



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

EFFECTO DE TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) Y TRATAMIENTOS QUÍMICOS EN LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO EN EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

COLÍN MARÍN HUGO

Bajo la supervisión de: **Héctor Lozoya Saldaña, Ph. D.**

Chapingo, Estado de México, Junio, 2017.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
CENTRO DE SERVICIOS ESCOLARES
COMISIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES



**EFFECTO DE TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans* Mont.) de Bary) Y
TRATAMIENTOS QUÍMICOS EN LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO
SALICÍLICO EN EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)**

Tesis realizada por Hugo Colín Marín bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:

Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR:

Ph. D. María Teresa Beryl Colinas y León

ASESOR:

Dr. Marcelo Acosta Ramos

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	V
DATOS BIBLIOGRÁFICOS	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VII
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVO GENERAL.....	3
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
5. HIPOTESIS	3
CAPÍTULO II.....	4
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 Mecanismos de defensa de las plantas.....	4
1.2 Activación de la defensa.....	5
1.3 Mecanismos de defensa.....	6
1.4 Categorías generales de defensa directa	6
1.5 Sustancias químicas en las defensas directas de las plantas	7
1.6 Moléculas de señalización en defensa	7
1.7 Señalización dependiente de ácido salicílico (AS).....	8
1.8 Evidencias de relación entre ácido salicílico y enfermedades	9
2. LITERATURA CITADA.....	11
CAPÍTULO III.....	15
1. PAGINA DE PRESENTACIÓN DE ARTÍCULO.....	15
2. RESUMEN	16
3. SUMMARY	16

4. INTRODUCCIÓN	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Determinación de ácido salicílico.....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1. Cuantificación de ácido salicílico en hojas con dos aplicaciones.....	21
6.2. Cuantificación de ácido salicílico en hojas con cuatro aplicaciones. ...	23
6.3. Cuantificación de ácido salicílico en hojas con seis aplicaciones.	25
6.4. Cuantificación de ácido salicílico en los tratamientos por fungicidas ...	28
6.5. Concentración de ácido salicílico y severidad de <i>P. infestans</i>	32
7. CONCLUSIONES.....	39
8. LITERATURA CITADA.....	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Diseño de tratamientos	19
Cuadro 2: Comparaciones de medias y agrupamiento Tukey para los tratamientos con dos aplicaciones y los testigos a los 48, 55 y 62 días después de la siembra.....	23
Cuadro 3: Comparaciones de medias y agrupamiento Tukey para los tratamientos con cuatro aplicaciones y los testigos a los 48, 55, 62 y 69 días después de la siembra...	25
Cuadro 4: Comparaciones de medias y agrupamiento Tukey para los tratamientos con seis aplicaciones y los testigos a los 48, 55, 62, 69, 76, y 83 días después de la siembra.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de extracción con concentraciones conocidas de ácido salicílico a en el espectro visible a 540 nanómetros.....	20
Figura 2: Concentración de ácido salicílico en tratamientos de fungicidas con dos aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).....	22
Figura 3: Concentración de ácido salicílico en tratamientos de fungicidas con cuatro aplicaciones consecutivas de los fungicidas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).	24

Figura 4: Concentración de ácido salicílico en tratamientos con seis aplicaciones consecutivas de los fungicidas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).....	26
Figura 5: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida fluazinam con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.....	29
Figura 6: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida propamocarb clorhidrato con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.....	30
Figura 7: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida mandipropamida con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.	31
Figura 8: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida Cymoxanil + Famoxadona con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.....	31
Figura 9: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida fluazinam con dos (A), cuatro (B) y seis aplicaciones (C) consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).	33
Figura 10: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida propamocarb clorhidrato con dos (A), cuatro (B) y seis (C) aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).	34
Figura 11: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida cymoxanil+famoxadona con dos (A), cuatro (B) y seis (C) aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).	35
Figura 12: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida mandipropamida con dos (A), cuatro (B) y seis (C) aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).....	36
Figura 13: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en el testigo positivo (A) y el testigo negativo (B) (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).	37

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Departamento de Parasitología Agrícola y al programa de Posgrado en Protección Vegetal, por la darme la oportunidad de realizar estos estudios y continuar con mi preparación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante el periodo de realización de la maestría.

Al ICAMEX por las instalaciones otorgadas para el establecimiento y desarrollo de la parte de campo del experimento.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por su incondicional y absoluto apoyo como director y asesor en la realización de investigación, así como su gran labor como profesor.

A la Dra. María Teresa Colinas León por la gran ayuda y sus conocimientos brindados para la realización de la presente investigación

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por su excelente apoyo, sus conocimientos y la motivación como asesor en la realización de esta investigación, así también por su ardua y noble labor como profesor.

