



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES

Impacto Ambiental derivado del uso del Metalaxil para Control del Tizón  
Tardío (*Phytophthora infestans*) en Cultivos Comerciales de Papa  
(*Solanum tuberosum*)

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA  
CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Agosto 2014



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES

Impacto Ambiental derivado del uso del Metalaxil para Control del Tizón  
Tardío (*Phytophthora infestans*) en Cultivos Comerciales de Papa  
(*Solanum tuberosum*)

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

COMITÉ DE TUTORES

Dr. Angel Roberto Martínez Campos  
Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas  
Dra. Tizbe Teresa Arteaga Reyes

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Agosto 2014

*Aprender es como remar contra corriente: en cuanto se deja,  
se retrocede.*

*Edward B. Britten*

## RESUMEN

El presente trabajo demostró que el patrón de uso de fungicidas utilizados en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) para controlar *Phytophthora infestans* es insostenible, debido a que los costos de remoción de los excedentes de fungicidas aplicados rebasan las ganancias que se obtienen durante el tiempo de vida productiva de los sistemas que aplican dosis superiores a lo recomendado. Los cultivos comerciales de papa tratados con metalaxil tuvieron presencia de cepas homotáticas de *Phytophthora infestans* que fueron capaces de producir oosporas por sí mismas, estas son el inóculo inicial para las epidemias y representan el medio para la recombinación sexual. Se determinó que el homotalismo es una condición genética de propagación del Tizón Tardío; ya que los aislamientos homotáticos fueron capaces de producir descendencia homotática a través de la producción de esporangios y zoosporas. La capacidad que presentan los aislamientos homotáticos de producir de manera asexual descendencia homotática le permite al patógeno un rápido crecimiento de su población en el tejido de la planta, así como una rápida propagación de aislamientos homotáticos hacia plantas dentro de la misma parcela y parcelas vecinas. El presente trabajo demostró que el control químico debe ser sustituido como el principal método de control para *P. infestans* en cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*), no sólo por su deficiencia de control, sino por el riesgo que representa para la salud pública y su posible impacto en la biología de *Phytophthora infestans*.

## ABSTRACT

This study demonstrated that the pattern of use of fungicides to control *Phytophthora infestans* in potato crops (*Solanum tuberosum*) is unsustainable because the cleaning-up costs of excesses of fungicides exceed the income than the one that could be obtained during the life span of plots that apply above the recommended doses. From commercial potato crops treated with metalaxyl were obtained homothallic strains of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl, which were able to produce oospores themselves, which are the initial inoculum for epidemics and represent the mean for sexual recombination. Was determined that the homothallism is a genetic condition to spread the Late Blight because homothallic isolates were able to produce homothallic offspring through sporangia and zoospores production. The ability of the homothallic isolates to produce asexually homothallic offspring allows the pathogen a rapid population growth in the plant tissue and the rapid spread of homothallic isolates to plants within the same plot and neighbors plots. This study demonstrated that chemical control must be replaced as the principal control method for *P. infestans* in commercial potato crops not only for its control deficiency, but yes for the risk to public health and its possible impact on the biology of *P. infestans*.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA.....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Producción y Sostenibilidad del Cultivo de Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) en el Estado de México, México.....	2
2.2. Tizón Tardío de la papa ( <i>Phytophthora infestans</i> ).....	5
2.3. Control químico del Tizón Tardío ( <i>Phytophthora infestans</i> ) .....	6
2.3.1. Metalaxil .....	8
III. JUSTIFICACIÓN .....	10
IV. HIPÓTESIS.....	11
V. OBJETIVOS.....	12
5.1. Objetivo general.....	12
5.2. Objetivos específicos.....	12
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
6.1. Identificación del patrón de uso de metalaxil y su costo de remoción.....	13
6.1.1. Área de estudio .....	13
6.1.2. Marco de muestreo de productores de papa .....	15
6.1.4. Cantidad de fungicidas utilizados.....	15
6.1.5. Análisis estadístico.....	16
6.1.6. Análisis de costos por remoción de fungicidas en suelo.....	16
6.2. Determinación del tipo de apareamiento de los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> .....	17
6.2.1. Origen de los aislamientos.....	17
6.2.2. Determinación del tipo de apareamiento .....	18
6.2.3. Comprobación del homotalismo.....	18
6.3. Valoración de la resistencia al metalaxil en los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> .....	19
6.3.1. Valoración de la resistencia al metalaxil .....	19
6.3.2. Evaluación del efecto fungicida de metalaxil .....	20
6.4. Valoración de la capacidad de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> para producir oosporas .....	21

6.4.1. Enfrentamientos para la producción de oosporas.....	21
6.4.2. Cuantificación de oosporas.....	23
6.4.3. Análisis estadístico.....	23
6.5. Valoración de la capacidad de los aislamientos homotáticos de <i>Phytophthora infestans</i> para producir progenie homotática. ....	23
6.5.1. Producción de progenie asexual.....	23
6.5.2. Determinación de tipo de apareamiento de la progenie .....	24
VII. RESULTADOS.....	26
Capítulo I. Análisis del costo de remoción de fungicidas utilizados en el control del tizón tardío ( <i>Phytophthora infestans</i> ) del cultivo de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	26
Capítulo 2. First Report of Homothallic Isolates of <i>Phytophthora infestans</i> in Commercial Potato Crops ( <i>Solanum tuberosum</i> ) in the Toluca Valley, Mexico. 34	
Capítulo 3. Presencia de aislamientos homotáticos de <i>Phytophthora infestans</i> en cultivos de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México.....	36
Capítulo 4. Otros resultados sin publicar.....	44
4.1. Aislamientos homotáticos de <i>Phytophthora infestans</i> presentan capacidad de producir progenie homotática y oosporas. (Artículo listo para ser enviado a la revista ITEA-Información Técnica Económica Agraria).....	44
4.2. Evaluación del efecto fungistático del metalaxil sobre los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> .....	61
VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	62
IX. CONCLUSIONES GENERALES .....	68
X. REFERENCIAS .....	70
XI. ANEXOS .....	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Código de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> obtenidos de <i>Solanum tuberosum</i> en distintas localidades y años.	17
Cuadro 2.	Código y tipo de apareamiento de los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> .	22
Cuadro 3.	Propiedades de los fungicidas utilizados en el cultivo de papa.	30
Cuadro 4.	Rendimiento de acuerdo al sistema de producción y nivel de dosis de fungicida utilizada.	31
Tabla 5.	Porcentaje de crecimiento relativo <i>in vitro</i> de los aislados de <i>Phytophthora infestans</i> recuperados de tejidos de <i>Solanum tuberosum</i> infectados.	41
Tabla 6.	Código y tipo de apareamiento de los aislamientos utilizados en el estudio.	58
Tabla 7.	Tipo de apareamiento de la progenie de los aislamientos homotálicos a partir de zoosporas individuales.	59
Tabla 8.	Cantidad de oosporas producidas en los cruzamientos entre los aislamientos estudiados y aislados heterotálicos, y por autofertilización.	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Oosporas de <i>Phytophthora infestans</i> .	6
Figura 2.	Estructura química del metalaxil.	8
Figura 3.	Localización de los predios de papa estudiados (Zinacantepec, Estado de México. México).	14
Figura 4.	Excedentes de fungicidas aplicados por hectárea en el cultivo del municipio de Zinacantepec en el ciclo de riego.	30
Figura 5.	Distribución de fungicidas por superficie destinada al cultivo de papa en el municipio de Zinacantepec.	31
Figura 6.	Excedentes de fungicidas aplicados por hectárea en el cultivo del municipio de Zinacantepec en el ciclo de temporal.	31
Figura 7.	Localización de los predios de papa de donde se obtuvieron los aislados de <i>Phytophthora infestans</i> (Zinacantepec, Estado de México. México).	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

(SIAP):	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
(WHO):	World Health Organization.
(CIP):	Centro Internacional de la Papa.
(PNNT):	Parque Nacional Nevado de Toluca.
(CADER):	Centro de Apoyo al Desarrollo Rural.
(DDR):	Distrito de Desarrollo Rural.
(CICOPLAFEST):	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.
(FRAC):	Fungicide Resistance Action Committee.
(SAS):	Statistical Analysis Systems
(INEGI):	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
(CR):	Crecimiento Relativo.
(DMCF):	Diámetro medio de la cepa crecida en medio de cultivo agar-jugo V8 con una concentración determinada de fungicida.
(DMCT):	Diámetro medio de la cepa crecida en medio de cultivo agar-jugo V8 sin fungicida.
(MN):	Moneda nacional.
( $K_{oc}$ ):	Coefficiente de partición en materia orgánica.
( $K_d$ ):	Constante de adsorción.
( $t_{1/2}$ ):	Vida media.
(SMAEDOMEX):	Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El Tizón Tardío, enfermedad de la papa causada por el patógeno *Phytophthora infestans* (Fry y Goodwin, 1997), ocasiona pérdidas económicas mundiales aproximadas a 6.70 billones de dólares (Haverkort *et al.*, 2008). Se ha observado que las cepas de *Phytophthora infestans* colectadas en el Valle de Toluca son genéticamente diversas, donde la reproducción sexual juega un papel importante, y mejora la aptitud del patógeno al generar genotipos recombinantes que pueden ser más patogénicos (Gavino *et al.*, 2000) al producir oosporas, las cuales son capaces de sobrevivir en el suelo durante muchos años, resistiendo condiciones ambientales adversas. En muchos agroecosistemas, las oosporas germinan al inicio de una temporada, lo cual representa el inóculo inicial para las epidemias en los cultivos (Grünwald y Flier, 2005). El principal método de control del Tizón Tardío es el químico, demandando 80% de los fungicidas empleados en el control de enfermedades del cultivo de papa (Haverkort *et al.*, 2008). El metalaxil es el fungicida más utilizado en la enfermedad del Tizón Tardío ya que es el que tiene mejores resultados en el control, sin embargo dado sus propiedades químicas le confieren alto peligro para la salud pública al ser tóxico y presenta facilidad para dispersarse y contaminar los cuerpos de agua (WHO, 2009).

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Producción y Sostenibilidad del Cultivo de Papa (*Solanum tuberosum*) en el Estado de México, México

La papa (*Solanum tuberosum*) es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo, después del arroz y el trigo, más de mil millones de personas la consumen; con una producción mundial total de aproximadamente 300 millones de toneladas (CIP, 2013). De acuerdo con el SIAP (2010) en México se sembró una superficie de 55 645.53 hectáreas de papa (*Solanum tuberosum*), obteniendo una producción de 1.50 millones de toneladas de esta hortaliza que representa menos de 0.5 % de la superficie agrícola del país, mientras que en el Estado de México se sembraron 4 036.50 hectáreas, con un rendimiento promedio de 26.71 toneladas por hectárea (SIAP, 2010), ubicándose como el sexto Estado productor. La producción de papa en el Estado de México se lleva a cabo bajo dos regímenes de humedad: riego y temporal; donde el sistema de producción de temporal representa el 87.2% y el del riego el 12.8% (SIAP, 2012).

Desde el punto de vista ambiental, el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los más perjudiciales al suelo, debido a los elevados niveles de nitrógeno que se aplican en un tiempo relativamente corto; dado el rápido desarrollo de la planta, sin embargo, su sistema radicular es corto y presenta una baja eficiencia en la absorción de los elementos nutritivos (Muñoz *et al.*, 2006), por lo que se sugiere que las dosis de nitrógeno sean fraccionadas durante el ciclo del cultivo (Errebhi *et al.*, 1998). Para el caso particular del Valle de Toluca se recomienda

que la aplicación del fertilizante sea en dos fracciones (Rubio, 2012), sin embargo, esta práctica no es común en los sistemas de producción de temporal, los cuales abarcan la mayor parte de la superficie de papa, por lo que la aplicación nitrogenada se hace en una sola ocasión antes de establecer el cultivo, permitiendo que se lixivie gran parte del fertilizante.

Por otra parte, la principal causa de daño al medio ambiente es por la gran cantidad de fungicidas utilizados para controlar *Phytophthora infestans*, causante de la enfermedad conocida como Tizón Tardío, principal patógeno que afecta al cultivo de papa, pudiendo llegar a devastar cultivos completos cuando las condiciones ambientales le son favorables, y ocasiona pérdidas económicas aproximadas a 6.70 billones de dólares anuales en todo el mundo (Haverkort *et al.*, 2008). Si estos fungicidas exceden la dosis de absorción, pueden causar externalidades al contaminar el suelo y disminuir su productividad, inducir patógenos resistentes, provocar riesgo potencial a la salud pública, además de generar costos de remoción de los excedentes de fungicidas y agroquímicos aplicados al cultivo de papa y que terminan acumulándose en los suelos o lixiviándose en las aguas subterráneas.

En México, el cultivo de papa emplea el 20% del total de fungicidas agrícolas utilizados en el país, por lo que ocupa el primer lugar en el uso de estos insumos (Fuentes, 1991).

En el cultivo de papa se utilizan insumos que son suministrados por la naturaleza, como lo son: el suelo, el agua y el aire, así como insumos fabricados por el ser humano: como lo son los agroquímicos. Una vez que estos insumos son procesados, ya sea en la etapa de producción o en la de consumo, regresan al ecosistema donde son asimilados para ser útiles nuevamente como insumos. La naturaleza, entonces, proporciona dos funciones esenciales en la producción de papa: a) insumos en la forma de recursos naturales y b) capacidades asimilativas como receptor de desechos. Dado que estas funciones son determinadas por procesos químicos y biológicos específicos, existe un límite para la cantidad máxima de material que puede ser extraída como insumo y descargada como desecho. Por lo tanto, el crecimiento de la agricultura no puede rebasar los límites de estas dos funciones naturales sin poner en peligro su propia viabilidad. De ello se deduce que para lograr un desarrollo sostenible el insumo de materia prima y energía no debe rebasar la capacidad regenerativa, y el producto de desechos de materiales y energía debe estar dentro de los límites de capacidad de absorción (Ruiz, 2001). Por lo que las prácticas de manejo del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) pueden causar daños ambientales al emplear cantidades excesivas de agroquímicos, y probablemente el daño más grave es la contaminación del suelo. Entonces, el suelo puede actuar como un sumidero de contaminantes, o bien es posible que los contaminantes se filtren a través del suelo y lleguen a contaminar las aguas subterráneas, esto depende de las propiedades del suelo y las propiedades químicas del contaminante.

## 2.2. Tizón Tardío de la papa (*Phytophthora infestans*)

Se ha observado que las poblaciones de *P. infestans* en el Valle de Toluca son diferentes a las de otras zonas del mundo con respecto a la biología, genética e historia de evolución. El Valle de Toluca es considerado el centro de origen de *Phytophthora infestans*, y tiene una población que ha co-evolucionado con especies nativas de *Solanum spp.*, (Grunwald y Flier, 2005).

En el Valle de Toluca, *Phytophthora infestans* presenta una reproducción sexual evidenciada por la formación de oosporas en hojas, tallos y tubérculos en especies de *Solanum* silvestres y cultivadas (Fernández *et al.*, 2002; Flier *et al.*, 2001; Gallegly y Galindo, 1958), donde se encuentran los dos grupos sexuales conocidos como A1 y A2 en una proporción 1:1 (Goodwin *et al.*, 1992; Grunwald *et al.*, 2001). Las oosporas (**Figura 1**) tienen dos funciones principales en el ciclo de vida de *P. infestans*, en primer lugar, son las estructuras de resistencia del patógeno, las cuales pueden sobrevivir en el suelo por muchos años resistiendo ambientes adversos y aplicaciones de agroquímicos, y por lo tanto, son la fuente de inóculo inicial para las epidemias en los siguientes ciclos de cultivo, en segundo lugar, proporcionan un medio para la recombinación sexual, lo que permite el desarrollo de nuevos genotipos recombinantes que pueden ser más patogénicos, virulentos y resistentes a los fungicidas (Gavino *et al.*, 2000).

Para que se lleve a cabo la reproducción sexual deben estar presentes los dos grupos sexuales (A1 y A2), por lo que cada cepa es heterotálica al necesitar el tipo

de apareamiento complementario para llevar a cabo la reproducción sexual. Las cepas A1 secretan la hormona  $\alpha 1$ , la cual induce la producción de oosporas en las cepas A2, mientras que la hormona  $\alpha 2$ , secretada por las cepas A2, induce la producción de oosporas en las cepas A1, cada hormona se mueve de un talo a otro para estimular la producción de oogonios y anteridios, cada talo es capaz de producir ambas estructuras sexuales, por lo que cada talo es bisexual (Chern *et al.*, 1996; Judelson, 1997; Ko, 1988). Durante la reproducción sexual el anteridio se envuelve alrededor de la base del oogonio, penetrándolo y fertilizándolo, produciendo la oospora (Gallegly y Galindo, 1958).

