JT(3)R	2.3	0.4	1	0	0	0.3
SP(3)R	1.9	0.4	1.2	0	0	0.3
T1(4)R	2	0.2	1.2	0	0	0.3
T1(4)E	2	0.1	1.1	0	0	0.3
T3(4)R	2.4	0.3	1.2	0	0	0.5
T4(4)R	2	0.2	1.3	0	0	0.4
T5(4)R	2	0.1	1	0	0	0.5
T6(4)R	1.9	0.4	0.9	0	0	0.2
JT(4)R	1.8	0	0.5	0	0	0.1
SP(4)R	1.3	0	0.5	0	0	0.1
T2(5)R	2.2	0.4	1.3	0	0	0.5
T3(5)R	2.3	0.1	1	0	0	0.3
T4(5)R	2.3	0.3	1.2	0	0	0.2
T5(5)R	1.6	0.2	1.4	0	0	0.9
T6(5)R	1.8	0.2	0.7	0	0	0.2
JT(5)R	2.3	0.3	1.5	0	0	0.9
SP(5)R	2.4	0.3	0.9	0	0	0.6

Cuadro 6. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la primera semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 0.1 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(2)	100	29.6296296	18.5185185	0	0	7.40740741	0
A-1-0.5(3)	100	78.2608696	0	0	0	43.4782609	0
A-1-0.5(4)	100	76.1904762	23.8095238	0	0	100	0
A-1-1(10)	100	78.2608696	17.3913043	0	0	43.4782609	0
A-1-1(11)	100	75	45	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	76.1904762	42.8571429	0	0	57.1428571	0
A-1-1(3)	100	79.1666667	37.5	0	0	8.33333333	0
A-1-1(4)	100	75	50	0	0	60	0
A-1-1(5)	100	76.1904762	0	0	0	57.1428571	0
A-1-1(6)	100	78.2608696	8.69565217	0	0	100	0
A-1-1(7)	100	76.1904762	52.3809524	0	0	0	0
A-1-1(8)	100	78.2608696	30.4347826	0	0	0	0
A-1-1(9)	100	76.1904762	42.8571429	0	0	0	0
A-2-0.5(1)	100	80.7692308	26.9230769	0	0	0	0
A-2-0.5(2)	100	75	45	0	0	50	0
A-3-0.5(1)	100	79.1666667	62.5	0	0	0	0
A-3-0.5(4)	100	76.1904762	52.3809524	0	0	23.8095238	0
A-3-1(1)	100	77.2727273	45.4545455	0	0	0	0
A-3-1(2)	100	77.2727273	27.2727273	0	0	22.7272727	0
A-4-0.5(2)	100	75	25	0	0	0	0
A-4-0.5(3)	100	78.2608696	17.3913043	0	0	21.7391304	0
A-A(1)	100	76.1904762	9.52380952	0	0	0	0
A-F(1)	100	75	35	0	0	0	0
F-1-0.5(1)	100	76.1904762	52.3809524	0	0	23.8095238	0
F-1-0.5(2)	100	75	65	0	0	90	0
F-1-1(1)	100	75	35	0	0	100	0
F-1-1(2)	100	82.1428571	14.2857143	0	0	35.7142857	0
F-1-1(3)	100	77.2727273	18.1818182	0	0	22.7272727	0
F-1-1(4)	100	81.4814815	7.40740741	0	0	0	0
F-1-1(5)	100	78.2608696	4.34782609	0	0	0	0
F-1-1(6)	100	82.1428571	17.8571429	0	0	89.2857143	0
F-2-0.5(1)	100	80	0	0	0	40	0
F-2-0.5(2)	100	80	0	0	0	40	0
F-2-0.5(4)	100	79.1666667	0	0	0	62.5	0
F-2-0.5(5)	100	77.2727273	50	0	0	45.4545455	0
F-2-0.5(7)	100	78.2608696	0	0	0	43.4782609	0
F-2-1(2)	100	81.4814815	0	0	0	18.5185185	0
F-2-1(3)	100	77.2727273	13.63636364	0	0	90.9090909	0
F-2-1(4)	100	81.4814815	14.81481481	0	0	37.037037	0
F-2-1(5)	100	78.2608696	21.73913043	0	0	65.2173913	0
F-2-1(6)	100	78.2608696	13.04347826	0	0	43.4782609	0
F-3-0.5(1)	100	79.1666667	0	0	0	20.8333333	0
F-3-0.5(2)	100	77.2727273	0	0	0	22.7272727	0
F-3-0.5(3)	100	78.2608696	47.82608696	0	0	52.173913	0
F-3-1(1)	100	77.2727273	63.63636364	0	0	0	0
F-4-0.5(2)	100	70.5882353	58.82352941	0	0	0	0
F-4-0.5(3)	100	76.1904762	23.80952381	0	0	0	0
F-4-0.5(4)	100	76.1904762	9.523809524	0	0	0	0
F-4-0.5(5)	100	77.2727273	31.81818182	0	0	68.1818182	0
F-4-1(1)	100	76.1904762	9.523809524	0	0	47.6190476	0
F-4-1(2)	100	76.1904762	33.33333333	0	0	47.6190476	0
F-4-1(3)	100	76.1904762	28.57142857	0	0	57.1428571	0
F-4-1(4)	100	76.1904762	52.38095238	0	0	0	0
F-4-1(5)	100	76.1904762	38.0952381	0	0	0	0
F-4-1(6)	100	75	0	0	0	25	0
R-A(1)	100	75	70	0	0	50	0
R-F(1)	100	77.2727273	9.090909091	0	0	45.4545455	0
R-F(2)	100	80	32	0	0	80	0