A todos profesores integrantes de esta fuerza académica llamada Protección Vegetal, por sus conocimientos, dedicación y entrega que me forjaron y motivaron a lograr esta meta.

A María Virginia Pérez Reyes por la motivación y compañía que siempre me brindo al realizar estos estudios.

A Rufino Aarón Gómez López, Luis Francisco Cruz Cruz y Alfredo Valdez Islas, por su incondicional apoyo en todo momento, así como, a todos mis compañeros y amigos de la maestría, con quienes compartí grandes momentos durante mi estancia.

DATOS BIOGRÁFICOS

Hugo Colín Marín, originario de Jesús del Monte, municipio de Temascaltepec, Estado de México, nacido el 17 de Febrero de 1990, en el mismo lugar. Realizó sus estudios de nivel Primaria en la escuela “Juan Escutia”, la Secundaria en “Escuela Secundaria Técnica Industrial y Comercial #35”. Los estudios de nivel medio superior y superior los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en Texcoco, Estado de México, en la generación (2004-2011). Se desempeñó como asesor técnico en la empresa “Taja Consultores y Constructores S. A. de C. V.” y en el H. Ayuntamiento Constitucional de Temascaltepec, Estado de México. Posteriormente realizó los estudios de posgrado en la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2015- 2016).

CONTENIDO DE ÁCIDO SALICÍLICO EN PAPA EN PRESENCIA DEL TIZÓN TARDÍO Y FUNGICIDAS

SALYCILIC ACID CONTENT IN POTATO WITH LATE BLIGHT AND FUNGICIDES

Hugo Colín-Marín, Héctor Lozoya-Saldaña, María Teresa Beryl Colinas-León y Marcelo Acosta-Ramos

RESUMEN

El ácido salicílico (AS) es una molécula importante de señalización en las plantas en respuesta al ataque de patógenos como el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont de Bary), siendo el cultivo de papa uno de los más afectados por esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de AS en hojas de papa en respuesta al ataque de *P. infestans* con manejo químico del oomiceto, mediante aspersión foliar semanal de cuatro fungicidas (fluazinam, propamocarb, clorhidrato, cymoxanil+famoxadona y mandipropamida) con diferente número de aplicaciones consecutivas (2, 4 y 6) a lo largo del ciclo del cultivo. Se incluyó un fungicida comercial como testigo positivo (mefenoxam-M) aplicado durante todo el ciclo, y uno negativo sin protección química. Se presentó un incremento gradual de AS en todos los tratamientos durante los primeros 55 a 62 días después de la siembra, lográndose en este periodo la máxima concentración de este compuesto en la planta y posteriormente descendió o mantuvo sus niveles bajos con variaciones, independientemente del número de aspersiones de los fungicidas. mandipropamida y mefenoxam-M fueron los que mejor controlaron al tizón (menor severidad) y los que mantuvieron más estables los niveles de AS. Cuando la severidad de *P. infestans* superó el 30%, los niveles del AS disminuyeron. Los fungicidas no presentaron efecto directo en la concentración de ácido salicílico, más bien, fue indirecto sobre la disminución del grado de severidad de *P. infestans*.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., Tizón tardío, fungicidas, reacciones de defensa.

ABSTRACT

Salicylic acid (SA) is an important signaling molecule in plants as a reaction to infection by pathogens like late blight (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), and the potato crop is one of the most affected by this disease. The objective of this study was to determine the SA levels in potato leaves as a response to *P. infestans* attack with chemical management of the oomycete, by weekly foliar spraying of four fungicides (Fluazinam, Propamocarb, Cymoxanil+Famoxadone and Mandipropamid), with a different number of consecutive sprays (2, 4, and 6) throughout the growing cycle of the crop. A commercial fungicide was included as positive control (Mefenoxam-M), applied during the whole growing cycle, and a negative control with no chemical protection was included as well. A gradual SA increase was observed in all treatments during the first 55 to 62 days after the sowing. The maximum SA concentration in the plant was detected in this period, decreasing or keeping its levels low with variations afterwards, regardless of the number of fungicide sprayings. Mandipropamid and Mefenoxam-M were the best ones for controlling the blight (lower severity) and keeping the most stable SA levels. When *P. infestans* severity was over 30 % the SA levels decreased. The fungicides did not induce a direct effect on the SA concentration, but had an indirect effect by lowering the level of *P. infestans* severity