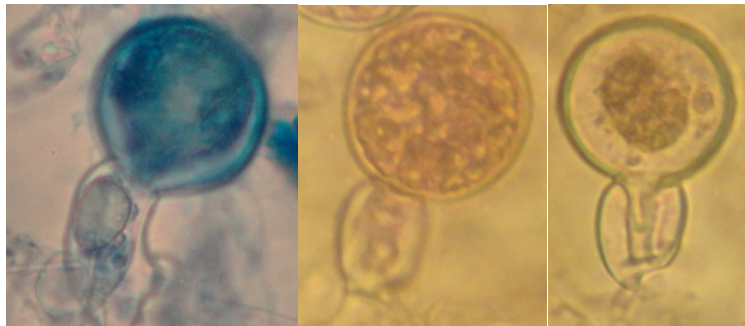


Figura 1. Oosporas de *Phytophthora infestans*.  
Fuente: Carlos Alfonso López Orona

### 2.3. Control químico del Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*)

El control de *Phytophthora infestans* se ha dificultado en gran medida por las características particulares del patógeno, como: a) la estructura de la tubulina (la proteína implicada en la fase mitótica de la división celular) en *Phytophthora infestans* es diferente a la de los hongos verdaderos, por lo que *P. infestans* es insensible a los fungicidas que su acción bioquímica es por unión a la tubulina, b) la pared celular de *P. infestans* contiene celulosa y no quitina, como es común en

los hongos, por lo tanto *P. infestans* es insensible a los químicos del grupo de las polioxinas, c) *Phytophthora infestans* no requiere esteroides para su crecimiento, por lo cual es insensible a los fungicidas que inhiben la síntesis del esteroide (Erwin y Ribeiro, 1996).

También se han desarrollado productos químicos como el Fosetil-Aluminio, un fungicida sistémico que pertenece al grupo químico de los alcohol-fosfonatos, que presenta control sobre *P. infestans* en el tubérculo, sin embargo, no es efectivo en el follaje de la planta, porque se descompone al ponerse en contacto con el etanol y el ácido fosfórico de los tejidos foliares de la planta.

Posteriormente, se fabricó el metalaxil, lo cual fue un avance importante en la historia del control de *P. infestans*, al encontrarse que era tóxico para *P. infestans* a bajas concentraciones (<1ppm) y presentaba una acción sistémica en la planta.

El método de control más utilizado para *Phytophthora infestans* es el químico. Sin embargo, pese a la gran cantidad de fungicidas utilizados, este método no ha sido totalmente eficaz por que se han utilizado productos químicos que fueron desarrollados para utilizarse en hongos verdaderos, por lo que para *Phytophthora infestans* presentan un efecto fungistático (detiene el crecimiento del patógeno, sin matarlo).

### 2.3.1. Metalaxil

Metalaxil pertenece al grupo químico de las fenilamidas, cuya fórmula química es:  $C_{15}H_{21}NO_4$ , y su estructura química se muestra en la **Figura 2**. Metalaxil inhibe la síntesis del ARN ribosomal por su efecto específico supresivo en la actividad de la ARN polimerasa I, lo que provoca la inhibición del crecimiento del patógeno al privar a la célula de los ribosomas que regulan la síntesis de proteínas (Davidse, 1987, 1988; Davidse *et al.*, 1991; Schwinn y Urech, 1986).

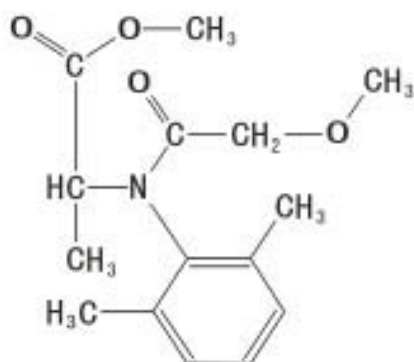


Figura 2. Estructura química del metalaxil.

Fuente: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. En línea: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/metalaxil.pdf>

El metalaxil ha sido el producto químico más utilizado en la enfermedad del Tizón Tardío al inhibir el crecimiento del patógeno, sin embargo, no detiene por completo la germinación de esporangios y zoosporas por la gran cantidad de ribosomas presentes en estas estructuras, sólo tiene efecto fungistático. Por primera vez en 1980 en Irlanda y los Países Bajos se reportaron cepas de *P. infestans* resistentes al metalaxil (Davidse *et al.*, 1981; Dowley y O'Sullivan, 1981). Una de las teorías que existen a la resistencia de metalaxil es por mutación, ya que el mecanismo de

acción del producto es sobre un solo blanco (Dekker, 1977; Georgopoulos, 1987; Goodwin *et al.*, 1992; Schwinn y Margot, 1991; Shattock, 1988). También se ha especulado que *Phytophthora infestans* es naturalmente insensible a metalaxil, al observarse cepas insensibles en poblaciones que nunca habían estado expuestas al producto químico, por lo que la existencia de poblaciones insensibles a metalaxil fue el resultado de la presión de selección que el metalaxil ejerció sobre las cepas naturalmente insensibles (Matuzak *et al.*, 1994).

Actualmente, metalaxil es ampliamente utilizado en el control de *Phytophthora infestans*, sin embargo, sus propiedades químicas le confieren alto peligro para la salud pública al ser tóxico y presenta facilidad para dispersarse y contaminar los cuerpos de agua (WHO, 2009). Aunado a lo anterior, Groves y Ristaino (2000) demostraron que ciertos aislamientos de *Phytophthora infestans* se comportaron como homotáticos al ser capaces de producir oosporas por sí solos al exponerlos a diversos fungicidas, así los aislamientos resistentes a metalaxil produjeron mayor número de oosporas que los sensibles a este fungicida, por lo que los fungicidas pueden estar actuando como imitadores de hormonas al unirse a los receptores de las hormonas de tipo de apareamiento de *P. infestans*.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los excedentes de fungicidas aplicados en el cultivo de papa representan un riesgo potencial a la salud pública, no sólo al consumir directamente el tubérculo contaminado por estos compuestos, sino también por la contaminación difusa que pueda existir hacia los cuerpos de agua, por lo cual es necesario determinar si los fungicidas utilizados exceden el límite de capacidad de absorción del suelo. Así mismo, al intentar controlar a *Phytophthora infestans* con metalaxil se puede incrementar la dificultad de control haciéndolo más patogénico. Es por lo anterior que es necesario determinar la existencia de aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* en cultivo comerciales de papa que son tratados con metalaxil.

## IV. HIPÓTESIS

El patrón de uso de fungicidas para el control de *Phytophthora infestans* en los predios de cultivos comerciales de papa supera los límites recomendables, generando costos de remoción y cambio en el tipo de reproducción de las cepas de *Phytophthora infestans* aisladas de cultivos comerciales de papa que son tratados con metalaxil.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Determinar los costos de remoción de contaminantes del suelo derivado del uso de metalaxil para controlar el Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*) de la papa, así como valorar la capacidad para producir oosporas en los aislamientos de *Phytophthora infestans* resistentes a metalaxil de cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*).

### 5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el patrón de uso de metalaxil para controlar *Phytophthora infestans* en el Valle de Toluca.
2. Estimar el costo de remoción de los excedentes de fungicidas utilizados en cultivos de papa del Valle de Toluca.
3. Determinar el tipo de apareamiento de los aislamientos de *Phytophthora infestans* de cultivo de papa del Valle de Toluca que son tratados con metalaxil.
4. Valorar la resistencia al metalaxil de los aislamientos de *Phytophthora infestans* de cultivos de papa del Valle de Toluca.
5. Valorar la capacidad de producir oosporas de los aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de cultivos comerciales de papa que son tratados con metalaxil.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Identificación del patrón de uso de metalaxil y su costo de remoción

#### 6.1.1. Área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Zinacantepec, ubicado a los 19° 17' 00" de latitud norte y a los 99° 44' 00" de longitud oeste del meridiano de Greenwich, y a una altitud de 2 740 msnm. Este municipio consta de una extensión de 30 868 hectáreas, de las cuales 19 440 pertenecen al Parque Nacional Nevado de Toluca (PNNT). Este municipio destina 611 hectáreas de temporal y 147 hectáreas de riego para el cultivo de papa, ubicándose como el segundo municipio productor en el Estado de México (SIAP, 2010). La superficie estudiada se encuentra a una altitud entre los 3 000 a 3 500 msnm (**Figura 3**).



Figura 3. Localización de los predios de papa estudiados (Zinacantepec, Estado de México. México).

Fuente: López Orona, C. A., Peñuelas Rivas, C. G., Arteaga Reyes, T.T., y Martínez Campos, A. R. 2013. Análisis del costo de remoción de fungicidas utilizados en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Revista Internacional de Contaminación Ambiental 29 (4), 295-301.

### **6.1.2. Marco de muestreo de productores de papa**

Se eligió a los productores por muestreo estratificado aplicando la metodología descrita por Scheaffer *et al.* (1986), clasificándolos de acuerdo con el sistema de producción: a) riego y b) temporal. Se encuestó a 43 productores de papa de un total de 71 productores del municipio de Zinacantepec, con base en la superficie sembrada de papa por productor, registrada en las bases de los Centros de Apoyo al Desarrollo Rural (CADER) y de los Distritos de Desarrollo Rural (DDR) del Estado de México. El estudio abarcó 181 hectáreas de temporal y 46 hectáreas de riego, todas incorporadas al PNNT.

### **6.1.3. Encuestas**

Se utilizaron cuestionarios de preguntas abiertas y cerradas (Briones, 1996) con tres secciones: económica (precio de mercado y costos de producción), productiva (superficie sembrada, rendimiento, número de ciclos de siembra, fertilización y riego) y prácticas de control del patógeno (fungicidas utilizados, dosis, frecuencia y modo de aplicación).

### **6.1.4. Cantidad de fungicidas utilizados**

Para determinar la cantidad anual y excedentes de ingredientes activos utilizados, se investigó la composición y concentración de cada fungicida en el catálogo oficial de plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004), y la dosis recomendada para cada uno de estos por el Comité de Acción para la Resistencia a Fungicidas (2011) (FRAC, por sus siglas en inglés), así como la superficie de siembra, la dosis de

estos fungicidas utilizada en campo, la frecuencia de aplicación de los mismos y el sistema de producción (riego o temporal). La acumulación y destino de los fungicidas se determinó por recopilación de información de las siguientes propiedades para cada grupo químico que conforma el ingrediente activo: coeficientes de partición en materia orgánica ( $K_{OC}$ ), constantes de adsorción ( $K_d$ ), vidas medias ( $t_{1/2}$ ) y categoría toxicológica.

#### **6.1.5. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante prueba de Tukey a nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1998).

#### **6.1.6. Análisis de costos por remoción de fungicidas en suelo**

La estimación de los costos de remoción de contaminantes se determinó por analogía con los costos reportados en el proceso de electro-remediación de suelos aplicado por la empresa Environmental & Technology Services en 1997 (Loo y Chilingar, 1997) actualizados a valor presente de acuerdo con la inflación reportada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2011), considerando un alcance de acumulación de los fungicidas durante el ciclo de vida de la parcela de medio metro de profundidad y una densidad real del suelo de 1.33 kg/L (equivalente a 6.65 toneladas de suelo contaminado por hectárea).

## 6.2. Determinación del tipo de apareamiento de los aislamientos de *Phytophthora infestans*

### 6.2.1. Origen de los aislamientos

Los aislamientos se obtuvieron a partir de follaje infectado de cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*) del municipio de Zinacantepec. El código y número de aislamientos se muestran en el **Cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Código de aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de *Solanum tuberosum* en distintas localidades y años.

Localidad <sup>a</sup>	Año <sup>b</sup>	Código <sup>c</sup>
La Peñuela	2011	LP1
	2011	LP2
	2011	LP3
	2011	LP4
	2011	LP5
	2012	LPT1
	2012	LPT2
	2012	LPT3
	2012	LPT4
	2012	LPT5
	2012	LPT6
Raíces	2012	RR1
	2012	RR2
	2012	RT1
	2012	RT2
Buenavista	2012	BV1
	2012	BV2
	2012	BVT1
	2012	BVT2
	2012	BVT3

<sup>a</sup>Localidad donde estaban establecidos los cultivos comerciales de papa de donde fueron obtenidos los aislamientos de *Phytophthora infestans*.

<sup>b</sup>Año que se obtuvieron los aislamientos de *Phytophthora infestans*.

<sup>c</sup>Determinado en base a la localidad y sistema de producción (riego o temporal) de donde fueron obtenidos los aislamientos de *Phytophthora infestans*.

Fuente: López Orona, C.A., Martínez Campos, A.R., Peñuelas Rivas C.G., Arteaga Reyes, T.T., Ruiz Olmos, C.A., Gómez Tenorio, M.A. y Palmero, D. 2013. Presencia de aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 109 (4), 408-414.

### **6.2.2. Determinación del tipo de apareamiento**

Se determinó el tipo de apareamiento de los aislamientos de *P. infestans* bajo la metodología descrita por Erwin y Ribeiro (1996). Cada aislamiento fue enfrentado con los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2) que fueron proporcionados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (México). Los enfrentamientos se realizaron bajo una temperatura de 15°C y en oscuridad utilizando medio agar-jugo V8. Se realizaron observaciones diarias a partir del tercer día de contacto entre los aislados de referencia y los originarios del campo, hasta que fueron encontrados oogonios, anteridios y oosporas. Los aislamientos que sólo produjeron estructuras sexuales y oosporas al ser enfrentados con el aislado de referencia J104 (A1) fueron determinados como tipo de apareamiento A2, y los que sólo produjeron estructuras sexuales y oosporas al ser enfrentados con el aislado de referencia J204 (A2) fueron determinados como tipo de apareamiento A1. Los aislamientos que produjeron estructuras sexuales y oosporas con ambos aislados de referencia (A1 y A2) y por sí solos, fueron determinados como homotálicos (Guo *et. al.*, 2010; Han *et. al.*, 2013). Como controles se realizó la prueba de cultivar solos los aislados heterotálicos y el enfrentamiento entre los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2).

### **6.2.3. Comprobación del homotalismo**

Se produjo progenie de los aislamientos homotálicos a partir de esporangios individuales. A cada aislamiento homotálico se le desprendieron esporangios al añadir 10 ml de agua estéril a la caja Petri con el aislamiento en medio de cultivo

agar-jugo V8. Un ml de la concentración homogénea de esporangios se cultivó en una caja Petri con medio de cultivo agar-jugo V8. Después de 30 horas a 17°C, 8 esporangios germinados tomados al azar de cada aislamiento homotático fueron transferidos a medio de cultivo agar-jugo v8 con centeno (Caten y Jinks, 1968). Posteriormente, a cada aislamiento se le determino su tipo de apareamiento como es descrito en el apartado 6.2.2.

### **6.3. Valoración de la resistencia al metalaxil en los aislamientos de *Phytophthora infestans***

#### **6.3.1. Valoración de la resistencia al metalaxil**

La valoración de la resistencia se determinó bajo la propuesta planteada por el FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, 1992), donde el cálculo se hace a partir del crecimiento relativo (CR) expresado por:

$$\text{CR} = (\text{DMCF}/\text{DMCT}) \times 100$$

Donde, **DMCF**: diámetro medio de la cepa crecida en medio de cultivo agar-jugo V8 con una concentración determinada de fungicida.

**DMCT**: diámetro medio de la cepa crecida en medio de cultivo agar-jugo V8 sin fungicida (testigo).

Partiendo del criterio empleado por Goodwin *et al.* (1996) donde el testigo (sin fungicida) es considerado como 100% del crecimiento, los aislamientos que mostraron más de 40% de crecimiento relativo al testigo en presencia de 5.0 µg/ml (ingrediente activo) de metalaxil fueron considerados resistentes. Las dosis

ensayadas fueron 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0,  $\mu\text{l/ml}$  (ingrediente activo) de metalaxil incorporados al medio de cultivo (agar-jugo V8) después de la esterilización y de enfriado el medio para evitar degradar el producto. Se realizaron 3 repeticiones por aislamiento de *Phytophthora infestans*. La siembra de cada placa de Petri se realizó mediante una pastilla de 8mm de diámetro tomada del borde del crecimiento activo de una colonia en agar-jugo V8. La incubación se realizó en estufa y en oscuridad a 19°C. Dos diámetros perpendiculares para cada aislado fueron medidos a los 9 días de incubación y después fueron promediados.

Para la elaboración del medio de cultivo agar-jugo V8 se utilizó la propuesta de Miller (1955). Se utilizaron los siguientes materiales con sus cantidades:

- \* 200 ml de jugo V8.
- \* 3 gr de carbonato de calcio.
- \* 20 gr de agar.

Los materiales se colocaron en un sólo matraz y se aforó a 1 litro con agua destilada, posteriormente, se esterilizó el medio por 30 minutos en autoclave a 121°C.

### **6.3.2. Evaluación del efecto fungicida de metalaxil**

Para determinar el efecto fungicida (matar al patógeno) o fungistático (detiene el crecimiento del patógeno sin matarlo) del metalaxil sobre los aislamientos de *Phytophthora infestans*, estos fueron expuestos a concentraciones de 100.0 y 300.0  $\mu\text{l}$  de ingrediente activo de metalaxil por ml de medio de cultivo agar-jugo

V8. Los aislamientos fueron expuestos a las dosis señaladas durante una semana, y posteriormente fueron transferidos a medio de cultivo agar-jugo V8 sin fungicida. Los aislamientos que crecieron en el medio sin fungicida, se determinó que hubo un efecto fungistático, y donde no se observó crecimiento, se consideró que hubo un efecto fungicida.