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
T-A(1)	100	78.2608696	39.1304348	0	0	43.4782609	0
T-A(2)	100	75	0	0	0	40	0
T-A(3)	100	77.2727273	13.6363636	0	0	0	0
T-A(4)	100	80	8	0	0	40	0
T-A(5)	100	70.5882353	58.8235294	0	0	31.8416786	0
T-A(6)	100	73.6842105	26.3157895	0	0	52.6315789	0
T-A(7)	100	66.6666667	0	0	0	100	0
T-F(1)	100	68.75	56.25	0	0	31.25	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 7. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la segunda semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 0.1 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(1)	100	0	90	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	12.5	75	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	28.5714286	38.0952381	0	0	0	0
A-1-1(3)	100	22.7272727	50	0	0	0	0
A-2-0.5(1)	100	19.047619	38.0952381	0	0	0	0
A-2-1(1)	100	0	10	0	0	0	0
A-2-1(2)	100	25	35	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	40	10	0	0	0	0
A-3-0.5(2)	100	50	50	0	0	0	0
A-3-1(1)	100	0	50	0	0	0	0
A-3-1(2)	100	23.8095238	71.4285714	0	0	0	0
A-4-0.5(2)	100	90	20	0	0	0	0
A-4-1(1)	100	100	30.7692308	0	0	0	0
A-4-1(2)	100	33.3333333	6.6666667	0	0	0	0
F-1-0.5(1)	100	20	70	0	0	0	0
F-1-1(1)	100	30	25	0	0	0	0
F-1-1(2)	100	26.3157895	47.3684211	0	0	0	0
F-1-1(3)	100	0	78.9473684	0	0	0	0
F-1-1(4)	100	0	73.6842105	0	0	0	0
F-2-0.5(3)	100	42.1052632	42.1052632	0	0	0	0
F-2-1(2)	100	50	50	0	0	0	0
F-2-1(3)	100	29.4117647	17.6470588	0	0	0	0
F-2-1(4)	100	47.0588235	0	0	0	0	0
F-3-0.5(1)	100	27.7777778	44.4444444	0	0	0	0
F-3-1(1)	100	0	38.4615385	0	0	0	0
F-4-0.5(4)	100	0	60	0	0	0	0
F-4-0.5(5)	100	0	83.3333333	0	0	0	0
R-F(1)	100	0	0	0	0	0	0
R-F(2)	100	57.1428571	14.2857143	0	0	0	0
R-F(3)	100	16.6666667	33.3333333	0	0	0	0
T-A(1)	100	25	41.6666667	0	0	0	0
T-A(2)	100	50	70	0	0	0	0
T-A(3)	100	100	100	0	0	0	0
T-F(1)	100	75	41.6666667	0	0	0	0
T-F(2)	100	8.3333333	50	0	0	0	0
A-1-0.5(1)	100	0	90	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 8. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la tercera semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 0.1 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-1(1)	100	41.6666667	16.6666667	0	0	0	0
A-2-0.5(1)	100	14.2857143	0	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	100	41.6666667	0	0	0	0
A-4-0.5(2)	100	30.7692308	76.9230769	0	0	0	0
F-1-1(1)	100	66.6666667	33.3333333	0	0	0	0
F-1-1(2)	100	100	54.5454545	0	0	0	0
F-1-1(3)	100	0	45.4545455	0	0	0	0
F-1-1(4)	100	90.9090909	100	0	0	0	0
F-4-0.5(1)	100	66.6666667	0	0	0	0	0
F-4-0.5(2)	100	25	35	0	0	0	0
F-4-0.5(3)	100	16.6666667	27.7777778	0	0	0	0
F-4-0.5(4)	100	10.5263158	52.6315789	0	0	0	0
F-4-0.5(5)	100	29.4117647	52.9411765	0	0	0	0
R-F(1)	100	26.6666667	53.3333333	0	0	0	0
R-F(2)	100	0	36.3636364	0	0	0	0
R-F(3)	100	100	91.6666667	0	0	0	0
T-A(3)	100	50	90	0	0	0	0
T-A(4)	100	80	40	0	0	0	0
T-A(5)	100	45.4545455	81.8181818	0	0	0	0
T-F(1)	100	33.3333333	16.6666667	0	0	0	0
T-F(2)	100	20	40	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	41.6666667	16.6666667	0	0	0	0
A-1-0.5(1)	100	75	33.3333333	0	0	0	0
A-1-0.5(2)	100	100	0	0	0	0	0
A-1-0.5(3)	100	100	0	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	100	0	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	100	100	0	0	0	0
A-1-1(3)	100	100	90	0	0	0	0
A-2-1(1)	100	80	20	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	83.3333333	0	0	0	0	0
A-3-0.5(2)	100	80	80	0	0	0	0
A-4-0.5(1)	100	76.9230769	0	0	0	0	0
F-1-0.5(1)	100	100	0	0	0	0	0
F-1-0.5(2)	100	58.8235294	0	0	0	0	0
F-1-1(1)	100	100	0	0	0	0	0
F-1-1(2)	100	100	0	0	0	0	0
F-4-0.5(3)	100	33.3333333	93.3333333	0	0	0	0
R-F(1)	100	100	100	0	0	0	0
T-A(1)	100	50	70	0	0	0	0
T-A(2)	100	41.6666667	66.6666667	0	0	0	0
T-A(3)	100	45.4545455	90.9090909	0	0	0	0
T-A(4)	100	90.9090909	45.4545455	0	0	0	0
T-F(1)	100	69.2307692	30.7692308	0	0	0	0