Key words: *Solanum tuberosum* L., late blight, fungicides, defense reactions.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Phytophthora infestans (Mont) De Bary, el agente causal del “tizón tardío”, genera la más seria de las enfermedades de la papa, la cual se desarrolla más velozmente en climas templados (Agrios, 1996). El dramático potencial destructivo de este patógeno ha ocasionado que se consuman gran cantidad de fungicidas, entre los más utilizados contra este patógeno destacan el grupo de las fenilamidas, como el mefenoxam-M, el grupo de los aromáticos policlorados como el clorotalonil y el grupo de las imidazolinonas como la fenamidona (WHO 2004), esto hace que la enfermedad sea considerada una de las enfermedades más importantes en cultivos alimenticios de la agricultura mundial (Agrios, 1996; Fry, *et al.*, 1993), sin embargo, ha desarrollado resistencia a estos químicos, haciendo cada vez más difícil su control (Robledo, 2014), además, el manejo de plaguicidas puede generar daños a la salud humana y al ambiente, por lo que se están buscando nuevas alternativas de control para disminuir el ataque de este patógeno haciendo uso de herramientas que aumenten las defensas naturales de la planta, siendo el ácido salicílico una importante molécula de señalización que activa la defensa de las plantas en presencia de patógenos como *P. infestans*, esta molécula de autodefensa es regulada por la planta en presencia de patógenos o sus niveles son modificados por la aplicación de productos que activen o repriman su síntesis.

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha revelado la existencia de mecanismos de resistencia en las plantas inducidos como respuesta a patógenos (Collinge *et al.*, 1994). Ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) son importantes moléculas de señalización en respuestas de defensa a patógenos. La activación de estas respuestas difiere dependiendo del tipo de patógeno invasor. Por ejemplo, la señalización mediada por AS provee protección contra patógenos biótrophos como hongos, oomicetos, bacterias, como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasítica*, y virus, como el virus del enchinamiento del nabo (TCV) y virus del mosaico del pepino (CMV). En contraste, la señalización mediada solo por AJ/ET activa la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos tales como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* (Glazebrook, 2005).

Por lo tanto, el ácido salicílico es una vertiente de estudio para el control de *P. infestans*, ya que esta molécula de autodefensa de las plantas es regulada por la planta en presencia de patógenos o mediante la aplicación de productos a base de este compuesto, productos que induzcan su síntesis o que regulen sus niveles, por lo que en este trabajo se planteó cuantificar los niveles de ácido salicílico en hojas de papa var. Gigant, susceptible al oomiceto, en presencia de Tizón Tardío y diferentes controles químicos de la enfermedad.

3. OBJETIVO GENERAL

- Determinar los niveles de ácido salicílico en hojas de papa en presencia de *Phytophthora infestans* y fungicidas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar los niveles de ácido salicílico en el follaje de papa, conforme avanza el ciclo del cultivo y la severidad de *P. infestans*.
- Explicar dichos niveles en función de la presencia y número de aplicaciones de diversos fungicidas.

5. HIPOTESIS

- La presencia de *P. infestans* inducirá una mayor síntesis de ácido salicílico en la planta.
- La presencia de una molécula química de protección contra *P. infestans* en la planta modificara los niveles endógenos de ácido salicílico.

CAPÍTULO II

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Mecanismos de defensa de las plantas

Durante el largo tiempo de interacción y coevolución con los insectos, las plantas han desarrollado una amplia gama de mecanismos de defensa para contrarrestar los ataques de los insectos, estos mecanismos de defensa pueden ser de dos tipos: defensas preformadas por las plantas (constitutivas) y defensas inducibles. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa *estructurales constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa con *químicos constitutivos*, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Algunos ejemplos de este tipo son las plantas cianogónicas como el sorgo (*Sorghum* spp.) y la yuca (*Manihot esculenta*) que poseen cantidades considerables de compuestos relacionados con el ácido cianhídrico (HCN) (Osborn, 1996).

De esta forma, los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucra una respuesta activa del hospedero ante la presencia del patógeno.

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos de defensa inducida, también conocidos como *resistencia inducida*, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*, 1994). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998).

Este tipo de defensa ha sido ampliamente estudiado y se han definido de tres etapas: vigilancia, transducción de señales y producción de productos químicos defensivos (Walling, 2000; Kessler y Baldwin, 2002; Ferry *et al.*, 2004; Dangl y McDowell, 2006;). Algunos ejemplos de este tipo de respuesta son barreras físicas, refuerzo de la pared celular, reacción hipersensible, repelente, supresión de nutrientes esencial en el sitio de ataque, inhibición de enzimas digestivas del insecto, producción de sustancias que provocan daño físico al insecto, disminución de la palatabilidad, entre otras.

Muchas plantas superiores responden al ataque de insectos produciendo proteínas de defensa en sus hojas y tallos como respuesta al daño causado por estos (Green y Ryan, 1972; Ryan, 1990). Las proteínas de defensa mejor caracterizadas son la serina, proteínas inhibidoras de la proteasa I y II (Plunkett *et al.*, 1982); las cuales se detectaron en hojas de solanáceas y tienen efecto en la interferencia de la digestión del insecto retardando su crecimiento y desarrollo (Rehemtulla y Kaufman, 1992).