#### **6.4. Valoración de la capacidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* para producir oosporas**

##### **6.4.1. Enfrentamientos para la producción de oosporas**

Los enfrentamientos se realizaron bajo la metodología descrita por Erwin y Ribeiro (1996). Discos de micelio (5 mm de diámetro) de los aislamientos de *Phytophthora infestans* (**Cuadro 2**) fueron enfrentados por separado con discos de micelio (5 mm de diámetro) de los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2) y de los aislamientos BV2 (A1) y LPT5 (A2) en cajas Petri (9 cm de diámetro) con medio de cultivo agar-jugo V8 con centeno. Los seis aislamientos homotáticos fueron enfrentados con los aislados de referencia J104 y J204 del tipo de apareamiento A1 y A2 respectivamente, y con los aislados BV2 (A1) y LPT5 (A2). Los nueve aislamientos heterotáticos del tipo de apareamiento A1 fueron enfrentados con el aislado de referencia J204 del tipo de apareamiento A2 y con el aislado LPT5 (A2). Los cinco aislados heterotáticos del tipo de apareamiento A2 fueron enfrentados con el aislado de referencia J104 del tipo de apareamiento A1 y con el aislado BV2 (A1). Los enfrentamientos para la producción de oosporas fueron realizadas bajo las mismas condiciones que los descritos en los ensayos de determinación de tipo

de apareamiento. Como controles se realizó la prueba de cultivar solos los aislados heterotálicos y el enfrentamiento entre los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2). Los aislamientos BV2 (A1) y LPT5 (A2) fueron seleccionados al azar para ver si existía diferencia en la cantidad de oosporas producidas en los enfrentamientos entre los aislamientos y las cepas de referencia. Se hizo una sola repetición de los enfrentamientos ya que se observó que el número de oosporas producidas en los enfrentamientos entre los aislamientos estudiados del mismo tipo de apareamiento y los aislados de referencia no presentaron diferencias.

**Cuadro 2.** Código y tipo de apareamiento de los aislamientos de *Phytophthora infestans*.

Aislamiento	Tipo de apareamiento
RT1	Homotálico
LPT3	Homotálico
RR1	Homotálico
LPT2	Homotálico
LP5	Homotálico
LP2	Homotálico
LPT6	A1
BV2	A1
LP4	A1
LP3	A1
RR2	A1
LPT4	A1
LP1	A1
BV1	A1
BVT2	A1
LPT1	A2
LPT5	A2
BVT3	A2
BVT1	A2
RT2	A2

#### **6.4.2. Cuantificación de oosporas**

Con ayuda de un microscopio óptico se contaron el número total de oosporas que se encontraban entre y sobre la superficie del micelio en cada caja Petri (9 cm de diámetro) veinte días después del enfrentamiento entre los aislamientos homotáticos y los aislados de referencia heterotáticos (Groves y Ristaino, 2000; Han *et. al.*, 2013). De igual manera, se cuantificaron las oosporas producidas por los aislamientos homotáticos por sí solos.

#### **6.4.3. Análisis estadístico**

Los datos del número de oosporas producidas obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ), con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

### **6.5. Valoración de la capacidad de los aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* para producir progenie homotática.**

#### **6.5.1. Producción de progenie asexual**

Se obtuvo progenie monospórica a partir de zoosporas individuales obtenidas de los aislamientos homotáticos siguiendo la metodología de Han *et. al.*, (2013). Los esporangios fueron desprendidos de la superficie del micelio de los aislados homotáticos de 10 días de edad al añadir 10 ml de agua estéril a cada caja Petri con el aislamiento en medio de cultivo agar-jugo v8 con centeno. Las zoosporas

fueron obtenidas por exposición de la suspensión de esporangios a estrés térmico, dos horas a 4°C y posterior transferencia a temperatura ambiente por 30 minutos. La suspensión de esporas se agitó por 30 segundos en un vórtex. Un ml de la concentración homogénea de zoosporas se cultivó en una caja Petri con medio de cultivo agar-jugo V8 con centeno. Después de 30 horas a 17°C las zoosporas individuales germinadas fueron transferidas a medio de cultivo agar-jugo v8 con centeno.

#### **6.5.2. Determinación de tipo de apareamiento de la progenie**

Se determinó el tipo de apareamiento de la progenie monospórica como fue descrito por Erwin y Ribeiro (1996). Cada uno de los aislamientos monospóricos fue enfrentado con los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2), que fueron proporcionados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (México) para determinar su tipo de apareamiento. Los enfrentamientos se realizaron bajo temperatura de 15°C y en oscuridad, utilizando medio de cultivo agar-jugo V8 con centeno. A partir del tercer día de contacto entre los aislamientos de referencia y la progenie se realizaron observaciones diarias hasta que fueron encontrados órganos sexuales (oogonios y anteridios anfiginos) y oosporas. Los aislamientos que sólo produjeron estructuras sexuales y oosporas al ser enfrentados con el aislado de referencia J104 (A1) fueron determinados como tipo de apareamiento A2, y los que sólo produjeron estructuras sexuales y oosporas al ser enfrentados con el aislado de referencia J204 (A2) fueron determinados como tipo de apareamiento A1. Los aislamientos que produjeron oosporas con ambos

tipos de apareamiento (A1 y A2) y por sí solos, fueron determinados como homotáticos (Guo *et. al.*, 2010; Han *et. al.*, 2013). Como controles se realizó la prueba de cultivar solos los aislados heterotáticos y el enfrentamiento entre los aislados de referencia A1 y A2.

## VII. RESULTADOS

### Capítulo I. Análisis del costo de remoción de fungicidas utilizados en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*).

Los principales fungicidas utilizados para el control de *Phytophthora infestans* en cultivos comerciales de papa en el Valle de Toluca fueron: Propamocarb, mancozeb, cymoxanil, fenamidone, metalaxil y clorotalonil. Los resultados muestran que la frecuencia de aplicación de los fungicidas pasó de dos a tres aplicaciones por temporada a dos y tres aplicaciones por semana. Las aplicaciones de metalaxil en follaje se realizaron a intervalos de 7 días para los sistemas de producción de riego y 4 para los de temporal, con más de 4 aplicaciones al año, no habiendo rotación de ingrediente activo. Los costos estimados para remover los excedentes de fungicidas fueron de 2.73 millones de pesos por ha, considerando 15 años de vida media de producción para los sistemas que aplican los fungicidas por arriba de lo recomendado, se tiene un ingreso libre máximo de 2.66 millones de pesos por ha, lo cual no cubre los costos de remoción.

Los resultados completos se encuentran contenidos en la publicación “Análisis del costo de remoción de fungicidas utilizados en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)” que se transcribe a continuación.

Rev. Int. Contam. Ambie. 29 (4) 295-301, 2013

ANÁLISIS DEL COSTO DE REMOCIÓN DE FUNGICIDAS UTILIZADOS EN EL  
CONTROL DEL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) DEL CULTIVO DE PAPA  
(*Solanum tuberosum*)

Carlos Alfonso LÓPEZ ORONA<sup>1,2</sup>, Claudia Giovanna PEÑUELAS RIVAS<sup>3</sup>,  
Tizbe Teresa ARTEAGA REYES<sup>1</sup> y Angel Roberto MARTÍNEZ CAMPOS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR)  
km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco. San Cayetano de Morelos. Toluca, Estado de México. CP 50295. México

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán-Eldorado Km. 17.5. Culiacán  
de Rosales, Sinaloa. C.P. 80398. México

<sup>3</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El Cerrillo  
Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. CP 50090. México

\*Autor responsable: amartimacar@yahoo.com.mx

(Recibido enero 2013, aceptado mayo 2013)

Palabras clave: patrón de uso, clorotalonil, metalaxil, fenamidone

RESUMEN

En el presente estudio se determinaron el patrón de uso y los costos de remoción en suelo de los fungicidas utilizados para el control de *Phytophthora infestans*, en el cultivo de papa en el municipio de Zinacatepec, Estado de México. En los predios de temporal los excedentes de clorotalonil fueron de 1.13 kg/ha de ingrediente activo, mientras que para metalaxil y fenamidone fueron de 0.65 y 0.52 kg/ha respectivamente, lo que representa el doble de los excedentes aplicados en los predios de riego. Se determinó que remediar una hectárea de suelo de cultivo de papa tiene un costo mínimo de 2.73 millones de pesos mexicanos (pesos MXN). Para el caso de las parcelas de doble ciclo en las que se emplean dosis de fungicidas arriba de lo recomendado el ingreso libre máximo durante el periodo de vida (15 años) fue de 2.66 millones de pesos MXN. Por otro lado los sistemas de riego de doble ciclo que aplican fungicidas en niveles por debajo de lo recomendado tienen vida media de 25 años, durante la cual se obtiene un ingreso real de 3.27 millones de pesos MXN/ha, lo que representa 18.65 % más de los ingresos que obtendrían durante el periodo de vida las parcelas que aplican fungicidas en dosis arriba de lo recomendado.

Key words: pattern of use, chlorothalonil, metalaxyl, fenamidone

ABSTRACT

In this study, the pattern of use and cleaning-up costs of fungicides in soils used to control *Phytophthora infestans* in potato crops were determined in the municipality of Zinacatepec, State of Mexico. In the plots of seasonal agriculture, the excesses of chlorothalonil were 1.13 kg/ha of active ingredient while for metalaxyl and fenamidone were 0.65 and 0.52 kg/ha respectively; this represents the double of excesses applied in plots of irrigation agriculture. It was determined that the minimum cost of cleaning-

up one hectare of potato crops is 2.73 million of Mexican pesos (MXN pesos). In the case of plots with a double cycle, where dose of fungicides are employed above the recommended, the maximum spare income during the period of life (15 years) was 2.66 million of MXN pesos. On other hand, the irrigation systems, with double cycles that apply fungicides at levels below the recommended dose, have an average life span of 25 years, during which a real income of 3.27 million of MXN pesos/ha is obtained. This represents an income 18.65 % higher than the one that could be obtained during the life span of plots that apply fungicides above the recommended dose.

## INTRODUCCIÓN

El uso de fungicidas ha mejorado el rendimiento de las cosechas al disminuir las enfermedades en los cultivos, sin embargo su uso puede ocasionar efectos adversos en la salud pública y al ambiente, ya sea por exposición directa o indirecta (WHO 2004).

En México, en 2010 se cosecharon 1.50 millones de toneladas de papa (*Solanum tuberosum*) en una superficie de 55 645.63 hectáreas, obteniéndose un rendimiento promedio de 27.76 toneladas por hectárea, ubicando a este cultivo en el segundo lugar nacional de la producción hortícola. El Estado de México destina para el cultivo de papa una superficie de 4036.50 hectáreas, con un rendimiento promedio de 26.71 toneladas por hectárea (SIAP 2010), ubicándose como el sexto estado productor de este cultivo en el país.

El tizón tardío (*Phytophthora infestans*) es reconocido como la principal enfermedad a nivel mundial en el cultivo de papa, ocasionando pérdidas económicas por 2.75 billones de dólares anuales (Salazar *et al.* 2009). El 80 % de los fungicidas utilizados en el cultivo de papa se destinan para controlar a *Phytophthora infestans*. Entre los fungicidas más utilizados contra este patógeno destacan el grupo de las fenilamidas, al cual pertenece el metalaxil, cuyas propiedades químicas le confieren alto peligro por su facilidad para dispersarse y contaminar los cuerpos de agua; el grupo de los aromáticos policlorados y el grupo de las imidazolinonas, a los cuales pertenecen el clorotalonil y el fenamidone, respectivamente, los que tienen gran afinidad por los suelos, lo que los hace residuos recalcitrantes (WHO 2009). Existen diversas técnicas para remover estos contaminantes, una de ellos es la electrorremediación que tiene un gran potencial debido a que se obtienen eficiencias mayores al 90 % de descontaminación de compuestos orgánicos e inorgánicos con un costo entre 230 y 675 pesos MXN por tonelada de suelo (Loo y Chilingar 1997). El objetivo de este trabajo fue determinar los costos de remoción en suelo de los fungicidas

utilizados para el control de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa en Zinacantepec.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Zinacantepec (**Fig.1**), ubicado a los 19° 17' 00" de latitud norte y a los 99° 44' 00" de longitud oeste del meridiano de Greenwich, y a una altitud de 2740 msnm. Este municipio tiene una extensión de 30 868 hectáreas, de las cuales 19 440 pertenecen al Parque Nacional Nevado de Toluca (PNNT). Este municipio destina 611 hectáreas de temporal y 147 hectáreas de riego para el cultivo de papa, ubicándose como el segundo municipio productor en el Estado de México (SIAP 2010). La superficie estudiada se encuentra a una altitud entre los 3000 y los 3500 msnm.

### Marco de muestreo de productores de papa

Se eligió a los productores por muestreo estratificado aplicando la metodología descrita por Scheaffer *et al.* (1986), clasificándolos de acuerdo con el sistema de producción: a) riego y b) temporal. Se encuestó a 43 productores de papa de un total de 71 productores del municipio de Zinacantepec, con base en la superficie sembrada de papa por productor, registrada en las bases de los Centros de Apoyo al Desarrollo Rural (CADER) y de los Distritos de Desarrollo Rural (DDR) del Estado de México. El estudio abarcó 181 hectáreas de temporal y 46 hectáreas de riego, todas incorporadas al PNNT.

### Encuestas

Se utilizaron cuestionarios de preguntas abiertas y cerradas (Briones 1996) con tres secciones: económica (precio de mercado y costos de producción), productiva (superficie sembrada, rendimiento, número de ciclos de siembra, fertilización y riego) y prácticas de control del patógeno (fungicidas utilizados, dosis, frecuencia y modo de aplicación).

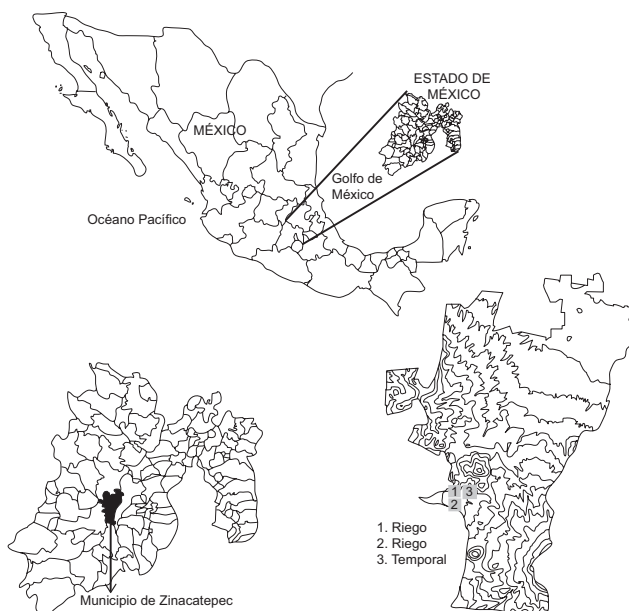


Fig. 1. Localización de los predios de papa estudiados. (Zinacatepec, Estado de México, México)

#### Cantidad de fungicidas utilizados

Para determinar la cantidad anual y excedentes de ingredientes activos utilizados, se investigó la composición y concentración de cada fungicida en el catálogo oficial de plaguicidas (CICOPLAFEST 2004), y la dosis recomendada para cada uno de estos por el Comité de Acción para la Resistencia a Fungicidas (FRAC 2011, por sus siglas en inglés), así como la superficie de siembra, la dosis de estos fungicidas utilizada en campo, la frecuencia de aplicación de los mismos y el sistema de producción (riego o temporal). La acumulación y destino de los fungicidas se determinó por recopilación de información de las siguientes propiedades para cada grupo químico que conforma el ingrediente activo: coeficientes de partición en materia orgánica ( $K_{OC}$ ), constantes de adsorción ( $K_d$ ), vidas medias ( $t_{1/2}$ ) y categoría toxicológica.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante prueba de Tukey a nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute 1998).

#### Análisis de costos por remoción de fungicidas en suelo

La estimación de los costos de remoción de contaminantes se determinó por analogía con los costos reportados en el proceso de electroremediación de suelos aplicado por la empresa Environmental & Technology Services en 1997 (Loo y Chilingar 1997), actualizados a valor presente de acuerdo con la inflación reportada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI 2011), considerando un alcance de acumulación de los fungicidas durante el ciclo de vida de la parcela de medio metro de profundidad y una densidad real del suelo de 1.33 kg/L (equivalente a 6.65 toneladas de suelo contaminado por hectárea).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 43 productores entrevistados fueron hombres, con un rango de edad entre 40 y 65 años, y un mínimo de 1.0 ha destinada para la producción de papa. El análisis de las encuestas demostró que del total de las 227 hectáreas analizadas, en 136 ha se aplicaron los fungicidas en dosis arriba de lo recomendando,

**CUADRO I.** PROPIEDADES DE LOS FUNGICIDAS UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE PAPA.

Grupo	KOC (mL g <sup>-1</sup> )	Kd (mL g <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (d)	Categoría toxicológica <sup>a</sup>
Aromático policlorados	980 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	45 – 90 <sup>c</sup>	IV
Fenilamidas	0.42 <sup>c</sup>	0.177 - 0.843 <sup>c</sup>	48 – 100 <sup>c</sup>	IV
Carbamatos	10 – 160 <sup>c</sup>	0.07 - 8.74 <sup>c</sup>	29 <sup>b</sup>	II
Carboxamidas	97 <sup>b</sup>	Ind	14 <sup>c</sup>	IV
Ditiocarbamato	998 <sup>b</sup>	9.7 <sup>b</sup>	1 – 7 <sup>c</sup>	IV
Imidazolinona	52 <sup>b</sup>	Ind	90 <sup>b</sup>	IV

<sup>a</sup>WHO (2009)

<sup>b</sup>University of Hertfordshire (2007)

<sup>c</sup>Montgomery (1997)

Ind = Información no disponible

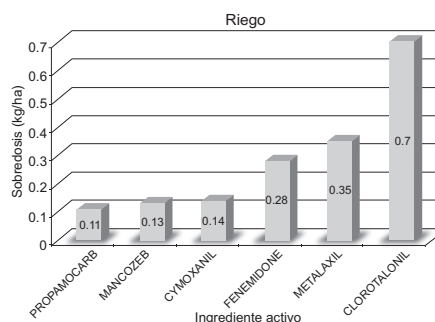
lo que representa el 60 % de la superficie agrícola analizada, en el 28.24 % de la superficie se aplican los fungicidas en la dosis recomendada y en el 11.76% se emplean dosis debajo de lo recomendado.