A-1-0.5(1)	100	75	33.3333333	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 9. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la cuarta semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 0.1 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(1)	100	61.5384615	100	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	100	75	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	100	16.6666667	0	0	0	0
A-1-1(3)	100	100	54.5454545	0	0	0	0
F-1-1(1)	100	100	66.6666667	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	0	72.7272727	0	0	0	0
T-A(1)	100	0	29.4117647	0	0	0	0
T-A(2)	100	75	70	0	0	0	0
T-A(3)	100	43.4782609	8.69565217	0	0	0	0
T-F(1)	100	82.1428571	21.4285714	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 10. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la quinta semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 0.1 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(1)	100	61.5384615	100	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	100	75	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	100	16.6666667	0	0	0	0
A-1-1(3)	100	100	54.5454545	0	0	0	0
F-1-1(1)	100	100	66.6666667	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	0	72.7272727	0	0	0	0
T-A(1)	100	0	29.4117647	0	0	0	0
T-A(2)	100	75	70	0	0	0	0
T-A(3)	100	43.4782609	8.69565217	0	0	0	0
T-F(1)	100	82.1428571	21.4285714	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 11. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la primera semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 10 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(2)	100	0	12	0	0	32	0
A-1-0.5(3)	100	0	13.0434783	0	0	21.7391304	0
A-1-0.5(4)	100	0	13.0434783	0	0	21.7391304	0
A-1-1(10)	100	0	13.6363636	0	0	18.1818182	0
A-1-1(11)	100	0	14.2857143	0	0	14.2857143	0
A-1-1(2)	100	0	15	0	0	20	0
A-1-1(3)	100	0	15	0	0	25	0
A-1-1(4)	100	0	17.3913043	0	0	21.7391304	0
A-1-1(5)	100	0	18.75	0	0	12.5	0
A-1-1(6)	100	0	20	0	0	20	0
A-1-1(7)	100	0	21.7391304	0	0	21.7391304	0
A-1-1(8)	100	0	23.8095238	0	0	28.5714286	0
A-1-1(9)	100	0	12.5	0	0	8.33333333	0
A-2-0.5(1)	100	0	13.6363636	0	0	0	0
A-2-0.5(2)	100	0	14.2857143	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	0	18.5185185	0	0	0	0
A-3-0.5(4)	100	0	19.047619	0	0	0	0
A-3-1(1)	100	0	20.8333333	0	0	0	0
A-3-1(2)	100	0	21.7391304	0	0	0	0
A-4-0.5(2)	100	0	33.3333333	0	0	0	0
A-4-0.5(3)	100	0	35	0	0	0	0
A-A(1)	100	0	39.1304348	0	0	0	0
A-F(1)	100	0	47.6190476	0	0	0	0
F-1-0.5(1)	100	0	0	0	0	13.0434783	0
F-1-0.5(2)	100	0	0	0	0	15	0
F-1-1(1)	100	0	0	0	0	18.5185185	0
F-1-1(2)	100	0	0	0	0	21.0526316	0
F-1-1(3)	100	0	0	0	0	21.7391304	0
F-1-1(4)	100	0	0	0	0	22.7272727	0
F-1-1(5)	100	0	0	0	0	22.7272727	0
F-1-1(6)	100	0	0	0	0	23.8095238	0
F-2-0.5(1)	100	0	0	0	0	27.2727273	0
F-2-0.5(2)	100	0	0	0	0	30.4347826	0
F-2-0.5(4)	100	0	0	0	0	33.3333333	0
F-2-0.5(5)	100	0	0	0	0	40	0
F-2-0.5(7)	100	0	0	0	0	60	0
F-2-1(2)	100	0	4.76190476	0	0	14.2857143	0
F-2-1(3)	100	0	4.76190476	0	0	19.047619	0
F-2-1(4)	100	0	4.76190476	0	0	23.8095238	0
F-2-1(5)	100	0	5	0	0	35	0
F-2-1(6)	100	0	8.33333333	0	0	29.1666667	0
F-3-0.5(1)	100	0	9.09090909	0	0	22.7272727	0
F-3-0.5(2)	100	0	9.09090909	0	0	31.8181818	0
F-3-0.5(3)	100	0	9.52380952	0	0	19.047619	0
F-3-1(1)	100	0	4	0	0	20	0
F-4-0.5(2)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-0.5(3)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-0.5(4)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-0.5(5)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-1(1)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-1(2)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-1(3)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-1(4)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-1(5)	100	0	0	0	0	0	0
F-4-1(6)	100	0	0	0	0	0	0
R-A(1)	100	0	0	0	0	0	0
R-F(1)	100	0	0	0	0	0	0
R-F(2)	100	0	0	0	0	0	0