1.2 Activación de la defensa

La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta identifica la presencia del patógeno. Ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas son capaces de actuar como *inductores* de defensa. Los inductores no-específicos son cualquier sustancia que induce la activación de defensa de forma no específica (Darvill y Albersheim, 1984).

La reacción de defensa también se puede activar de forma no específica por factores abióticos como el choque térmico, la sequía, diversas sustancias químicas y la luz ultravioleta. En general, este tipo de inductores abióticos activan respuestas de defensa ya que provocan heridas y daño físico en los tejidos (Collinge *et al.*, 2001).

La inducción de la reacción de defensa de una manera específica ha sido observada en las interacciones del tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta parece estar determinado por genes correspondientes y presentes tanto en el patógeno como en la planta. La investigación exhaustiva iniciada en los años 40 en el cultivo del lino y la roya de ese cultivo causada por *Melampsora lini*, generaron la hipótesis de gen por gen (Flor, 1971) en la cual se evidencia la existencia de genes en la planta que confieren resistencia a una especie particular de patógeno. Por otro lado, la presencia o ausencia de genes de virulencia en el patógeno le confieren la habilidad de causar o no la enfermedad en un cultivar determinado (De Wit, 1997).

1.3 Mecanismos de defensa

Una vez que el patógeno ha sido reconocido se activan una serie de mecanismos de defensa mediante cascadas de señales que aún no han sido completamente caracterizadas. Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros (Collinge *et al.*, 1994).

1.4 Categorías generales de defensa directa

La *reacción* hipersensible, en las interacciones raza-cultivar del tipo incompatible, muchas veces ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección. Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (RH). La RH además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la

acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR, por sus siglas en inglés (Ryals *et al.*, 1996).

1.5 Sustancias químicas en las defensas directas de las plantas

Varias sustancias se han caracterizado en sistemas planta-insecto como inhibidoras de enzimas digestivas en el insecto, tales como proteasas, lecitinas, aminoácidos, deaminasas, polifenol oxidasas y otras proteínas de defensa, consideradas metabolitos secundarios en plantas

1.6 Moléculas de señalización en defensa

La señalización para la activación de la defensa es regulada por diversas moléculas que le permiten a la planta responder a un estímulo e involucran, principalmente, proteínas activadas por mitogénicos (MAP cinasas), fosfolípidos transmembranales, canales aniónicos de Cl^- y NO^-3 , moléculas de alcalinización extracelular/acidificación-citoplásmica, especies reactivas de oxígeno (O^-2 , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$), radicales de óxido nitroso (ON) y sistemas de señalización por ácido salicílico (AS), ácido jasmonico (AJ), etileno (ET), ácido absícico (AAB) y ácidos grasos (Vidhyasekaran, 2008). La principal función de señalización consiste en transducir los estímulos extracelulares reconocidos por receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco, que en completa coordinación integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo externo agresor (Vidhyasekaran, 2008).

El ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) son las moléculas más reconocidas en defensa (Hammond y Parker, 2003). Estas rutas de defensa antagónicas no funcionan independientemente y forman parte de una red de señalización compleja que determina la respuesta de defensa de la planta (Glazebrook, 2005). Sin embargo, existen otras hormonas como ácido

abscisico (AAB), ácido giberélico (AG) y citocininas (CC) así como brasinoesteroides (BR) que están implicados en la señalización de defensa en plantas (Bari y Jones, 2009).

El AS y la relación AJ/ET son importantes moléculas de señalización en respuestas de defensa a patógenos. La activación de estas respuestas difiere dependiendo del tipo de patógeno invasor. Por ejemplo la señalización mediada por AS provee protección contra patógenos biótrosos como hongos, oomicetos, bacterias, como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasítica*, y virus, por ejemplo *Turnip crinkle virus* (TCV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV). En contraste, la señalización mediada solo por AJ/ET activa la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos tales como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* (Glazebrook, 2005).

Además, AJ/ET actúan sinérgicamente para inducir la expresión de ciertos genes de defensa tales como *PDF1.2*, *PR-3* y *PR-4*. Mientras que AS y AJ pueden actuar sinérgicamente o antagónicamente durante la activación de genes de defensa ante un patógeno específico (Devadas *et al.*, 2002). Por lo tanto la resistencia inducida por patógenos es regulada por una red de interconexiones de rutas de defensa en donde el AS y AJ/ET son moléculas claves de señalización (Glazebrook, 2005).