En 41.4 ha de riego destinada para la producción de papa (90 % de la superficie de riego analizada), se aplicaron fungicidas sistémicos directamente en el suelo para el control de *Phytophthora infestans*, y en el 60 % de la superficie de temporal, aún cuando el FRAC (2011) sugiere no realizar aplicaciones de fungicidas de acción sistémica en suelos por la presión de selección hacia las poblaciones resistentes a estos. En el caso de la aplicación de fungicidas en follaje, se observaron intervalos de aplicación de siete días en riego y cuatro en temporal con más de cuatro aplicaciones al año sin rotación del ingrediente activo, lo cual supera las recomendaciones del FRAC que sugiere intervalos mínimos de diez días y no más de dos aplicaciones al año. Nuestros resultados difieren de los reportados por Grünwald et al. (2001), quienes observaron en los años 1997 y 1998, en la misma zona de estudio, variaciones que van de dos a tres aplicaciones de fungicidas por temporada a una aplicación por semana, lo cual demuestra que el patrón de uso de los fungicidas se ha intensificado.

La información recopilada sobre el uso de fungicidas para el control de tizón tardío en el municipio de Zinacantepec reveló que los utilizados provienen de seis grupos químicos (Cuadro I). Dentro de estos destacan los carbamatos y las carboxamidas, que por ser de baja persistencia y de vidas medias cortas, tienden a adsorberse y acumularse en la materia orgánica, por lo que se espera que presenten poco peligro de contaminar a los cuerpos de agua, pero sí alta persistencia en el tubérculo. El grupo químico de las fenilamidas, al cual pertenece el metalaxil, presenta coeficiente octanol-agua (K<sub>oc</sub>) y constante de adsorción (K<sub>d</sub>)

bajos y alta persistencia (t<sub>1/2</sub> alto), características que según la WHO (2009) implican mayor peligro por la facilidad para dispersarse y contaminar los cuerpos de agua. El grupo de los aromáticos policlorados y de las imidazolinonas, a los que pertenecen el clorotalonil y el fenamidone, respectivamente, presentan alta persistencia (t<sub>1/2</sub> alto), baja movilidad y tienen mayor afinidad por los suelos (WHO 2009).

En la figura 2 se muestra, que el clorotalonil es el fungicida que alcanzó la más alta dosis en los predios de riego, con un excedente de 0.7 kg/ha de ingrediente activo, seguido por el metalaxil y el fenamidone con 0.35 y 0.28 kg/ha respectivamente. Además de lo anterior, el metalaxil y el clorotalonil fueron aplicados en el 90 % de la superficie total del cultivo de papa analizada, el fenamidone y el propamocarb en el 50 %, mientras que el cymoxanil y el mancozeb en el 35% (Fig. 3). En los predios de temporal el excedente de ingrediente activo de clorotalonil fue de 1.13 kg/ha (Fig. 4), para el metalaxil y el fenamidone de 0.65 y 0.52 kg/ha,



**Fig. 2.** Excedentes de fungicidas aplicados por hectárea en el cultivo del municipio de Zinacantepec en el ciclo de riego

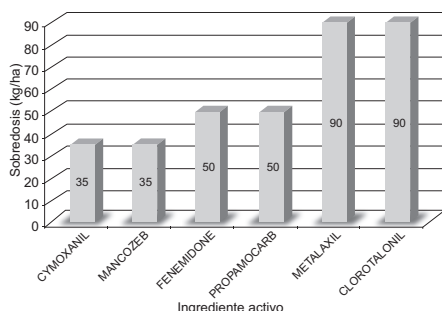


Fig. 3. Distribución de fungicidas por superficie destinada al cultivo de papa en el municipio de Zinacantepec

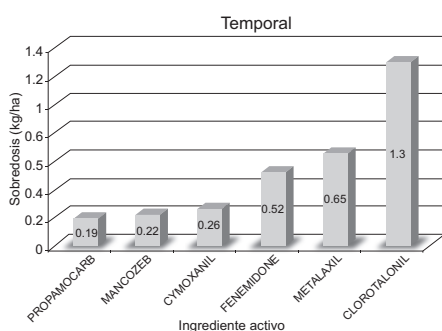


Fig. 4. Excedentes de fungicidas aplicados por hectárea en el cultivo del municipio de Zinacantepec en el ciclo de temporal

respectivamente, lo que representa el doble de los excedentes aplicados en los predios de riego. Los predios de temporal se ubican en las partes más altas de las zonas productoras de papa, por lo que se presenta contaminación difusa, ya que dadas las propiedades químicas del metalaxil, es fácil su lixiviación y arrastre desde las partes altas hasta los cuerpos de agua (Fig. 1). El clorotalonil fue aplicado en el 90 % de las parcelas analizadas y sus niveles de uso son superiores a los reportados por Guenther *et al.* (1999), quienes encontraron que en los Estados Unidos de América este compuesto fue aplicado en el 50 % de la superficie destinada al cultivo de papa, lo que demuestra que en la zona de estudio se siguen patrones de uso de fungicidas superiores a los de los países industrializados.

El análisis de varianza indicó que hay diferencias significativas en los rendimientos de producción de papa entre los dos sistemas de producción (riego y

temporal), así como entre los niveles de dosis de fungicida utilizados en cada uno de estos (Cuadro II). En los sistemas de producción de riego que aplican los fungicidas por arriba de lo recomendado se obtuvo un rendimiento promedio de 39.25 ton/ha, lo cual representa casi el doble de producción que se obtiene en sistemas de temporal que aplican los fungicidas en dosis debajo de lo recomendado por el FRAC (Cuadro II). El costo promedio de producción en los sistemas de temporal fue de 76 170.00 pesos MXN/ha y en riego de 68 153.90 pesos MXN/ha, esta diferencia se debe a la frecuencia con la que se aplican los fungicidas en cada sistema tal como fue mencionado anteriormente. Considerando un valor de mercado por kg de papa de 5.00 pesos MXN (SIAP 2010), el ingreso libre promedio por hectárea de riego aplicando los fungicidas en dosis arriba de lo recomendado fue de 128 096.10 pesos MXN, y en la de temporal de 49 130.00 pesos MXN bajo el mismo nivel de dosis empleada de fungicidas, pero con intervalos de aplicación más cortos. El 80 % de la superficie del ciclo agrícola de riego también produce papa en temporal, generando así dos ciclos de cultivo en el mismo predio, por lo que una hectárea de doble ciclo agrícola genera un ingreso libre promedio de 177 226.10 pesos MXN al año.

CUADRO II. RENDIMIENTO DE ACUERDO AL SISTEMA DE PRODUCCIÓN Y NIVEL DE DOSIS DE FUNGICIDA UTILIZADA

Sistema de producción	Nivel de dosis		
	Debajo de lo recomendado	Recomendado	Arriba de lo recomendado
Riego	35.00 <sup>e</sup>	36.25 <sup>b</sup>	39.25 <sup>a</sup>
Temporal	20.00 <sup>f</sup>	22.00 <sup>e</sup>	25.06 <sup>d</sup>

Grupo Tukey: a, b, c, d, e, f  
Nivel de significancia de 0.05

Para fines del presente estudio se consideró un costo de remediación de 410.00 pesos MXN por tonelada de suelo (valor medio de los costos reportados en el proceso de electrorremediación de Loo y Chilingar 1997), y un alcance de contaminación de medio metro de profundidad, por lo que la remoción de los excedentes de fungicidas aplicados a los cultivos de papa tiene un costo de 2.73 millones de pesos MXN/ha. Si se calcula que el tiempo promedio de vida de las parcelas donde se cultiva papa empleando dosis de fungicidas superiores a las

recomendadas es de 15 años, se estima un ingreso libre máximo de 2.66 millones de pesos MXN/ha para ambos ciclos, lo cual no alcanza a cubrir los costos de remoción de estos fungicidas. Por otro lado, los sistemas de riego que aplican fungicidas en dosis inferiores a lo recomendado obtienen un ingreso libre anual de 106 846.10 pesos MXN/ha en el ciclo de riego y de 23 830.00 pesos MXN/ha para el ciclo de temporal. Los sistemas de producción de doble ciclo que aplican los fungicidas en dosis inferiores a las recomendadas tienen una vida media de producción de 25 años, tiempo en el cual se obtiene una ganancia total de 3.27 millones de pesos MXN/ha.

Sólo en 26.69 ha (11.76 % de la superficie analizada) se aplicaron los fungicidas en dosis inferiores a lo recomendado, lo que reduce su posible acumulación en el suelo y que por tanto no haya costos de remoción. En las 200.31 ha restantes (88.21 % de la superficie analizada) lo que se obtiene son pérdidas económicas por 546.85 millones de pesos MXN por remoción de fungicidas del suelo. El cultivo de papa abarca el 5.82 % (758 ha) del total de la superficie agrícola (13 002 ha) del municipio de Zinacantepec, y el hecho de que se utilice el mismo patrón de uso de los fungicidas en el total de hectáreas del cultivo de papa hace que las pérdidas económicas asciendan a 2069.34 millones de pesos MXN por concepto de remoción de fungicidas del suelo.

El área de estudio se encuentra localizada en los límites del PNNT, que además de ser un área natural protegida, provee el 30 % del agua de infiltración natural del acuífero de Toluca y 14 % adicional de agua a la Zona Metropolitana del Valle de México (SMAEDOMEX 2011). Los excedentes de fungicidas aplicados en el cultivo de papa representan un riesgo potencial a la salud pública, no sólo al consumir directamente el tubérculo contaminado por estos compuestos, sino también por la contaminación difusa que pueda existir en los cuerpos de agua.

#### CONCLUSIONES

El patrón de uso de los fungicidas para controlar *Phytophthora infestans* en papa en el municipio de Zinacantepec es insostenible. Esto debido a que los costos de remoción de los excedentes de fungicidas aplicados rebasan las ganancias que se obtienen durante el tiempo de vida productiva de los sistemas que aplican dosis superiores a lo recomendado.

El uso de los fungicidas en concentraciones superiores a los límites establecidos sugiere la necesidad de realizar monitoreo de vigilancia en los

cuerpos de agua. Así como realizar un monitoreo constante de las poblaciones de *Phytophthora infestans* con el fin de analizar si se presenta resistencia a los fungicidas.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada a López Orona para la realización de sus estudios de Doctorado. A la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento al proyecto de investigación. A la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo otorgado a López Orona a través del Programa de Doctores Jóvenes. A los productores cooperantes del Municipio de Zinacantepec, Estado de México.

#### REFERENCIAS

- Briones G. (1996). Metodología de la investigación cuantitativa en las ciencias sociales. ICFES. Bogotá, Colombia. 217 pp.
- CICOPLAFEST (2004). Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. México D.F. 483 pp.
- FRAC (2011). Recomendaciones de uso de los fungicidas: Expert Fora Phenylamides. Fungicide Resistance Action Committee. [en línea]. <http://www.frac.info/frac/index.htm> 12/12/2011.
- Grünwald N. J., Flier W. G., Sturbaum A. K., Garay E., van den Bosch T. B. M., Smart C. D., Matuszak J. M., Lozoya H., Turkensteen L. J y Fry W. E. (2001). Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathol.* 91, 882-890.
- Guenther J. F., Wiese M. V., Pavlista A. D., Sieczka J. B y Wyman J. (1999). Assessment of pesticide use in the U.S. potato industry. *Am. J. Potato Res.* 76, 25-29.
- INEGI (2011). Índice de inflación. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Banco de información económica [en línea]. <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieinti.exe/NIVA050500001000200120#ARBOL> 10/10/2011.
- Loo W.W. y Chilingar G.V. (1997). Advances in the electrokinetic treatment of hazardous waste in soil and groundwater. *HAZMACON 97*, Santa Clara, California, pp. 1-15.
- Montgomery J.H. (1997). *Agrochemicals desk reference*. 2a ed., Lewis Publishers, Boca Raton. Nueva York, EUA. 656 pp.

- Salazar L., Winters P., Maldonado L., Hareau G. y Thiele G. (2009). Assessing the impact of late blight resistant varieties on smallholders' potato production in the Peruvian Andes. International Potato Center (CIP), Lima, Perú. 30 pp.
- SAS Institute. (1998). SAS/STAT User's Guide. Release 6.03 edition. SAS Institute Inc. Cary. Carolina del Norte, EUA. 364 pp.
- Scheaffer R. L., Mendenhall W. y Ott L. (1987). *Elementos de muestreo*. 3a ed. Iberoamericana. Distrito Federal, México. 321pp.
- SIAP (2010). Cierre de la producción agrícola: tabla producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [en línea]. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) 10/03/2011.
- SMAEDOMEX (2011). Propuesta de recategorización y decreto del parque nacional nevado de Toluca. Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México. Gobierno del Estado de México. Toluca. 83 pp.
- University of Hertfordshire (2007). Base de datos de las propiedades de plaguicidas [en línea]. [http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es\\_03/06011](http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es_03/06011).
- WHO (2004). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2002. International Programme on Chemical Safety, Interorganization Programme for the Sound Management of Chemicals. World Health Organization. Ginebra. 60 pp.
- WHO (2009). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. World Health Organization. Stuttgart. 78 pp.

**Capítulo 2. First Report of Homothallic Isolates of *Phytophthora infestans* in Commercial Potato Crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley, Mexico.**

Se determinó el tipo de apareamiento de 20 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de follaje infectado de cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*) del Valle de Toluca. Los resultados mostraron que 9 aislamientos fueron del tipo A1, 5 del tipo A2 y 6 fueron homotáticos. Los aislamientos homotáticos poseían la capacidad de actuar como A1 o A2 en los enfrentamientos heterotáticos y fueron capaces de producir estructuras sexuales y oosporas por sí solos, un fenómeno no observado en los aislamientos estrictamente A1 o A2.

Los resultados completos se encuentran contenidos en la publicación “First Report of Homothallic Isolates of *Phytophthora infestans* in Commercial Potato Crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley, Mexico” que se transcribe a continuación.

## Disease Notes (continued)

analyzed by sequence comparison of *recA* gene among other species in the genus *Erwinia* and related bacteria. The *recA* sequence of bacterial strains identified as *E. amylovora* revealed high similarity (99%) to the *E. amylovora* type strain (CFBP 1430). Genetic diversity of selected strains was assessed and compared with *E. amylovora* reference strain CFBP 1430 using ERIC and REP primers in rep-PCR analysis. (3). UPGMA cluster analysis of the combined data obtained in the rep-PCR experiments using Dice's coefficient revealed that the majority of *E. amylovora* strains showed the same fingerprint patterns at a similarity level of 93%, indicating genetic homogeneity among strains but clearly separated from *Enterobacter* sp. and *P. agglomerans* strains. To our knowledge, this is the first report that characterizes the phenotypic and genetic properties of *E. amylovora* in western part of Iran.

References: (1) S. Bereswill et al. Appl. Environ. Microbiol. 58:3522, 1992. (2) S. Bereswill et al. Appl. Environ. Microbiol. 61:2636, 1995. (3) J. Versalovic et al. Mol. Cell Biol. 5:25, 1994.

**First Report of Homothallic Isolates of *Phytophthora infestans* in Commercial Potato Crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley, Mexico.** C. A. López Orona, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco, San Cayetano de Morelos, Toluca, Estado de México, C.P. 50295, México, and Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía, Carretera Culiacán-Eldorado, Km. 17.5, Culiacán de Rosales, Sinaloa, C.P. 80398, México; A. R. Martínez, T. T. Arteaga, and H. G. García, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco, San Cayetano de Morelos, Toluca, Estado de México, C.P. 50295; D. Palmero, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), EUIT Agrícola, Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, Spain; C. A. Ruiz, Universidad de Almería (UAL), Dpto. Producción Vegetal, Cañada de San Urbano, s/n. 04120 Almería, Spain; and C. G. Peñuelas, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, CP 50090, México. This research was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), the Universidad Autónoma de Sinaloa, and the Universidad Autónoma del Estado de México. Plant Dis. 97:1112, 2013; published online as <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0962-PDN>. Accepted for publication 14 April 2013.

*Phytophthora infestans* causes severe symptoms of wilt disease on potato crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley (Mexico) despite the use of fungicides. *P. infestans* oospores produced by sexual reproduction can survive in the soil for many years, resisting harsh environments. In many agroecosystems, oospores germinate in the beginning of a season, which represents the initial inoculum for epidemics. The sexual cycle of the pathogen allows the generation of recombinant genotypes that can be more pathogenic or even resistant to chemicals. This paper presents a study of 20 isolates of *P. infestans* collected from potato crops in the Toluca Valley within the municipality of Zinacantepec (Mexico State). Isolates were obtained from potato foliar infected tissues. The pathogen was confirmed as *P. infestans* on the basis of morphological characters (1). Sporangia were caducous, ovoid, limoniform, semipapillate, and were  $28.4 \pm 1.3 \times 17.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$  (height  $\times$  width). Mycelium was coenocytic with hyphal diameter of 5 to 8  $\mu\text{m}$ . Five isolates were collected in 2011, and 15 in 2012. Isolates were transferred by hyphal tip to culture medium plates with V8 juice agar and incubated at 19°C. All the isolates were mated to determine the mating type with the reference isolates J104 (A1) and J204 (A2), which were provided by the Michoacana University of San Nicolás de Hidalgo (Mx). Isolates that produced oospores with both A1 and A2 testers (J104 and J204) and in a single culture were designated homothallic. Results show that two out of the five isolates collected in 2011 were homothallic and the other three were type A1. Regarding the 15 isolates collected in 2012, six were typed as A1, five as A2, and four were homothallic. The heterothallic isolates only produce oospores when mated with the opposite mating type. The homothallic isolates possessed the ability to act as A1 and A2 during heterothallic mating and were found capable of producing sexual structures (oogonia and amphigynous antheridia) in a single culture, a phenomenon not observed in isolates that are strictly A1 or A2. Oospores formed were aplerotic and measured  $32.2 \pm 3.3 \mu\text{m}$  in diameter. Single-sporangium progeny were produced from the six homothallic isolates to be analyzed to confirm the occurrence of the self-fertility. Assessment of 48 single-sporangium progeny from the homothallic isolates resulted in 22 homothallic, 12 A1, 10 A2, and four sterile. These results differ from those found by Grünwald et al. (3), who conducted a

study with isolates collected from the Toluca Valley region in 1997 and 1998, finding a 1:1 frequency between compatibility types A1 and A2. Fernandez et al. (2) studied a broad population of 27 isolates from potato crops in the state of Michoacán (Mx), and found two homothallic isolates among heterothallic isolates; the ratio was 1:1. Also, homothallic isolates have been found in Spain and China (4). To our knowledge, this is the first report of the occurrence of homothallic *P. infestans* isolates in commercial potato crops (*S. tuberosum*) in the Toluca Valley, Mexico.