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
T-A(1)	100	0	0	0	0	7.14285714	0
T-A(2)	100	0	0	0	0	8	0
T-A(3)	100	0	3.7037037	0	0	7.40740741	0
T-A(4)	100	0	4.34782609	0	0	4.34782609	0
T-A(5)	100	0	4.54545455	0	0	0	0
T-A(6)	100	0	4.76190476	0	0	0	0
T-A(7)	100	0	5.88235294	0	0	0	0
T-F(1)	100	0	9.52380952	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 11. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la segunda semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 10 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(1)	100	20	15	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	25	31.25	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	4.76190476	38.0952381	0	0	0	0
A-1-1(3)	100	13.6363636	13.6363636	0	0	0	0
A-2-0.5(1)	100	19.047619	33.3333333	0	0	9.52380952	0
A-2-1(1)	100	15	30	0	0	15	0
A-2-1(2)	100	10	10	0	0	5	0
A-3-0.5(1)	100	20	13.3333333	0	0	13.3333333	0
A-3-0.5(2)	100	15	10	0	0	10	0
A-3-1(1)	100	20	15	0	0	25	0
A-3-1(2)	100	21.0526316	36.8421053	0	0	10.5263158	0
A-4-0.5(2)	100	15.7894737	15.7894737	0	0	5.26315789	0
A-4-1(1)	100	25	18.75	0	0	25	0
A-4-1(2)	100	7.14285714	14.2857143	0	0	21.4285714	0
F-1-0.5(1)	100	0	25	0	0	100	0
F-1-1(1)	100	0	16.6666667	0	0	91.6666667	0
F-1-1(2)	100	0	20	0	0	50	0
F-1-1(3)	100	0	30	0	0	20	0
F-1-1(4)	100	0	16.6666667	0	0	16.6666667	0
F-2-0.5(3)	100	25	5	0	0	15	0
F-2-1(2)	100	20	0	0	0	10	0
F-2-1(3)	100	9.09090909	4.54545455	0	0	0	0
F-2-1(4)	100	4.76190476	0	0	0	0	0
F-3-0.5(1)	100	40	0	0	0	30	0
F-3-1(1)	100	23.0769231	0	0	0	38.4615385	0
F-4-0.5(4)	100	26.3157895	0	0	0	5.26315789	0
F-4-0.5(5)	100	21.0526316	0	0	0	0	0
R-F(1)	100	17.6470588	0	0	0	17.6470588	0
R-F(2)	100	11.7647059	0	0	0	29.4117647	0
R-F(3)	100	0	5.55555556	0	0	0	0
T-A(1)	100	7.69230769	7.69230769	0	0	23.0769231	0
T-A(2)	100	40	0	0	0	40	0
T-A(3)	100	11.1111111	5.55555556	0	0	27.7777778	0
T-F(1)	100	5.88235294	5.88235294	0	0	5.88235294	0
T-F(2)	100	0	0	0	0	0	0
A-1-0.5(1)	100	20	15	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 12. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la tercera semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 10 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
T-F(2)	100	0	0	0	0	20	0
A-2-0.5(1)	100	21.4285714	14.2857143	0	0	25	0
A-4-0.5(2)	100	7.69230769	23.0769231	0	0	30	0
F-1-1(1)	100	8.33333333	25	0	0	25	0
F-1-1(3)	100	0	18.1818182	0	0	18.1818182	0
F-1-1(4)	100	18.1818182	18.1818182	0	0	25	0
F-4-0.5(2)	100	10	15	0	0	22.2222222	0
F-4-0.5(3)	100	5.55555556	11.1111111	0	0	15.3846154	0
F-4-0.5(5)	100	11.7647059	11.7647059	0	0	36.3636364	0
R-F(1)	100	20	13.3333333	0	0	25	0
R-F(2)	100	9.09090909	18.1818182	0	0	50	0
R-F(3)	100	0	25	0	0	18.1818182	0
T-A(3)	100	20	10	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	0	8.33333333	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	0	0	0	0	0	0
F-1-1(2)	100	0	9.09090909	0	0	0	0
F-4-0.5(1)	100	0	8.33333333	0	0	0	0
F-4-0.5(4)	100	15.7894737	0	0	0	0	0
T-A(4)	100	0	0	0	0	9.09090909	0
T-A(5)	100	27.2727273	0	0	0	0	0
A-4-0.5(2)	100	0	0	0	0	0	0
A-1-1(1)	100	0	0	0	0	16.6666667	0
A-4-0.5(1)	100	0	13.3333333	0	0	13.3333333	0
F-4-0.5(1)	100	0	17.6470588	0	0	0	0
R-F(1)	100	0	25	0	0	50	0
F-4-0.5(2)	100	16.6666667	8.33333333	0	0	16.6666667	0
A-3-0.5(1)	100	20	13.3333333	0	0	26.6666667	0
F-1-1(1)	100	30	20	0	0	80	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 13. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la cuarta semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 10 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(1)	100	0	10	0	0	18.1818182	0
A-1-1(1)	100	0	10	0	0	18.1818182	0
A-1-1(2)	100	0	13.3333333	0	0	30.7692308	0
A-1-1(3)	100	0	18.1818182	0	0	18.1818182	0
F-1-1(1)	100	0	45.4545455	0	0	15.3846154	0
A-3-0.5(1)	100	0	0	0	0	33.3333333	0
T-A(1)	100	6.66666667	0	0	0	36.3636364	0
T-A(2)	100	7.69230769	0	0	0	18.1818182	0
T-A(3)	100	8.33333333	0	0	0	15.3846154	0
T-F(1)	100	9.09090909	0	0	0	20	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 14. Criterios de evaluación *in vitro* de los aislamientos obtenidos en la quinta semana de colecta, durante el verano del 2012 en medio centeno agar, con adición de los fungicidas empleados en el estudio en una concentración de 10 mgL⁻¹