1.7 Señalización dependiente de ácido salicílico (AS)

Una característica distintiva de la respuesta SAR es la capacidad de la planta de sintetizar AS, que activa la expresión de genes relacionados con defensa (Loake y Grant, 2007). Aunque AS es un metabolito producido en SAR, éste no es una molécula que se mueve a larga distancia (Attaran *et al.*, 2009). El AS es un compuesto que interviene en distintos procesos biológicos además de ser sintetizado por la planta cuando es atacada por patógenos biótrosos. Participa además en la germinación de la semilla, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés biótico y abiótico y nodulación en leguminosas (Vlot *et al.*, 2008).

El AS y sus derivados biológicos activos como el 0- β - Glucósido de AS (SAG), el éster de saliciloil glucosa (SGE), el metil salicilato (MeSA) y el 2,5 dihidróxido benzóico (ácido gentísico) son sintetizados cuando existe infección por patógenos o son capaces de inducir la expresión de proteínas PR así como también actuar como señal móvil a larga distancia en SAR (Sang *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008).

El AS es una molécula importante en la señalización de defensa a virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Vlot *et al.*, 2008). Tras la infección viral se encuentran altos niveles de AS y/o su compuesto volátil MeAS, se incrementa la expresión de genes implicados en SAR (Shulaev *et al.*, 1997). El AS es esencial en la ruta de transducción de señales que conducen a la activación de genes que codifican proteínas PR's (Vlot *et al.*, 2008). Por el contrario, se ha demostrado que mutantes en donde existe inhibición de su síntesis o acumulación tienen disminución o bloqueo en las respuestas de defensa. Por lo que la acumulación de AS sirve como una señal natural que media diferente respuesta de defensa en las plantas.

1.8 Evidencias de relación entre ácido salicílico y enfermedades

He *et al.* (2007) reportó en sus investigaciones que cuando se aplica araña roja *Tetranychus urticae* (Koch) en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), estas incrementaron su contenido de ácido salicílico como respuesta al ataque de esta plaga, con un máximo pico a las 24 horas después de la aplicación y posteriormente a este pico la concentración empezó a descender. Ogawa *et al.* (2010) cuando aplico daño mecánico en hojas de *Arabidopsis*, estas incrementaron la concentración de ácido salicílico en un tiempo similar y posteriormente decreció la concentración.

Kojima *et al.* (2013) en sus investigaciones con *Arabidopsis*, encontró que la inoculación de *Fusarium equiseti* permitió que la concentración de ácido salicílico se incrementara hasta alcanzar el pico máximo a las 18 horas posteriores a la inoculación para posteriormente empezar a descender. Molders

et al. (1996), encontró que al inocular virus de la necrosis del tabaco (TNV) en *Arabidopsis*, la concentración de ácido salicílico se incrementó cuatro días después de inoculación.

Mirjana *et al.* (1998) Encontró que al inocular plantas de tabaco con virus mosaico del tabaco (TMV) el ácido salicílico se incrementó pronunciadamente en las hojas de Tabaco inoculadas y posteriormente se mantuvo en niveles altos, en cambio, en la hoja no inoculada localizada por debajo de la inoculada de la misma planta el incremento de ácido salicílico fue gradual ascendente en el periodo de 150 horas evaluado.

Una alternativa potencial al uso de agroquímicos es el uso de inductores de resistencia (elicitores) que responden a agentes bióticos y abióticos (Torres *et al.* 2006; Stangarlin *et al.* 2011). Los inductores de resistencia incluyen los fosfitos y formulaciones basadas en extractos naturales de plantas y productos agroquímicos. Cuando se aplican los fosfitos en las hojas de plantas, estos pueden controlar la enfermedad por dos mecanismos separados, por efecto directo sobre el patógeno o mediante la activación de la respuesta de defensa de la planta (Nojosa *et al.* 2009), Yoshioka *et al.* (2001) encontró que el fungicida probenazole induce Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) en *Arabidopsis thaliana* por la señalización y acumulación de ácido salicílico, Gonzalez *et al.* (2015) encontró en sus resultados que el fungicida comercial Milor® a base de Metalaxyl+Clorotalonil además de su efecto protectante contra oomycetes en el cultivo de papa al ser aplicado vía foliar, también actúa como un potencial activador de mecanismos de defensa de la planta mediante la acumulación de ácido salicílico.

2. LITERATURA CITADA

Agrios G. N. (1996). Fitopatología. México D.F. (México): Limusa.

Attaran E., Zeier T. E., Griebel T., y Zeier J. (2009) Methyl salicylate production and Jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in Arabidopsis. PlantCellAdvancedOnlinePublication.

Bari R., and Jones J. D. G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology 69: 473-488.

Collinge D. B., Borch J., Madriz O. K., Newman M. A. (2001) The responses of plants to pathogens. In Hawkesford, MJ; Buchner, P. Molecular analysis of plant adaptation to the environment. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.