References: (1) D. C. Erwin and O. K. Ribeiro, Page 346 in: *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1996. (2) S. P. Fernández et al. Rev. Mexicana Fitopatol. 23:191, 2005. (3) N. J. Grünwald et al. Phytopathology 91:883, 2001. (4) M. Han et al. J. Eukaryotic Microbiol. 60:79, 2013.

**First Report of Canker Disease Caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. australe* on Blueberry Bushes in Spain.** S. Castillo, C. Borrero, and R. Castaño, Dept. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. University of Seville, Ctra Utrera km 1, C.P. 41013 Seville, Spain; A. Rodríguez, BASF Española S. L. Agricultural Research Station, Ctra. A-376, km. 22.6, Apartado de correos 41, C.P. E-41710 Utrera, Seville, Spain; and M. Avilés, Dept. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. University of Seville, Ctra Utrera km 1, C.P. 41013 Seville, Spain. Plant Dis. 97:1112, 2013; published online as <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1048-PDN>. Accepted for publication 1 March 2013.

A field survey conducted in September 2009 at five plantations of six different cultivars of southern highbush blueberries (*Vaccinium* spp.) in Huelva, Spain, yielded 35 diseased plants. Diseased plants exhibited red-brown cankers and stem dieback. Blueberry cultivation in Huelva rose from 290 ha in 2007 to 777 ha in 2012, and the increase of these symptoms is of concern to producers. Stem pieces cut from the edge of lesions on infected plants were surface-disinfected with 5% sodium hypochlorite and cultured on potato dextrose agar (PDA). Based on colony characteristics on PDA, 18 colonies (one each from 18 different plants) were identified as *Botryosphaeria* spp. Species identities were confirmed by analysis of nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS), rDNA, and elongation factor 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) sequences, using ITS1-ITS4 (3) and EF728F-EF986r (2) as primer pairs, respectively. BLAST searches of GenBank showed a high similarity of the isolate sequences to the reference sequences. Molecular results confirmed these species as *Neofusicoccum parvum*, *N. australe*, and *B. dothidea*. *N. parvum* was the most prevalent (on 34% of the plants analyzed), followed by *N. australe* and *B. dothidea* (9% each). In phylogenetic analyses, isolates that clustered in the same group belonged to the same species with a high homogeneity index (>99%). One representative isolate of each species was selected for a pathogenicity assay. Amplified sequences from each selected isolate were deposited in GenBank with the following accession numbers: *N. parvum*, KC556958 (ITS) and KC556961 (EF); *N. australe*, KC556959 (ITS) and KC556962 (EF); and *B. dothidea*, KC556960 (ITS) and KC556963 (EF). The pathogenicity assay of these three isolates was conducted using two cultivars of southern highbush blueberry, 'Misty' and 'Star.' The isolates were cultured on acidified PDA at 25°C for 5 days. Stems of the plants were wounded at a height of 10 cm with a drill (5 mm diameter and ~4 mm deep). Six replicates per cultivar were inoculated per isolate by placing a colonized agar plug (4 to 5 mm diameter) in the hole and wrapping the stem with Parafilm. Plants treated identically with sterile agar plugs were used as controls. The plants were then maintained at 100% relative humidity for 2 h. This trial was conducted in a growth chamber at 28°C (night) and 30°C (day) with a 14-h photoperiod for 3 months. Disease was measured on a six-point scale: 0 = healthy plant; 1 = plant with a canker smaller than 3.5 cm; 2 = plant with a canker bigger than 3.5 cm; 3 = plant with one dry shoot; 4 = plant with some dry shoots; 5 = dead plant. At the end of the trial, disease was expressed as area under the disease progress curve. The results showed the *N. parvum* isolate to be the most aggressive, followed by the *N. australe* isolate. Espinoza et al. (1) also found that *N. parvum* showed more aggressiveness than *N. australe* on blueberries in Chile. *B. dothidea* was not pathogenic and behaved similarly to the controls ( $P < 0.05$ ). Each pathogen was reisolated from all the inoculated plants, fulfilling Koch's postulates. To our knowledge, this is the first report of isolates of these pathogens, *N. parvum* and *N. australe*, causing stem canker and dieback on blueberry bushes in Spain.

References: (1) J. G. Espinoza et al. Plant Dis. 93:1187, 2009. (2) A. J. L. Phillips et al. Mycol. 97:513, 2005. (3) T. J. White et al. Pages 315-322 in: PCR Protocols: a Guide to Methods and Amplifications. M. A. Innis et al., eds. Academic Press, San Diego, CA, 1990.

**Capítulo 3. Presencia de aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México.**

Se realizó la valoración de la resistencia al metalaxil de los aislamientos de *Phytophthora infestans* bajo la metodología planteada por el FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), donde los aislamientos que mostraron más de 40% de crecimiento relativo al testigo en presencia de 5.0 µg/ml (ingrediente activo) de metalaxil fueron considerados como resistentes al fungicida. Los aislamientos homotáticos fueron resistentes al metalaxil y procedían de cultivos de papa que fueron tratados con metalaxil.

Los resultados completos se encuentran contenidos en la publicación “Presencia de aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México” que se transcribe a continuación.

## Presencia de aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México

C.A. López-Orona<sup>\*,\*\*</sup>, A.R. Martínez-Campos<sup>\*</sup>, C.G. Peñuelas-Rivas<sup>\*\*\*</sup>,  
T.T. Arteaga-Reyes<sup>\*</sup>, C.A. Ruiz-Olmos<sup>\*\*\*\*</sup>, M.A. Gómez-Tenorio<sup>\*\*\*\*</sup>  
y D. Palmero<sup>\*\*\*\*\*,1</sup>

\* Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales. Km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco. San Cayetano de Morelos. Toluca, Estado de México. C.P. 50295. México

\*\* Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán-Eldorado Km. 17.5. Culliacán de Rosales, Sinaloa. C.P. 80398. México

\*\*\* Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. C.P. 50090. México

\*\*\*\* Universidad de Almería (UAL), Dpto. Producción Vegetal, Cañada de San Urbano s/n. 04120 15 Almería, España

\*\*\*\*\* Universidad Politécnica de Madrid. EUIT Agrícola. Ciudad Universitaria s/n. C.P. 28040. Madrid. España

### Resumen

El objetivo del presente trabajo es presentar la existencia de cepas homotáticas de *Phytophthora infestans* en los cultivos de papa tratados con metalaxil. Los aislamientos de *Phytophthora infestans* fueron obtenidos de cultivos comerciales de papa del municipio de Zinacantepec, Estado de México (México). Cada aislamiento a estudiar se enfrentó a los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2) y se cultivó solo en el mismo medio para comprobar su homotalismo. La valoración de la resistencia de los aislados estudiados se determinó bajo la metodología planteada por el FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), donde los aislamientos que mostraron más de 40% de crecimiento relativo al testigo en presencia de 5.0 µg/ml (ingrediente activo) de metalaxil fueron considerados como resistentes a la materia activa. Se encontró que de los 5 aislamientos del año 2011, dos aislamientos fueron homotáticos, y de los 15 aislados de 2012 se encontraron cuatro homotáticos. Dichos aislamientos homotáticos, fueron siempre resistentes al metalaxil. Los aislados estudiados procedían de cultivos de papa que fueron tratados con metalaxil. Los resultados obtenidos respecto al homotalismo sugieren una posible relación con el uso del metalaxil, aunque podrá no ser la única causa, dado que aislamientos heterotáticos de la misma procedencia también son resistentes al fitosanitario.

**Palabras clave:** Resistencia a fungicidas, oosporas, mildiu.

### Abstract

**Ocurrence of homothallic isolates of *Phytophthora infestans* within potato crops (*Solanum tuberosum* L.) treated with metalaxil in the Toluca Valley, Mexico**

This paper presents the occurrence of homothallic isolates of *Phytophthora infestans* within potato crops treated with metalaxyl. Isolates of *P. infestans* were obtained from potato crops within the municipal-

1. Autor para correspondencia: daniel.palmero@upm.es

<http://dx.doi.org/10.12706/itea.2013.024>

ity of Zinacantepec, State of Mexico (Mexico). Each isolate was confronted with the reference isolates J104 (A1) and J204 (A2) and cultivated in the same medium just to check the homothallism. The measurement of the metalaxyl resistance of the isolates studied was determined under the methodology proposed by the FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), where the isolates that showed more than 40% growth relative to the control in the presence of 5.0 mg (active ingredient) of metalaxyl / ml were considered resistant. Results show that two out of the five isolates collected in 2011 were homothallic. Regarding the fifteen isolates collected in 2012, four were homothallic. Such homothallic isolates were resistant to metalaxyl. Keeping in mind that the studied isolates were sampled in potato crops treated with metalaxyl and that showed resistance to this fungicide, the results suggest a possible relationship with and use of metalaxyl and the homothallism. However, it may not be the only reason because heterothallic isolates from the same origin are also resistant to metalaxyl.

**Key words:** Fungicide resistance, oospores, mildew.

### Introducción

La enfermedad del tizón tardío, causada por el patógeno *Phytophthora infestans* ha resurgido en los últimos años como una amenaza significativa para la producción de papa y tomate en todo el mundo (Fry et al., 1997). Esto puede atribuirse en gran medida a los cambios genéticos en el patógeno. Las poblaciones de *P. infestans* del centro de México son muy diversas, lo que indica que esta área es el centro de origen del agente patógeno (Goodwin, et al., 1992). La reproducción sexual de *P. infestans* produce oosporas, las cuales son capaces de sobrevivir en el suelo durante muchos años, resistiendo condiciones ambientales adversas. Las oosporas son importantes en el ciclo del oomicete, ya que el micelio y los esporangios son incapaces de sobrevivir a largo plazo, y aparte necesitan de una planta huésped. En muchos agroecosistemas, las oosporas germinan al inicio de una temporada, lo cual representa el inóculo inicial para las epidemias (Grunwald y Flier, 2005). El ciclo sexual mejora la aptitud del patógeno mediante la generación de genotipos recombinantes que pueden ser más patogénicos o resistentes a los productos químicos (Gavino et al., 2000). El objetivo de esta comunicación es presentar la existencia de cepas homotáticas de *P. infestans* en los cultivos de papa que son tratados con metalaxil.

### Materiales y métodos

#### Aislamientos

Los aislamientos utilizados en este estudio fueron obtenidos a partir de plantas de papa infectadas con *Phytophthora infestans* de cultivos comerciales del municipio de Zinacantepec (Fig. 1), este municipio destina 611 ha de secano y 147 ha en regadío para el cultivo de papa, ubicándose como el segundo municipio productor de papa del Estado de México. La mayoría de los aislamientos fueron obtenidos de cultivos de patata cv. *Alpha*, susceptible al patógeno. Veinte aislados fueron transferidos a partir de punta de hifa a medio de cultivo V8 y mantenidos a una temperatura de 19°C en oscuridad.

El código y número de los aislados se resumen en Tabla 1.

#### Determinación del tipo de compatibilidad

Los aislados fueron enfrentados para determinar su tipo de compatibilidad con los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2) que fueron proporcionados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (México). Los enfrentamientos se realizaron bajo una temperatura de 15°C y en oscuridad utilizando medio agar-jugo V8, de manera que cada ais-

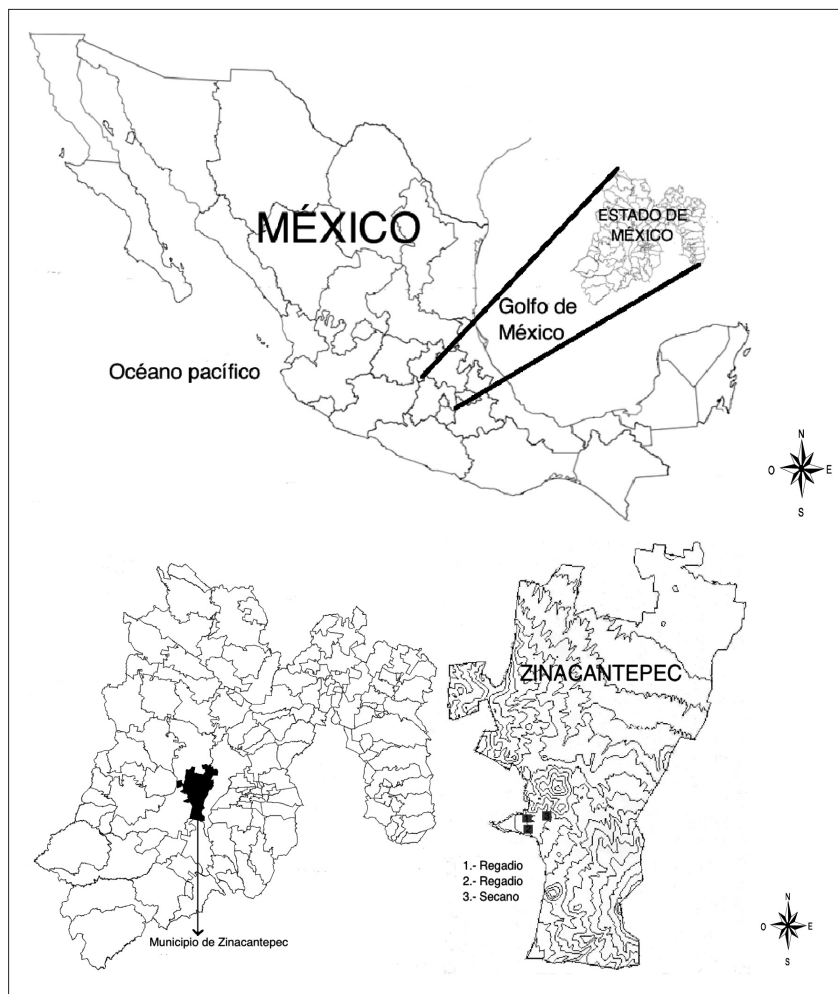


Figura 1. Localización de los predios de papa de donde se obtuvieron los aislados de *Phytophthora infestans* (Zinacantepec, Estado de México. México).  
Figure 1. Location of potato farms where isolates of *Phytophthora infestans* were obtained. (Zinacantepec, State of Mexico. Mexico).

Tabla 1. Código de aislados de *Phytophthora infestans* obtenidos de *Solanum tuberosum* en distintas localidades y años  
Table 1. Codes of *Phytophthora infestans* isolates from *Solanum tuberosum* in different locations and years

Localidad	Año	Código
La Peñuela	2011	LP1
	2011	LP2
	2011	LP3
	2011	LP4
	2011	LP5
	2012	LPT1
	2012	LPT2
	2012	LPT3
	2012	LPT4
	2012	LPT5
2012	LPT6	
Raíces	2012	RR1
	2012	RR2
	2012	RT1
	2012	RT2
Buenavista	2012	BV1
	2012	BV2
	2012	BVT1
	2012	BVT2
	2012	BVT3

lado a estudiar se enfrentó a los aislados de referencia y se cultivó solo en el mismo medio para comprobar su homotalismo. Se realizaron observaciones diarias para observar la presencia de oosporas a partir del tercer día de contacto entre los aislados de referencia y los originarios del campo, hasta que fueron encontrados oogonios, anteridios y oosporas.

#### Valoración de la resistencia al metalaxil

La valoración de la resistencia se determinó bajo la propuesta planteada por el FRAC (Fun-

gicide Resistance Action Committee, 1992), donde el cálculo se hace a partir del crecimiento relativo (CR) expresado por:

$$CR = (DMCF/DMCT) \times 100$$

Donde, **DMCF**: diámetro medio de la cepa crecida en agar-jugo V8 con una concentración determinada de fungicida.

**DMCT**: diámetro medio de la cepa crecida en agar-jugo V8 sin fungicida (testigo).

Partiendo del criterio empleado por Goodwin et al. (1996) donde el testigo (sin fungicida) fue considerado como 100% del crecimiento, los aislamientos que mostraron más de 40% de crecimiento relativo al testigo en presencia de 5.0 µg de metalaxil (ingrediente activo)/ml fueron considerados resistentes.