Aislamiento	Testigo	Azoxistrobin	Mandipropamid	Ciazofamida	Fluoxistrobin	Fosetil Aluminio	Metalaxil
†A-1-0.5(1)	100	3.57142857	0	0	0	3.57142857	0
A-1-1(1)	100	6.66666667	20	0	0	0	0
A-1-1(2)	100	10	5	0	0	5	0
A-1-1(3)	100	13.0434783	0	0	0	8.69565217	0
F-1-1(1)	100	15.3846154	15.3846154	0	0	0	0
A-3-0.5(1)	100	17.6470588	0	0	0	0	0
T-A(1)	100	18.1818182	0	0	0	0	0
T-A(2)	100	18.1818182	9.09090909	0	0	9.09090909	0
T-A(3)	100	25	16.6666667	0	0	0	0
T-F(1)	100	25	25	0	0	0	0

†Se refiere a los aislamientos A-1-1 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, dosis completa), A-1-0.5 (variedad Agatha, fungicida metalaxil, media dosis), A-2-1 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), A-2-0.5 (variedad Agatha, fungicida fosetil aluminio, media dosis), A-3-1 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, dosis completa), A-3-0.5 (variedad Agatha, fungicida mandipropamid, media dosis), R-A (variedad Agatha, fungicida ciazofamida, media dosis), T-A (testigo variedad Agatha), F-1-1 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, dosis completa), F-1-0.5 (variedad Fiana, fungicida metalaxil, media dosis), F-2-1 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, dosis completa), F-2-0.5 (variedad Fiana, fungicida fosetil aluminio, media dosis), F-3-1 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, dosis completa), F-3-0.5 (variedad Fiana, fungicida mandipropamid, media dosis), R-F (variedad Fiana, fungicida ciazofamida, media dosis), T-F (testigo variedad Fiana).