Collinge D. B., Gregersen P., Thordal C. H. (1994) The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. Basra,AS. Ed.New York, Marcel Dekker. p. 391-433.

Dangl J. L. y McDowell J. M. (2006) Two modes of pathogen recognition by plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 8575-8576.

Darvill A. G., Albersheim P. (1984) Phytoalexins and their elicitors- A defence against microbial infection in plants. Annual Review of Plant Physiology 35:243-275.

De Wit P. J. G. M. (1997) Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition.Trends in Plant Science 2: 452-458.

Devadas S. K., Enyedi A., and Raina R. (2002) The Arabidopsis hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. The Plant Journal 30: 467-480.

- Ferry N., Edwards M. G., Gatehouse, J.A. and Gatehouse A. M. R. (2004)** Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 155-161.
- Flor H. H. (1971)** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Glazebrook J., (2005)** Constrating mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43:205-227.
- González G. E., Laredo A. J., Ascacio V. J., Jasso de R. D. y Hernández C. D. (2015)** Changes in the Production of Salicylic Acid in Potato Plants (*Solanum tuberosum*) as Response to Foliar Application of Biotic and Abiotic Inductors, *American Journal of Plkant Sciences*, 6, 1785-1791.
- Green T. R. y Ryan C. A. (1972)** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175:776–77.
- Hammond K. K., y Parker E. J. (2003)** Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Ocurrent Opinion in Biotechnology* 14: 177-193.
- He W., Li H., Li X., Li M. Q. and Chen Y.W. (2007)** *Tetranychus urticae* Koch Induced Accumulation of Salicylic Acid in Frijole Leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88:78-81.
- Hutcheson S. W. (1998)** Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36:59-90.
- Kessler A. and Baldwin I. T. (2002)** Plant responses to insect herbivory. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 299-328.
- Kojima H., Hossain M. M., Kubota M. and Hyakumachi M. (2013)** Involvement of the Salicylic Acid Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Arabidopsis by Plant Growth-Promoting Fungus *Fusarium equiseti* GF19-1. *Journal of Oleo Science*, 62:415-426.

- Loake G. y Grant M. (2007)** Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 466-472.
- Mirjana S., Vladimir S. E., Ilya R. (2007)** Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants. *Plant Physiol.* 116:387–392
- Molders W., Buchala A. and Metraux J.P. (1996)** Transport of Salicylic Acid in Tobacco Necrosis Virus Infected Cucumber Plants. *Plant Physiology*, 112:787-792.
- Nojosa G. B. A., Resende M. L. V., Barguil B. M., Moraes S. R. G. and Boas C. H. V. (2009)** Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. *Summa Phytopathologica*, 35, 60-62.
- Ogawa T., Ara T., Aoki K., Suzuki H. and Shibata D. (2010)** Transient Increase in Salicylic Acid and Its Glucose, Conjugates after Wounding in Arabidopsis Leaves. *Plant Biotechnology*, 27:205-209.
- Osbourn A. E. (1996)** Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Plunkett G., Senear D. F., Zuroske G., Ryan C. A. (1982)** Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 213:463–72.
- Rehemtulla A. and Kaufman R. J. (1992)** Protein processing within the secretory pathway. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:560–65
- Robledo E. M. N., (2014)** Suceptibilidad/Resistencia de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary a fungicidas. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, 75 pp.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. (1996)** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1009-1819.
- Ryan C. A. 1990.** Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:425– 49.

- Shulaev V., Silverman P., and Raskin I. (1997)** Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721.
- Stangarlin J. R., Kuhn O. J., Toledo M. V., Portz R. L., Schwan-Estrada K. R. F. and Pascholati S.F. (2011)** A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, 10:8-46.
- Torres M. A., Jones J. D. G. and Dangl J.L. (2006)** Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, 141:373-378.
- Vidhyasekaran P. (2008)** Fungal pathogenesis in plants and crops. *Molecular Biology and host defense mechanisms*. Second Edition. CRC Press. 509p.
- Vlot C. A., Klessig F. D. and Wook S. P. (2008)** Systemic acquired resistance: elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11:436-442.
- 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.
- Yoshioka K., Nakashita H., Klessig D.F. and Yamaguchi I. (2001)** Probenazole Induces Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis with a Novel Type of Action. *The Plant Journal*, 25: 149-157.