Las dosis ensayadas fueron 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/ml incorporados al medio de cultivo (agar-jugo V8) después de la esterilización y de enfriado el medio para evitar degradar el producto. Se realizaron 3 repeticiones por aislamiento de *P. infestans*. La siembra de cada placa de Petri se realizó mediante una pastilla de 8 mm de diámetro tomada del borde del crecimiento activo de una colonia en agar-jugo V8. La incubación se hizo en estufa y en oscuridad a 19°C. Dos diámetros perpendiculares para cada aislado fueron medidos a los 9 días de incubación y después promediados. Se estudiaron un total de 20 aislados procedentes de campos tratados con metalaxil.

#### Resultados y discusión

Los resultados experimentales muestran que, de los 5 aislados del año 2011, 2 aislados fueron homotáticos y los otros 3 fueron del tipo A1. De los 15 aislados de 2012 estudiados, 6 fueron del tipo A1, 5 del tipo A2 y 4 homotáticos. Los aislados homotáticos encontrados fueron capaces de producir órga-

Tabla 2. Porcentaje de crecimiento relativo *in vitro* de los aislados de *Phytophthora infestans* recuperados de tejidos de *Solanum tuberosum* infectados  
Table 2. Percentage of relative growth of isolates of *Phytophthora infestans* isolated from *Solanum tuberosum* in different locations and years

Aislado <sup>a</sup>	Tipo de compatibilidad	Crecimiento en metalaxil relativo al testigo <sup>b</sup>
		5.0 µl/ml
LPT6	A1	47.74 ± 0.08
LPT1	A2	46.38 ± 0.13
RT1	Homotálico	45.50 ± 0.08
LPT3	Homotálico	45.38 ± 0.06
RR1	Homotálico	45.20 ± 0.08
BV2	A1	44.65 ± 0.08
LPT5	A2	44.30 ± 0.14
LPT2	Homotálico	43.96 ± 0.08
LP4	A1	43.41 ± 0.39
LP5	Homotálico	43.40 ± 0.14
LP3	A1	42.89 ± 0.64
BVT3	A2	42.40 ± 0.08
RR2	A1	42.08 ± 0.14
LPT4	A1	41.96 ± 0.08
LP2	Homotálico	41.36 ± 0.36
LP1	A1	40.45 ± 0.78
BVT1	A2	38.82 ± 0.14
BV1	A1	37.43 ± 0.14
BVT2	A1	36.42 ± 0.08
RT2	A2	35.44 ± 0.14

<sup>a</sup> Listado en orden decreciente de crecimiento relativo a la presencia de 5.0 µl de metalaxil por ml.

<sup>b</sup> Determinado por un ensayo de crecimiento radial. El valor indicado es el promedio y desviación estándar de tres repeticiones.

nos sexuales (anteridios anfiginios y oogonios) por si mismos en las placas donde se cultivaron solos y fueron capaces de producir órganos sexuales cuando se emparejaron con los aislados de referencia. Dichos aislados

homotálicos fueron resistentes al metalaxil. Estos resultados difieren de los encontrados por Grünwald et al. (2001), quienes realizaron un estudio de aislados colectados en el la región del Valle de Toluca en los años 1997 y

1998, encontrando una frecuencia equitativa 1:1 de los tipos de compatibilidad A1 y A2, pero no relataron haber encontrado aislamientos homotáticos. No obstante, Fernández et al. (2005) estudiaron una población de 27 aislados obtenidos de cultivo de papa en el Estado de Michoacán (México), donde encontraron 2 aislados homotáticos, y una proporción 1:1 en los tipos A1 y A2. La presencia de aislados homotáticos podría estar ligada al uso de metalaxil, Groves y Ristaino (2000), demostraron que ciertos aislados heterotáticos fueron capaces de producir oosporas al exponerlos a diversos fungicidas, así los aislamientos resistentes a metalaxil produjeron mayor número de oosporas que los sensibles a metalaxil. En Israel (Rubin y Cohen, 2004 y 2006) y España (Segura et al., 2007) se han descrito aislados de *Phytophthora infestans* que, sin ser homotáticos, presentaban los dos tipos de compatibilidad. Teniendo presente que los aislados estudiados procedían de cultivos de papa que recibían tratamientos con metalaxil y que mostraron resistencia a este fungicida, los resultados obtenidos respecto al homotalismo sugieren una posible relación con el uso del metalaxil. Todos los aislamientos homotáticos mostraron resistencia al metalaxil "in vitro" (Tabla 2). Una posible interpretación es que el metalaxil puede estar influenciando en el homotalismo, pero tal vez no sea el único factor.

#### Agradecimientos

Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada a López Orona para la realización de sus estudios de Doctorado, y a la Universidad Autónoma del Estado de México por la financiación de este proyecto de investigación. López Orona agradece a la Universidad Autónoma de Sinaloa el apoyo otorgado por parte del Programa de Doctores Jóvenes.

#### Bibliografía

- Fernández Pavia SP, Rodríguez Alvarado G, Garay Serrano E, Belmar Díaz CR, Sturbaum AK, Flier W y Lozoya Saldaña H, 2005. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary provenientes de Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 191-197.
- FRAC, 1992. FRAC methods for monitoring the sensitivity of fungal pathogens to phenylamide fungicides. EPPO Bulletin 22, 297-322.
- Fry WE and Goodwin SB, 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. Bioscience 47: 363-371.
- Gavino PD, Smart CD, Sandrock RW, Miller JS, Hamm PB, Lee TY, Davis RM, Fry WE, 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: generation of an aggressive lineage. Plant Disease 84, 731-735.
- Gisi U and Cohen Y, 1995. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annu. Rev. Phytopathol. 34: 549-572.
- Goodwin SB, Sujkowski LS, Fry WE, 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxil in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. Phytopathology, 86, 793-800.
- Goodwin SB, Spielman LJ, Matuzsak JM, Bergeron SN and Fry WE, 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. Phytopathology. 82: 955-961.
- 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 NJ, Flier WG, Sturbaum AK, Garay-Serrano E, van den Bosch TBM, Smart CD, Matuzsak JM, Lozoya-Saldaña H, Turkensteen LJ and Fry WE, 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. Phytopathology 91: 882-890.
- Grunwald NJ, Flier WG, 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Ann. Rev. Phytopathol. 43, 171-190.

414

López-Orona et al. ITEA (2013), 109 (4), 408-414

Rubin E and Cohen Y, 2006. An improved method for infecting tomato leaves or seedlings with oospores of *Phytophthora infestans* used to investigate F1 progeny. Plant Dis. 90: 741-749.

Rubin E and Cohen Y, 2004. Oospores Associated with Tomato Seed May Lead to Seedborne Transmission of *Phytophthora infestans*. Phytoparasitica 32(3): 237-245.

Segura JM, de Cara M, Santos M and Tello J, 2007. *Phytophthora infestans* Mating Types on Tomato (*Solanum lycopersicum*) in Southern Spain. Plant Disease. 91: 109.

(Aceptado para publicación el 10 de mayo de 2013)

#### **Capítulo 4. Otros resultados sin publicar.**

4.1. Aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* presentan capacidad de producir progenie homotática y oosporas. (Artículo listo para ser enviado a la revista ITEA-Información Técnica Económica Agraria).

Se observó que el 56% de la progenie monospórica (zoosporas) de los aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* fue homotática. La capacidad que presentan los aislamientos homotáticos de *P. infestans* para producir progenie homotática a través de zoosporas hace que aumente rápidamente el tamaño de la población homotática en el cultivo, y permite propagarse a parcelas vecinas, y así aumentar la fuente de inóculo de la enfermedad del Tizón Tardío. El número de oosporas en los cruzamientos entre los aislamientos homotáticos y los heterotáticos del tipo A1 fue 1.8 veces mayor que el número de oosporas producidas en los cruzamientos estrictamente heterotáticos (A1 x A2). Lo anterior indica que las poblaciones de *P. infestans* con homotáticos probablemente producen mayor cantidad de oosporas que una población donde sólo se encuentran cepas heterotáticas.

Los resultados completos se encuentran en el manuscrito intitulado “Aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* presentan capacidad de producir progenie homotática y oosporas” que se presenta a continuación.

1 **Aislamientos Homotálicos de *Phytophthora infestans* presentan capacidad de producir**  
2 **progenie homotámica y oosporas**

3

4

5 **RESUMEN**

6 En el presente trabajo se observó que el 56% de la progenie monospórica (zoosporas) de los  
7 aislamientos homotálicos de *Phytophthora infestans* fue homotámica. No se encontró  
8 descendencia del tipo de apareamiento A1A2, cuya característica es producir oosporas al  
9 ser enfrentado con los tipos de apareamiento A1 y A2 pero no es capaz de producir  
10 oosporas por sí sólo. Los seis aislamientos homotálicos produjeron una proporción 1:1 en  
11 los tipos de apareamiento A1 y A2. La capacidad que presentan los aislamientos  
12 homotálicos de *P. infestans* para producir progenie homotámica a través de zoosporas hace  
13 que aumente rápidamente el tamaño de la población homotámica en el cultivo, y permite  
14 propagarse a parcelas vecinas, y así aumentar la fuente de inóculo de la enfermedad del  
15 Tizón Tardío. El número de oosporas en los cruzamientos entre los aislamientos  
16 homotálicos y los heterotálicos del tipo A1 fue 1.8 veces mayor que el número de oosporas  
17 producidas en los cruzamientos estrictamente heterotálicos (A1 x A2). Lo anterior indica  
18 que las poblaciones de *P. infestans* con homotálicos probablemente producen mayor  
19 cantidad de oosporas que una población donde sólo se encuentran cepas heterotálicas.

20 Palabras clave: homotámico, oospora, progenie.

21

22

23

24

25 **ABSTRACT**

26 In the present study we found that 56% of the progeny monosporic (zoospores) of  
27 homothallic isolates of *Phytophthora infestans* were homothallic. No progeny of A1A2  
28 mating type was found, whose characteristic is to produce oospores when faced with  
29 mating types A1 and A2 but is not able to produce oospores alone. Homothallic six isolates  
30 produced a 1:1 ratio in the mating types A1 and A2. The ability to present the homothallic  
31 isolates of *P. infestans* to produce homothallic progeny through zoospores done quickly  
32 increase the size of the population homothallic in the crop, allowing spread to neighboring  
33 plots and thus increase the inoculum source of disease Late Blight. The number of oospores  
34 in crosses between heterothallic homothallic isolates and type A1 was 1.8 times greater  
35 than the number of oospores produced strictly heterothallic crosses (A1 x A2). This  
36 indicates that populations of *P. infestans* to produce more probably homothallic oospores a  
37 population where only strains are heterothallic.

38 Keywords: homothallic, oospore, progeny.

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49 **INTRODUCCIÓN**

50 El tizón tardío, enfermedad de la papa causada por el patógeno *Phytophthora infestans* (Fry  
51 y Goodwin, 1997), ocasiona pérdidas económicas aproximadas a 6.70 billones de dólares  
52 anuales en todo el mundo (Haverkort *et al.*, 2008). *P. infestans* se reproduce de manera  
53 asexual (mediante la producción de esporangios y zoosporas, y fragmentación de micelio) y  
54 sexual (mediante la producción de oosporas). Se ha observado que las cepas de *P. infestans*  
55 colectadas en el Valle de Toluca son genéticamente diversas, donde la reproducción sexual  
56 juega un papel importante vía la producción de oosporas, las cuales son capaces de  
57 sobrevivir en el suelo por años, resistiendo condiciones ambientales adversas y mejoran la  
58 aptitud del patógeno al generar genotipos recombinantes que pueden ser mas patogénicos  
59 (Gavino *et al.*, 2000). En muchos agroecosistemas, las oosporas germinan al inicio de una  
60 temporada, lo cual representa el inóculo inicial para las epidemias en los cultivos  
61 (Grünwald y Flier, 2005). Las oosporas se forman cuando dos cepas de tipo de  
62 apareamiento opuesto, denominados A1 y A2, interactúan. Sin embargo, los aislamientos  
63 homotáticos son capaces de producir oosporas por sí solos, y tienen la capacidad de actuar  
64 como A1 y A2 en los enfrentamientos heterotáticos (Guo *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013;  
65 Alarcón *et al.*, 2013.). La reproducción asexual a partir de zoosporas le permite a *P.*  
66 *infestans* una rápida propagación en el tejido de la planta, así como hacia nuevas plantas y  
67 parcelas vecinas. El objetivo del presente trabajo fue determinar el porcentaje de progenie  
68 homotática que pueden producir los aislados homotáticos a partir de zoosporas  
69 individuales, y su capacidad de producir oosporas por sí solos y al ser enfrentados con  
70 aislados heterotáticos.

71

72

73 **MATERIALES Y MÉTODOS**

74 **Origen de los aislamientos**

75 Los aislamientos de *Phytophthora infestans* utilizados en este estudio (**Tabla 1**) fueron  
76 obtenidos de follaje infectado de cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*) del  
77 Municipio de Zinacantepec (Mx).

78

79 **Producción de progenie asexual**

80 Se obtuvo progenie monospórica a partir de zoosporas individuales obtenidas de los  
81 aislamientos homotáticos siguiendo la metodología de Han *et. al.*, (2013). Los esporangios  
82 fueron desprendidos de la superficie del micelio por adición de 10 ml de agua estéril a cada  
83 caja Petri con el aislamiento homotático de 10 días de edad de *P. infestans* crecido en medio  
84 de cultivo agar-jugo v8 con centeno. Las zoosporas fueron obtenidas por exposición de la  
85 suspensión de esporangios a estrés térmico por dos horas a 4°C y posterior transferencia a  
86 temperatura ambiente por 30 minutos. La suspensión de esporas se homogenizo por  
87 agitación mecánica durante 30 segundos. Un ml de la concentración homogénea de  
88 zoosporas se depositó en cada caja Petri con medio de cultivo agar-jugo V8 con centeno.  
89 Las cajas Petri fueron incubadas durante 30 horas a 17°C hasta desarrollo de las zoosporas,  
90 las cuales fueron transferidas individualmente a medio de cultivo agar-jugo v8 con centeno  
91 para su germinación.

92

93 **Determinación de tipo de apareamiento de la progenie**

94 Se determinó el tipo de apareamiento de la progenie monospórica siguiendo la metodología  
95 descrita por Erwin y Ribeiro (1996). Cada uno de los aislamientos monospóricos fue  
96 enfrentado con los aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2), que fueron

97 proporcionados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (México) para  
98 determinar su tipo de apareamiento. Los enfrentamientos se realizaron bajo temperatura de  
99 15°C y en oscuridad, utilizando medio de cultivo agar-jugo V8 con centeno. A partir del  
100 tercer día de contacto entre los aislamientos de referencia y la progenie, se realizaron  
101 observaciones diarias hasta que fueron encontrados órganos sexuales (oogonios y anteridios  
102 anfiginos) y oosporas. Los aislamientos que sólo produjeron estructuras sexuales y  
103 oosporas al ser enfrentados con el aislado de referencia J104 (A1) fueron determinados  
104 como tipo de apareamiento A2, y los que sólo produjeron estructuras sexuales y oosporas al  
105 ser enfrentados con el aislado de referencia J204 (A2) fueron determinados como tipo de  
106 apareamiento A1. Los aislamientos que produjeron oosporas con ambos tipos de  
107 apareamiento (A1 y A2) y por sí solos, fueron determinados como homotáticos (Guo *et.*  
108 *al.*, 2010; Han *et. al.*, 2013). Como ensayos control se realizó la prueba de cultivar solos los  
109 aislados heterotáticos y el enfrentamiento entre los aislados de referencia A1 y A2.

110

#### 111 **Enfrentamientos para la producción de oosporas**

112 Los enfrentamientos se realizaron bajo la metodología descrita por Erwin y Ribeiro (1996).  
113 Discos de micelio (5 mm de diámetro) de los aislamientos de *Phytophthora infestans*  
114 (**Tabla I**) fueron enfrentados por separado con discos de micelio (5 mm de diámetro) de los  
115 aislados de referencia J104 (A1) y J204 (A2) y de los aislamientos BV2 (A1) y LPT5 (A2)  
116 en cajas Petri (9 cm de diámetro) con medio de cultivo agar-jugo V8 con centeno. Los seis  
117 aislamientos homotáticos fueron enfrentados con los aislados de referencia J104 y J204 del  
118 tipo de apareamiento A1 y A2 respectivamente, y con los aislados BV2 (A1) y LPT5 (A2).  
119 Los nueve aislamientos heterotáticos del tipo de apareamiento A1 fueron enfrentados con el  
120 aislado de referencia J204 del tipo de apareamiento A2 y con el aislado LPT5 (A2). Los

121 cinco aislados heterotálicos del tipo de apareamiento A2 fueron enfrentados con el aislado  
122 de referencia J104 del tipo de apareamiento A1 y con el aislado BV2 (A1). Los ensayos  
123 para evaluar la producción de oosporas fueron realizadas bajo las mismas condiciones que  
124 la prueba de determinación de tipo de apareamiento. Como controles se realizó la prueba de  
125 cultivar solos los aislados heterotálicos y el enfrentamiento entre los aislados de referencia  
126 J104 (A1) y J204 (A2).

127 Los aislamientos BV2 (A1) y LPT5 (A2) fueron seleccionados al azar para evaluar  
128 si existía diferencia en la cantidad de oosporas producidas en los enfrentamientos entre los  
129 aislamientos a estudiar y los aislados de referencia. Se hizo una sola repetición de los  
130 enfrentamientos ya que se observó el número de oosporas producidas en los  
131 enfrentamientos entre los aislamientos estudiados del mismo tipo de apareamiento y los  
132 aislados de referencia no presentaron diferencias.