Cuadro 15. Análisis de correlación entre las sustancias activas utilizadas en el campo y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de *P. infestans* con la concentración de 0.1 mg L⁻¹ en 2011.

	metalaxil	fosetil aluminio	mandipropamid	propamocarb	ciazofamid
metalaxil	1	0.6123	0	0.4039	0
fosetil aluminio		1	0.0017	0.5550	0
mandipropamid			1	0	0
propamocarb				1	0
ciazofamid					1

Las correlaciones entre variables se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0.05$

Cuadro 16. Análisis de correlación entre las sustancias activas utilizadas en el campo y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de *P. infestans* con la concentración de 10 mg L⁻¹ en 2011.

	metalaxil	fosetil aluminio	mandipropamid	propamocarb	ciazofamid
metalaxil	1	0.4628	0	0	0
fosetil aluminio		1	0.0017	0	0
mandipropamid			1	0	0
propamocarb				1	0
ciazofamid					1

Las correlaciones entre variables se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0.05$

Cuadro 17. Análisis de correlación entre las sustancias activas utilizadas en el campo y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de *P. infestans* con la concentración de 0.1 mg L⁻¹ en 2012.

	metalaxil	fosetil aluminio	mandipropamid	fluoxistrobin	azoxistrobin	ciazofamid
metalaxil	1	0	0	0	0	0
fosetil aluminio		1	0.0017	0.6091	0.1655	0
mandipropamid			1	0.2355	0.8646	0
fluoxistrobin				1	0.1699	0
azoxistrobin					1	0
ciazofamid						1

Las correlaciones entre variables se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0.05$

Cuadro 18. Análisis de correlación entre las sustancias activas utilizadas en el campo y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislamientos de *P. infestans* con la concentración de 10 mg L⁻¹ en 2012.

	metalaxil	fosetil aluminio	mandipropamid	fluoxistrobin	azoxistrobin	ciazofamid
metalaxil	1	0	0	0	0	0
fosetil aluminio		1	0.5010	0	0.5365	0
mandipropamid			1	0	0.6408	0
fluoxistrobin				1	0	0
azoxistrobin					1	0
ciazofamid						1

Las correlaciones entre variables se hicieron mediante regresión lineal simple con un valor de $\alpha=0.05$