CAPÍTULO III

1. PAGINA DE PRESENTACIÓN DE ARTÍCULO

CONTENIDO DE ÁCIDO SALICÍLICO EN PAPA EN PRESENCIA DEL TIZÓN TARDÍO Y FUNGICIDAS

SALYCILIC ACID CONTENT IN POTATO WITH LATE BLIGHT AND FUNGICIDES

Hugo Colín-Marín^{1*}, Héctor Lozoya-Saldaña¹, María Teresa Beryl Colinas-León² y Marcelo Acosta-Ramos¹

¹Maestria en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México. Teléfono: (01 595) 95 2 15 00 exts. 5166, 6180. ²Maestria y Doctorado en Ciencias en Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México. Teléfono: (01 595) 95 2 15 00

**Autor de correspondencia (hcmichigo@gmail.com)*

CONTENIDO DE ÁCIDO SALICÍLICO EN PAPA EN PRESENCIA DEL TIZÓN TARDÍO Y FUNGICIDAS

SALYCILIC ACID CONTENT IN POTATO WITH LATE BLIGHT AND FUNGICIDES

Hugo Colín-Marín, Héctor Lozoya-Saldaña, María Teresa Beryl Colinas-León y
Marcelo Acosta-Ramos

2. RESUMEN

El ácido salicílico (AS) es una molécula importante de señalización en las plantas en respuesta al ataque de patógenos como el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont de Bary), siendo el cultivo de papa uno de los más afectados por esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de AS en hojas de papa en respuesta al ataque de *P. infestans* con manejo químico del oomiceto, mediante aspersión foliar semanal de cuatro fungicidas (fluazinam, propamocarb clorhidrato, cymoxanil+famoxadona y mandipropamida) con diferente número de aplicaciones consecutivas (2, 4 y 6) a lo largo del ciclo del cultivo. Se incluyó un fungicida comercial como testigo positivo (mefenoxam-M) aplicado durante todo el ciclo, y uno negativo sin protección química. Se presentó un incremento gradual de AS en todos los tratamientos durante los primeros 55 a 62 días después de la siembra, lográndose en este periodo la máxima concentración de este compuesto en la planta y posteriormente descendió o mantuvo sus niveles bajos con variaciones, independientemente del número de aspersiones de los fungicidas. mandipropamida y mefenoxam-M fueron los que mejor controlaron al tizón (menor severidad) y los que mantuvieron más estables los niveles de AS. Cuando la severidad de *P. infestans* superó el 30%, los niveles del AS disminuyeron. Los fungicidas no presentaron efecto directo en la concentración de ácido salicílico, más bien, fue indirecto sobre la disminución del grado de severidad de *P. infestans*.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., Tizón tardío, fungicidas, reacciones de defensa.

3. SUMMARY

Salicylic acid (SA) is an important signaling molecule in plants as a reaction to infection by pathogens like late blight (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), and the potato crop is one of the most affected by this disease. The objective of this study was to determine the SA levels in potato leaves as a response to *P. infestans* attack with chemical management of the oomycete, by weekly foliar spraying of four fungicides (Fluazinam, Propamocarb, Cymoxanil+Famoxadone and Mandipropamid), with a different number of consecutive sprays (2, 4, and 6) throughout the growing cycle of the crop. A commercial fungicide was included as positive control (Mefenoxam-M), applied during the whole growing cycle, and a negative control with no chemical protection was included as well. A gradual SA increase was observed in all treatments during the first 55 to 62 days after the sowing. The maximum SA concentration in the plant was detected in this period, decreasing or keeping its levels low with variations afterwards, regardless of the number of fungicide sprayings. Mandipropamid and Mefenoxam-M were the best ones for controlling the blight (lower severity) and keeping the most stable SA levels. When *P. infestans* severity was over 30 % the SA levels decreased. The fungicides did not induce a direct effect on the SA concentration, but had an indirect effect by lowering the level of *P. infestans* severity

Key words: *Solanum tuberosum* L., late blight, fungicides, defense reactions.