133

#### 134 **Cuantificación de oosporas**

135 Con ayuda de un microscopio óptico se contaron el número total de oosporas que se  
136 encontraban entre y sobre la superficie del micelio en cada caja Petri (9 cm de diámetro)  
137 veinte días después del enfrentamiento entre los aislamientos homotálicos y los aislados de  
138 referencia heterotálicos (Groves y Ristaino, 2000; Han *et. al.*, 2013). De igual manera, se  
139 cuantificaron las oosporas producidas por los aislamientos homotálicos por sí solos.

140

141

142

143

144 **Análisis estadístico**

145 Los datos del número de oosporas producidas obtenidos para cada uno de los ensayos se  
146 sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ),  
147 con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002)

148

149 **RESULTADOS**

150 Progenie de los aislados homotálicos

151 Los ensayos de valoración de la progenie monospórica de los seis aislados homotalicos  
152 demuestran que el 56% del total de su progenie fue homotalica (**Tabla II**). El aislamiento  
153 LPT2 fue quien presento el menor porcentaje de progenie homotámica (47.6%), en contraste  
154 los porcentajes de progenie homotalica de los aislados RT1 y LP5 fueron los más altas con  
155 valores mayores a 62 %.

156 El porcentaje de descendencia estéril para los seis aislados fue del 2% al 4.8%. No se  
157 encontró descendencia del tipo de apareamiento A1A2, cuya característica es producir  
158 oosporas al ser enfrentado con los tipos de apareamiento A1 y A2 pero no es capaz de  
159 producir oosporas por sí sólo.

160 Los seis aislamientos homotálicos produjeron en promedio 9.5 aislamientos del tipo de  
161 apareamiento A1(21% del total de la progenie), y 9.17 del tipo de apareamiento A2 (20%  
162 del total de la progenie), dando una proporción 1:1 en los tipos de apareamiento A1 y A2.

163 El aislamiento LPT2 fue el que produjo el mayor número de progenie del tipo de  
164 apareamiento A1 con 12 aislamientos (28.6% del total de su progenie), en contraste el  
165 aislamiento LPT3 fue el que produjo menor progenie del tipo A1 (17.5% del total de su  
166 progenie). El aislamiento RRI fue el que mayor progenie del tipo de apareamiento A2  
167 produjo (26.0% del total de su progenie), mientras que los aislamientos LP5 y LPT2 fueron

168 los que presentaron los menores porcentajes de progenie del tipo A2 (15.7% y 19% del total  
169 de la progenie respectivamente).

170

171 Producción de oosporas

172 El análisis de varianza indicó que no hay diferencias significativas en el número de  
173 oosporas producidas en los cruzamientos entre los aislamientos homotáticos y el aislado de  
174 referencia J104 (A1) y entre los aislamientos homotáticos y el aislamiento BV2 (A1) (la  
175 media de los ensayos fue 49 oosporas por cruzamiento), pero sí se encontró diferencia  
176 significativa al comparase con los cruzamientos entre los aislamientos homotáticos y el  
177 aislado de referencia J204 (A2) y con los aislamientos BV2 (A2) quienes presentaron una  
178 media de 36 oosporas por cruzamientos (**Tabla III**).

179

180 Los aislamientos homotáticos produjeron por sí solos en promedio 28 oosporas, no  
181 encontrándose diferencia significativa con el número de oosporas producidas en los  
182 cruzamientos estrictamente heterotáticos. Al enfrentar los aislamientos heterotáticos del  
183 tipo A1 con el aislado de referencia J204 (A2) se obtuvieron en promedio 27.5 oosporas  
184 por cruzamiento, similar al número de oosporas obtenidas en los ensayos de cruzamiento  
185 con el aislamiento LPT5 (A2). En los enfrentamientos entre los aislamientos heterotáticos  
186 del tipo A2 con el aislado de referencia J104 (A1) y con el aislamiento BV2 (A1) se  
187 obtuvo en promedio 28 oosporas por cruzamiento (**Tabla III**).

188

#### 189 **DISCUSIÓN**

190 La mayor parte de la progenie monozoospórica de los aislamientos homotáticos de  
191 *Phytophthora infestans* fue homotática. Cada aislamiento monozoospórico homotático

192    mostró la capacidad de actuar como A1 y A2 durante el apareamiento heterotálico y fue  
193    capaz de producir estructuras sexuales (oogonios y anteridios anfiginos) y oosporas por sí  
194    solo, un fenómeno no observado en los aislamientos estrictamente heterotálicos.

195

196    La capacidad que presentan los aislamientos homotálicos de *P. infestans* para producir  
197    progenie homotálica a través de zoosporas lo hace más patogénico al poder aumentar  
198    rápidamente el tamaño de la población homotálica en el cultivo, y poder propagarse a  
199    parcelas vecinas, y así aumentar la fuente de inóculo de la enfermedad del Tizón Tardío.

200

201    En el presente estudio se encontró que el número de oosporas producidas en los  
202    cruzamientos entre los aislamientos homotálicos y los heterotálicos del tipo A1 fue mayor  
203    que las producidas en los cruzamientos entre los aislamientos homotálicos y los  
204    heterotálicos del tipo A2, así como también por el número de oosporas producidas por  
205    autofertilización de los aislamientos homotálicos (**Tabla III**). Por lo anterior, se deduce que  
206    el desarrollo sexual de los aislamientos homotálicos estudiados es mayormente favorecido  
207    por la hormona de apareamiento  $\alpha 1$  producida por los aislamientos del tipo de  
208    apareamiento A1.

209

210    La cantidad de oosporas producidas por los aislamientos homotálicos lo determina el tipo  
211    de apareamiento con el que se cruzan, ya que el análisis de varianza indicó que no hay  
212    diferencias significativas en la cantidad de oosporas producidas en los cruzamientos entre  
213    los aislamientos homotálicos y los heterotálicos del mismo tipo de apareamiento (**Tabla**  
214    **III**).

215

216 El número de oosporas en los cruzamientos entre los aislamientos homotáticos y los  
217 heterotáticos del tipo A1 fue 1.8 veces mayor que el número de oosporas producidas en los  
218 cruzamientos estrictamente heterotáticos (A1 x A2) (**Tabla III**), y lo esperado era que  
219 produjeran igual número de oosporas, como sí lo fue el número de oosporas producidas por  
220 autofertilización de los aislamientos homotáticos. Lo anterior indica que las poblaciones de  
221 *P. infestans* con homotáticos probablemente producen mayor cantidad de oosporas que una  
222 población donde sólo se encuentran cepas heterotáticas.

223

224 La presencia de cepas homotáticas de *P. infestans* no se limita al Valle de Toluca,  
225 recientemente, Alarcón *et al.*, (2013) determinaron el tipo de apareamiento de una  
226 población de 88 aislamientos de *P. infestans* obtenidos de cultivo de papa en Chapingo,  
227 Estado de México (Mx), donde predominó la población homotática con una frecuencia de  
228 0.761, y las frecuencias de los tipos A1 y A2 fueron 0.125 y 0.114, respectivamente. Han *et*  
229 *al.*, (2013) estudiaron una población de 85 aislamientos de *P. infestans* obtenidos de cultivo  
230 de papa en la Provincia de Gansu (China), donde encontraron 15 aislamientos homotáticos  
231 y 70 del tipo A1. Fernández *et al.*, (2005) estudiaron una población de 27 aislamientos  
232 obtenidos de cultivo de papa en el Estado de Michoacán (México), donde encontraron 2  
233 aislamientos homotáticos, y una proporción 1:1 en los tipos A1 y A2. Segura *et al.*, (2007)  
234 estudiaron tres aislamientos de *P. infestans* obtenidos de cultivo de tomate en Almería y  
235 Granada (España), donde encontraron 2 aislamientos homotáticos y uno del tipo A1A2.

236

237 La capacidad que presentan los aislamientos homotáticos de actuar como A1 y A2 en los  
238 apareamientos heterotáticos aumenta la probabilidad de que ocurra la reproducción sexual

239 en campo. El ciclo sexual mejora la aptitud del patógeno mediante la generación de  
240 genotipos recombinantes que pueden ser más patogénicos, virulentos y resistentes a los  
241 productos químicos (Gavino *et al.*, 2000).

242

243 Las poblaciones homotálicas son altamente virulentas y genéticamente variables, lo cual les  
244 permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Alarcón *et al.*, 2013). Por todo lo  
245 anterior, es probable que el tizón tardío de la papa continuará siendo un importante  
246 problema para la producción de esta hortaliza.

247

248

#### AGRADECIMIENTOS

249 Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la  
250 beca otorgada a López Orona para la realización de sus estudios de Doctorado, a la  
251 Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento al proyecto de  
252 investigación, a la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo otorgado a López Orona  
253 a través del Programa de Doctores Jóvenes.

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264 **BIBLIOGRAFÍA**

- 265 Alarcón Rodríguez N. M., Lozoya Saldaña H., Valadez Moctezuma E., García-Mateos M.  
266 R. y Colinas-León M. T. Genetic diversity of potato late blight [*Phytophthora infestans*  
267 (Mont) de Bary] at Chapingo, México. *Agrociencia* 47: 593-607. 2013.
- 268 Erwin D. C., y Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American  
269 Phytopathological Society. St. Paul, United States of America. 562 pp.
- 270 Fernández Pavia S.P., Rodríguez Alvarado G., Garay Serrano E., Belmar Díaz C.R.,  
271 Sturbaum A.K., Flier W. y Lozoya Saldaña H. 2005. Caracterización de aislamientos de  
272 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Revista*  
273 *Mexicana de Fitopatología* 23: 191-197.
- 274 Fry W.E y Goodwin S.B. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience*  
275 47: 363- 371.
- 276 Gavino P.D., Smart C.D., Sandrock R.W., Miller J.S., Hamm P.B., Lee T.Y., Davis R.M.,  
277 Fry W.E. 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the  
278 United States: generation of an aggressive lineage. *Plant Disease* 84: 731-735.
- 279 Groves, C. T., and Ristaino, J. B. 2000. Commercial fungicide formu- lations induce in  
280 vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*.  
281 *Phytopathology* 90:1201-1208.
- 282 Grünwald N.J., Flier W.G. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of  
283 origin. *Annual Review of Phytopathology* 43:171-190.
- 284 Guo, L., Zhu, X.-Q., Hu, C.-H., y Ristaino, J. B. 2010. Genetic structure of *Phytophthora*  
285 *infestans* populations in China indicates multiple migration events. *Phytopathology*  
286 100:997-1006.
- 287 Han M., Liu, G., Li J.P., Govers F., Zhu, X.Q., Shen C.Y. and Guo L.Y. 2013.  
288 *Phytophthora infestans* Field Isolates from Gansu Province, China are Genetically Highly  
289 Diverse and Show a High Frequency of Self Fertility. *Journal of Eukaryotic Microbiology*,

- 290 60: 79–88.
- 291 Haverkort A. J., Boonekamp P. M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L. A. P., Kessel G. J. T. ,  
292 Visser R. G. F., van der Vossen E. A. G. 2008. Societal Costs of Late Blight in Potato and  
293 Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research* 51:47-  
294 57.
- 295 SAS (Statistical Analysis System Institute). 2002. SAS/STAT User's Guide, Software  
296 version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 27513. USA
- 297 Segura J. M., de Cara M., Santos M., and Tello J. 2007. *Phytophthora infestans* Mating  
298 Types on Tomato (*Solanum lycopersicum*) in Southern Spain. *Plant Disease* 91:109.
- 299
- 300
- 301
- 302
- 303
- 304
- 305
- 306
- 307
- 308
- 309
- 310
- 311

312 **TABLAS**

313

314 Tabla I. Código y tipo de apareamiento de los aislamientos  
 315 de *Phytophthora infestans* utilizados en el estudio.  
 316

Aislamiento	Tipo de apareamiento
RT1	Homotático
LPT3	Homotático
RR1	Homotático
LPT2	Homotático
LP5	Homotático
LP2	Homotático
LPT6	A1
BV2	A1
LP4	A1
LP3	A1
RR2	A1
LPT4	A1
LP1	A1
BV1	A1
BVT2	A1
LPT1	A2
LPT5	A2
BVT3	A2
BVT1	A2
RT2	A2

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327 Tabla II. Tipo de apareamiento de la progenie de los aislamientos homotáticos a partir de  
 328 zoosporas individuales

Tipo de apareamiento de la progenie  Aislamientos Homotáticos	A1		A2		A1A2		Estéril		Homotático		TOTAL	
	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje
	RT1	10	19.0	9	17.0	0	0.0	1	2.0	32	62	52
RR1	10	22.0	12	26.0	0	0.0	2	4.0	22	48.0	46	100
LP5	10	19.6	8	15.7	0	0.0	1	2.0	32	62.7	51	100
LPT3	7	17.5	9	22.5	0	0.0	1	2.5	23	57.5	40	100
LPT2	12	28.6	8	19.0	0	0.0	2	4.8	20	47.6	42	100
LP2	8	18.2	9	20.5	0	0.0	1	2.3	26	59.1	44	100
$\bar{x}$	9.5±1.7	21	9.1±1.4	20	0.0±0.0	0	1.3±0.5	3	25.8±5.1	56	45.8±4.8	

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352 Tabla III. Cantidad de oosporas producidas en los cruzamientos entre los aislamientos  
353 estudiados y aislados heterotálicos, y por autofertilización

Aislamientos estudiados	Aislados heterotálicos	Tipo de apareamiento A1		Tipo de apareamiento A2		Autofertilización
		J104*	BV2**	J204*	LPT5**	
		Homotálicos	RT1	48	50	
	LPT3	49	48	36	37	28
	RR1	49	47	37	34	28
	LPT2	50	49	34	35	29
	LP5	51	50	36	36	28
	LP2	47	49	37	38	29
	$\bar{x}$	<b>49.00<sup>a</sup></b>	<b>48.83<sup>a</sup></b>	<b>35.83<sup>b</sup></b>	<b>36.00<sup>b</sup></b>	<b>28.33<sup>c</sup></b>
Tipo de apareamiento A1	LPT6	-	-	27	28	-
	BV2	-	-	28	28	-
	LP4	-	-	30	27	-
	LP3	-	-	28	27	-
	RR2	-	-	25	26	-
	LPT4	-	-	26	27	-
	LP1	-	-	27	26	-
	BV1	-	-	28	27	-
	BVT2	-	-	29	29	-
	$\bar{x}$			<b>27.55<sup>c</sup></b>	<b>27.22<sup>c</sup></b>	
Tipo de apareamiento A2	LPT1	28	28	-	-	-
	LPT5	28	27	-	-	-
	BVT3	27	27	-	-	-
	BVT1	29	28	-	-	-
	RT2	27	28	-	-	-
	$\bar{x}$	<b>27.80<sup>c</sup></b>	<b>27.60<sup>c</sup></b>			

354

355

356

357

358

\* : Aislados de referencia proporcionados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

\*\* : Aislados obtenidos de follaje infectado de papa. Su tipo de compatibilidad fue determinado al enfrentarlos con los aislados de referencia J104 y J204

- : Sin producción de oosporas

Grupo Tukey: <sup>a,b,c</sup> Nivel de significancia de 0.05

359

360

361

#### **4.2. Evaluación del efecto fungistático del metalaxil sobre los aislamientos de *Phytophthora infestans***

Metalaxil mostró un efecto fungistático en el total de aislamientos de *Phytophthora infestans*. Los veinte aislamientos crecieron en medio de cultivo agar-jugo V8 sin fungicida después de haber sido sometidos a dosis de 100 y 300 µl de metalaxil por ml de medio de cultivo agar-jugo V8 durante una semana. Lo que demuestra que el compuesto químico no tiene un efecto fungicida sobre los aislamientos estudiados.

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

El principal método de control de *Phytophthora infestans* ha sido el químico, se ha tratado con productos químicos que fueron diseñados para hongos y no para oomicetes. El desarrollo del metalaxil fue un avance importante en la historia del control de *P. infestans* al encontrarse que era tóxico al oomicete a bajas concentraciones (<1ppm), por lo cual este compuesto químico fue ampliamente usado. Sin embargo, en 1980 en Irlanda y los Países Bajos se reportaron las primeras cepas de *P. infestans* resistentes al metalaxil (Davidse *et al*, 1981; Dowley y O'Sullivan, 1981).

El Valle de Toluca no fue la excepción de presencia de cepas resistentes al metalaxil. Grünwald *et al.* (2001) en los años 1997 y 1998 estudiaron una población de 71 aislamientos de *P. infestans* colectados de parcelas localizadas entre los 3000 y 3500 msnm, ellos observaron que el 16.9% de los aislamientos de *P. infestans* fueron resistentes al metalaxil bajo el criterio de Goodwin *et al.* (1996) al mostrar un crecimiento relativo al testigo mayor del 40% en presencia de 5.0 µg/ml (ingrediente activo) de metalaxil. En el presente estudio se observó que el 80% de los aislamientos colectados en parcelas ubicadas a la misma altitud durante los años 2011 y 2012, fueron resistentes a 5 ppm de metalaxil,.

En los años 1997 y 1998 Grünwald *et al.* (2001), observaron para la misma zona de estudio (3000-3500msnm), variaciones que van de dos a tres aplicaciones de fungicidas por temporada a una aplicación por semana y para la zona productora

de papa del Valle de Toluca ubicada entre los 2600 y 2900 msnm observaron, que se realizaban de 2 a 3 aplicaciones de fungicidas por semana, además encontraron que el 34.1% de los aislamientos de esta zona presentaron resistencia a 5 ppm de metalaxil. Por otra parte se encontró que en las parcelas donde fue más intensificado el uso de fungicidas, fue mayor el porcentaje de aislamientos resistentes al metalaxil.

En el presente trabajo se evidenció un cambio en la frecuencia de la aplicación de metalaxil. Las aplicaciones de fungicidas en follaje, se realizaron en intervalos de siete días en riego y cuatro en temporal con más de cuatro aplicaciones al año sin rotación del ingrediente activo, lo cual supera las recomendaciones del FRAC que sugiere intervalos mínimos de diez días y no más de dos aplicaciones al año. Lo anterior demuestra que el patrón de uso de los fungicidas se ha intensificado, siendo más notable en los predios de temporal, esto probablemente ha sido la causa del incremento en la proporción de aislamientos de *P. infestans* resistentes al metalaxil.

Los veinte aislamientos de *P. infestans* crecieron en medio de cultivo agar-jugo V8 sin fungicida después de haber sido sometidos durante una semana a dosis de 100 y 300 ppm de metalaxil, lo que demuestra que su efecto es sólo fungistático.

Pese a lo anterior, actualmente metalaxil sigue siendo utilizado ampliamente para controlar *P. infestans* en los cultivos comerciales de papa, de hecho su uso, así

como el de otros fungicidas se ha intensificado. Los predios de temporal se ubican en las partes más altas de las zonas productoras de papa, por lo que se puede presentar contaminación difusa, ya que dadas las propiedades químicas del metalaxil, es fácil su lixiviación y arrastre desde las partes altas hasta los cuerpos de agua.

El presente trabajo demostró que el patrón de uso de fungicidas utilizados en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) para controlar *Phytophthora infestans* es insostenible. Los costos de remoción de los excedentes de fungicidas aplicados rebasan las ganancias que se obtienen durante el tiempo de vida productiva de los sistemas que aplican dosis superiores a lo recomendado. En Finlandia no se permite el uso de productos con metalaxil para la producción de semilla de papa, y en Noruega y Dinamarca sólo se permite una sola aplicación de metalaxil por temporada en la producción de papa (Cooke, 2011).

El uso de fungicidas no solo representa un peligro a la salud pública, también contribuye a cambios en la biología de reproducción de *P. infestans*. Groves y Ristaino (2000) demostraron que ciertos aislamientos heterotáticos fueron capaces de producir oosporas al ser expuestos a diversos fungicidas, encontraron que los aislamientos resistentes a metalaxil produjeron mayor número de oosporas que los sensibles a metalaxil.

Las oosporas tienen dos funciones principales en el ciclo de vida de *P. infestans*, en primer lugar, son las estructuras de resistencia del patógeno, las cuales pueden sobrevivir en el suelo por muchos años resistiendo ambientes adversos y aplicaciones de agroquímicos, y por lo tanto, son el inóculo inicial para las epidemias en los siguientes ciclos de cultivo (Grünwald y Flier, 2005), en segundo lugar, proporcionan un medio para la recombinación sexual, lo que permite el desarrollo de nuevos genotipos recombinantes que pueden ser más patogénicos, virulentos y resistentes a los fungicidas (Gavino *et al.*, 2000).

De los cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*) tratados con metalaxil fueron obtenidos aislamientos homotálicos de *Phytophthora infestans* que además fueron resistentes al metalaxil. La capacidad que presentan los aislamientos homotálicos de producir de manera asexual descendencia homotámica le permite al patógeno un rápido crecimiento de su población en el tejido de la planta, así como una rápida propagación de aislamientos homotálicos hacia plantas dentro de la misma parcela y parcelas vecinas.

Los resultados obtenidos indican que las poblaciones de *P. infestans* homotámicas probablemente producen mayor cantidad de oosporas que una población donde solo se encuentran cepas heterotámicas, el uso del metalaxil puede contribuir a un aumento en la producción de oosporas. La presencia de aislamientos homotálicos en campo aumenta la probabilidad de que ocurra la reproducción sexual. El ciclo sexual mejora la aptitud del patógeno mediante la generación de genotipos

recombinantes que pueden ser más patogénicos, virulentos y resistentes a los productos químicos (Gavino *et al.*, 2000). Debido a las oosporas, la rotación de cultivos es ahora parte del control integrado del Tizón Tardío en Europa (Cooke, 2011).

La presencia de aislamientos homotáticos no se limita al Valle de Toluca, existen trabajos que reportan aislamientos homotáticos, sin embargo, no mencionan el manejo de fungicidas que tenían los cultivos de donde fueron obtenidos los aislamientos. Recientemente, Alarcón *et al.* (2013) observaron que predominó la población homotática en Chapingo, Estado de México (Mx). Han *et al.* (2013) estudiaron una población de 85 aislamientos de *P. infestans* obtenidos de cultivo de papa en la Provincia de Gansu (China), donde encontraron 15 aislamientos homotáticos y 70 del tipo A1. Fernández *et al.* (2005) estudiaron una población de 27 aislamientos obtenidos de cultivo de papa en el Estado de Michoacán (México), donde encontraron 2 aislamientos homotáticos, y una proporción 1:1 en los tipos A1 y A2. Segura *et al.* (2007) estudiaron tres aislamientos de *P. infestans* obtenidos de cultivo de tomate en Almería y Granada (España), donde encontraron 2 aislamientos homotáticos y uno del tipo A1A2.

De acuerdo con Groves y Ristaino (2000), el metalaxil puede estar influenciando el homotalismo al actuar como imitador de las hormonas del tipo de apareamiento. Por otro lado los fungicidas comerciales pueden inducir la formación de oosporas debido a la inestabilidad del locus de tipo de apareamiento en estas cepas, o los

propios fungicidas comerciales pueden ser la causa de la inestabilidad del locus del tipo de apareamiento ocasionando una trisomía (Groves y Ristaino, 2000; Judelson, 1996). Se necesita un análisis genético utilizando los marcadores moleculares ligados al locus tipo de apareamiento para probar lo anterior.

Si se sigue utilizando el control químico como el principal método de control contra *P. infestans* es probable que el Tizón Tardío de la papa continuará siendo un importante problema para la producción de esta hortaliza y un riesgo para la salud pública. En el presente trabajo se demostró que el control químico contra *P. infestans* es insostenible, por lo que debe ser sustituido. El Tizón Tardío puede ser controlado eficazmente aplicando una estrategia de control integrado que incluye el uso de variedades de papa resistentes a *P. infestans*, control de la fuente de inóculo primario, semilla libre del patógeno, correctas prácticas culturales como un manejo adecuado del riego y la fertilización correcta del cultivo, así como respetar las fechas óptimas de siembra.

El control integrado del Tizón Tardío es una alternativa para disminuir la dependencia de productos químicos, y así mejorar la calidad de vida de los productores y los consumidores, y contribuir con el desarrollo de una agricultura sostenible y poder conservar esta actividad fundamental para la vida del ser humano.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. El patrón de uso de fungicidas en dosis superiores a lo recomendado para controlar *P. infestans* en cultivos comerciales de papa (*Solanum tuberosum*) es insostenible.
2. Los excedentes de fungicidas aplicados en los cultivos de papa representan un riesgo potencial a la salud pública no sólo al consumir directamente el tubérculo contaminado por estos compuestos, sino también por la contaminación difusa que pueda existir en los cuerpos de agua.
3. En la zona de estudio se siguen patrones de uso de fungicidas superiores a los de los países desarrollados.
- 4.- El uso de fungicidas no solo representa un peligro a la salud pública, sino que también contribuye a cambios en la biología de reproducción de *P. infestans*. Se obtuvieron aislamientos homotáticos de *P. infestans* de cultivos comerciales de papa que fueron tratados con metalaxil.
5. La presencia de aislamientos homotáticos en campo aumenta la probabilidad de que ocurra la reproducción sexual, debido a que los aislamientos homotáticos tienen la capacidad de actuar como heterotáticos del tipo A1 y A2 en los

enfrentamientos heterotálicos, y son capaces de reproducir estructuras sexuales (oogonios y anteridios anfiginos) y oosporas por sí solos.

6. Se asume que en las poblaciones de *P. infestans* con homotálicos se producen mayor cantidad de oosporas que una población donde sólo se encuentran cepas heterotálicas, donde el uso del metalaxil puede contribuir en un aumento en la producción de oosporas, aumentando la fuente de inóculo del patógeno en las parcelas.

7. El control químico contra *P. infestans* debe ser sustituido como el principal método de control. El Tizón Tardío puede ser controlado eficazmente aplicando una estrategia de manejo.

## X. REFERENCIAS

- Briones, G. 1996. Metodología de la investigación cuantitativa en las ciencias sociales. ICFES. Bogotá, Colombia. 217 pp.
- Caten, C. E. y J. L. Jinks. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. Canadian Journal of Botany 46, 329-348.
- Chern, L.L., Ko, W.H. y Tang, C.S. 1996. Factors affecting yields of alpha hormones of *Phytophthora parasitica* obtained by adsorption. Canadian Journal of Microbiology 42, 172 –176.
- CICOPLAFEST. 2004. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Catálogo. México D.F. 483 pp.
- CIP. 2013. Centro Internacional de la Papa. Potato. En línea: <http://cipotato.org/potato> 15/07/2013.
- Cooke, L. R., Schepers, H. T. A. M., Hermansen, A., Bain, R. A., Bradshaw, N. J., Ritchie, F., Shaw, D. S., Evenhuis, A. Kessel, G. J. T., Wander, J. G. N., Andersson, B., Hansen, J. G., Hannukkala, A., Nærstad, R. , y Nielsen, B. J. 2011. Epidemiology and Integrated Control of Potato Late Blight in Europe. Potato Research 54, 183–222
- Davidse, L. C. 1987. Biochemical aspects of phenylamide fungicides-action and resistance. En *Modern Selective Fungicides* (H. Lyr, Ed.), pp. 275–282. Longman Scientific & Technical, New York.

- Davidse, L. C. 1988. Phenylamide fungicides: Mechanism of action and resistance. En *Fungicide resistance in North America* (C. J. Delp, Ed.), pp. 63–65. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J., y van der Wal, D. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 87, 65–68.
- Dekker, J. 1977. Resistance. En *Systemic Fungicides* (R. W. Marsh, Ed.), pp. 176–197. Longman Group Limited, London.
- Dowley, L. J., y O’Sullivan, E. 1981. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. *Potato Research* 24, 417–421.
- Errebhi, M.; Rosen, C. J.; Gupta, S. C. y Birong, D. E. 1998. Potato yield response and nitrate leaching as influenced by nitrogen management. *Agronomy Journal* 90, 10-15.
- Erwin, D. C y Ribeiro, O. K. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, 1996. 562pp.
- Fernández Pavia S.P., Grünwald, N.J., Fry, W.E. 2002. Formation of *Phytophthora infestans* oospores in nature on tubers in central Mexico. *Plant Disease* 86, 73.
- Fernández Pavia, S.P., Rodríguez Alvarado, G., Garay Serrano, E., Belmar Díaz, C.R., Sturbaum, A.K., Flier, W., y Lozoya Saldaña, H. 2005. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 191-197.

- Flier, W.G., Grünwald, N.J., Fry, W.E., Turkensteen LJ 2001. Formation, production and viability of oospores of *Phytophthora infestans* from potato and *Solanum demissum* in the Toluca Valley, central Mexico. *Mycological Research* 105, 998–1006.
- FRAC. 1992. FRAC methods for monitoring the sensitivity of fungal pathogens to phenylamide fungicides. *EPPO Bulletin* 22, 297-322.
- FRAC. 2011. Fungicide Resistance Action Committee. Recomendaciones de uso de los fungicidas: Expert Fora Phenylamides [en línea]. <http://www.frac.info/frac/index.htm> 12/12/2011.
- Fry, W.E., y Goodwin, S.B. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience* 47, 363- 371.
- Fuentes T., C. A. 1991. Mercado de Plaguicidas. 1990. Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, A.C. Huatulco, Oax. 46 p.
- Gallegly, M.E., Galindo, J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48, 274–277.
- Gavino, P.D., Smart, C.D., Sandrock, R.W., Miller, J.S., Hamm, P.B., Lee, T.Y., Davis, R.M., Fry, W.E., 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: generation of an aggressive lineage. *Plant Disease* 84, 731–735.
- Georgopoulos, S. G. 1987. The genetics of fungicide resistance. En *Modern Selective Fungicides* (H. Lyr, ,Ed.), pp. 53–61. Longman Scientific & Technical, New York.

- Gisi, U., y Cohen, Y. 1995. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annual Review of Phytopathology 34, 549-572.
- Goodwin, S. B., Drenth, A. y 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, S.B., Spielman, L.J., Matuszak, J.M., Bergeron, S.N. y Fry, W.E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. Phytopathology 82, 955–961.
- Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S. y Fry, W.E., 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. Phytopathology 86, 793-800.
- Groves, C.T. y Ristaino J.B. 2000. Commercial fungicide formulations induce in vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*. Phytopathology 90, 1201-1208.
- Grunwald, N.J. y Flier, W.G. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Annual Review of Phytopathology 43, 171-190.
- Grünwald, N.J., Flier, W.G., Sturbaum, A.K., Garay Serrano, E., van den Bosch, T.B.M., Smart, C.D., Matuszak, J.M., Lozoya Saldana, H., Turkensteen, L.J. y Fry WE 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley region of central Mexico. Phytopathology 91, 882–890.
- Guenther J. F., Wiese M. V., Pavlista A. D., Sieczka J. B y Wyman J. 1999.

- Assessment of pesticide use in the U.S. potato industry. *American Journal of Potato Research* 76, 25-29.
- Han M., Liu, G., Li J.P., Govers F., Zhu, X.Q., Shen C.Y. and Guo L.Y. 2013. *Phytophthora infestans* Field Isolates from Gansu Province, China are Genetically Highly Diverse and Show a High Frequency of Self Fertility. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60: 79–88.
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F. y van der Vossen, E. A. G. 2008. Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research* 51, 47–57.
- INEGI. 2011. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Banco de información económica: Índice de inflación. En línea: <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/NIVA050500001000200120#ARBOL> 10/10/2011.
- Judelson, H. S. 1997. Expression and inheritance of sexual preference and selfing potential in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 21,188-197.
- Ko, W.H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 26, 57–73.
- Loo W.W. y Chilingar G.V. (1997). Advances in the electrokinetic treatment of hazardous waste in soil and groundwater. En: HAZMACON 97, Santa Clara, California, pp. 1-15.
- Matuszak, J. M., Fernández Elquezabal, L., Gu, W. K., Villarreal Gonzalez, M. y Fry, W. E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Disease* 78, 911-916.

- Miller, P. M. 1955. V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45, 461-462.
- Montgomery J.H. 1997. *Agrochemicals desk reference*. 2a ed., Lewis Publishers, Boca Raton. Nueva York, EUA. 656 pp.
- Muñoz, A. F. Mylavarapu, R. S. Hutchinson, C. M. y Portier, K. M. 2006. Root distribution under seepage-irrigated potatoes in Northeast Florida. *American Journal of Potato Research* 83, 463-472.
- Rubin, E., y Cohen, Y. 2004. Oospores Associated with Tomato Seed May Lead to Seedborne Transmission of *Phytophthora infestans*. *Phytoparasitica* 32, 237-245.
- Rubin, E., y Cohen, Y. 2006. An improved method for infecting tomato leaves or seedlings with oospores of *Phytophthora infestans* used to investigate F1 progeny. *Plant Disease* 90, 741-749.
- Rubio Cobarruvias, O. A., y Cadena Hinojosa, M. A. 2012. Optimización del fraccionamiento del nitrógeno en el cultivo de papa en el Valle de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 1075-1084.
- Ruiz Sandoval, D. Comercio internacional de productos agrícolas y medio ambiente: elementos para el análisis. En *Economía para la protección ambiental, Ensayos teóricos y empíricos*. Universidad Autónoma Metropolitana. 2001. México, D.F. pp. 79-124.
- Salazar, L., Winters, P., Maldonado, L., Hareau, G. y Thiele, G. 2009. Assessing the impact of late blight resistant varieties on smallholders' potato production in the Peruvian Andes. International Potato Center (CIP), Lima, Perú. 30 pp.

- SAS Institute. 2002. SAS/STATR User's Guide. Release 6.03 edition. SAS Institute Inc. Cary. Carolina del Norte, EUA . 364 pp.
- Scheaffer R. L., Mendenhall W., Ott L. (1987). Elementos de muestreo. 3ed. Iberoamericana. Distrito Federal, México. 321pp.
- Schwinn, F. J., y Margot, P. 1991. Control with chemicals. En *Phytophthora infestans, the Cause of Late Blight of Potato* (D. S. Ingram, y P. H. Williams, Eds.),. Academic Press, London. pp. 225–265
- Schwinn, F. J., y Urech, P. A. 1986. Progress in the chemical control of diseases caused by oomycetes. En *Fungicide Chemistry-Advances and Practical Applications, ACS Symposium Series* (M. B. Green, y D. A. Spilker, Eds.), pp. 89–106. American Chemical Society.
- Segura, J.M., de Cara, M., Santos, M., y Tello, J. 2007. *Phytophthora infestans* Mating Types on Tomato (*Solanum lycopersicum*) in Southern Spain. *Plant Disease* 91, 109.
- Shattock, R. C. 1988. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 37, 4–11.
- SIAP. 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola: Tabla Producción Agrícola. En línea: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) 10/03/2011.
- SIAP. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola: Anuario estadístico de la producción agrícola. En línea:

[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) 24/08/2013.

University of Hertfordshire (2007). Base de datos de las propiedades de plaguicidas. En línea: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es> 03/06/2011.

WHO. 2004. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2002. International Programme on Chemical Safety, Interorganization Programme for the Sound Management of Chemicals. World Health Organization. Ginebra. 60 pp.

WHO. 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. World Health Organization. Stuttgart. 78 pp.