4. INTRODUCCIÓN

Phytophthora infestans (Mont) De Bary, es el agente causal del “tizón tardío” y genera la más seria de las enfermedades de la papa, la cual se desarrolla más velozmente en climas templados (Agrios, 1996). El dramático potencial destructivo de este patógeno ha ocasionado que se consuman gran cantidad de fungicidas, entre los más utilizados contra este patógeno destacan el grupo de las fenilamidas, como el mefenoxam-M, el grupo de los aromáticos policlorados como el clorotalonil y el grupo de las imidazolinonas como la fenamidona (WHO 2004), esto hace que la enfermedad sea considerada una de las enfermedades más importantes en cultivos alimenticios de la agricultura mundial (Agrios, 1996; Fry, *et al.*, 1993), sin embargo, ha desarrollado resistencia a estos químicos, haciendo cada vez más difícil su control (Robledo, 2014), además, el manejo de pesticidas puede provocar daños a la salud humana y al ambiente, por lo que se están buscando nuevas alternativas de control para disminuir el ataque de este patógeno haciendo uso de herramientas que aumenten las defensas naturales de la planta. Se ha revelado la existencia de mecanismos de resistencia en las plantas inducidos como respuesta a patógenos (Collinge *et al.*, 1994). Ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) son importantes moléculas de señalización en respuestas de defensa a patógenos. La activación de estas respuestas difiere dependiendo del tipo de patógeno invasor; la señalización mediada por AS provee protección contra patógenos biótrosos como hongos, oomicetos, bacterias, como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasítica*, y virus, por ejemplo *Turnip crinkle virus* (TCV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV). En contraste, la señalización mediada solo por AJ/ET activa la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos tales como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* (Glazebrook, 2005). Por lo tanto AS es una molécula importante en la señalización de defensa a virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Vlot *et al.*, 2008). Tras la infección viral se encuentran altos niveles de AS y/o su compuesto volátil MeAS, se incrementa la expresión de genes implicados en SAR (Shulaev *et al.*, 1997). He *et al.* (2007) reportó en sus investigaciones que, cuando se aplicó araña roja *Tetranychus urticae* (Koch) en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), éstas incrementaron su contenido de ácido salicílico como respuesta al ataque de esta plaga, con un máximo pico a las 24 horas después de la aplicación y posterior a este pico la concentración empezó a descender. Ogawa *et al.* (2010), cuando aplico daño mecánico en

hojas de *Arabidopsis*, estas incrementaron la concentración de ácido salicílico en un tiempo similar y posteriormente decreció la concentración. Kojima *et al.* (2013) en sus investigaciones con *Arabidopsis*, encontró que la inoculación de *Fusarium equiseti* permitió que la concentración de ácido salicílico se incrementara hasta alcanzar el pico máximo a las 18 horas posteriores a la inoculación, para posteriormente empezar a descender. Molders *et al.* (1996), reportó que al inocular tabacco necrosis virus (TNV) en *Arabidopsis*, la concentración de ácido salicílico se incrementó cuatro días después de inoculación. Mirjana *et al.* (1998) menciona que al inocular plantas de tabaco con virus mosaico del tabaco (TMV) el ácido salicílico se incrementó pronunciadamente en las hojas de Tabaco inoculadas y posteriormente se mantuvo en niveles altos, en cambio, en la hoja no inoculada localizada por debajo de la inoculada de la misma planta el incremento de ácido salicílico fue gradual ascendente en el periodo de 150 horas evaluado. Por lo tanto una alternativa potencial al uso de agroquímicos es el uso de inductores de resistencia (elicitores) que responden a agentes bióticos y abióticos (Torres *et al.* 2006; Stangarlin *et al.* 2011). Los inductores de resistencia incluyen los fosfitos y formulaciones basadas en extractos naturales de plantas y productos agroquímicos. Cuando se aplican los fosfitos en las hojas de plantas, estos pueden controlar la enfermedad por dos mecanismos separados, por efecto directo sobre el patógeno y/o mediante la activación de la respuesta de defensa de la planta (Nojosa *et al.* 2009), Yoshioka *et al.* (2001) encontró que el fungicida probenazole induce Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) en *Arabidopsis thaliana* por la señalización y acumulación de ácido salicílico, Gonzalez *et al.* (2015) encontró en sus resultados que el fungicida comercial Milor® a base de Metalaxyl+Clorotalonil además de su efecto protectante contra oomycetes en el cultivo de papa al ser aplicado vía foliar, también actúa como un potencial activador de mecanismos de defensa de la planta mediante la acumulación de ácido salicílico.

Por lo tanto, el ácido salicílico es una vertiente de estudio para el control de *P. infestans*, ya que esta molécula de autodefensa de las plantas es regulada por la planta en presencia de patógenos o mediante la aplicación de este compuesto, productos que induzcan su síntesis o que regulen sus niveles como los fosfitos, por lo que en este trabajo se planteó determinar los niveles de ácido salicílico en hojas de papa en presencia de *Phytophthora infestans* y fungicidas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Bajo condiciones de temporal y de infección natural en el campo, el estudio se realizó entre el 3 de Junio al 15 de septiembre del 2016, en el centro experimental ICAMEX-SEDAGRO ubicado en el municipio de Metepec, Estado de México, a 19°14'38.38" latitud norte y 99°35'22.59" longitud oeste, a una altitud de 2613 msnm, predominando el clima C(w2) templado subhúmedo, con temperatura media anual de 12°C a 18°C. Para el establecimiento del experimento se utilizó la variedad de papa Gigant, susceptible al tizón tardío, la cual se estableció en 24 surcos de 80 cm. de ancho y 60 metros de largo donde se pusieron los tubérculos de papa a una distancia de 25 cm. entre ellos, dando así 250 plantas por surco y obteniendo una densidad de población de 50,000 plantas por hectárea.

Los tratamientos consistieron en la aspersión semanal de los fungicidas fluazinam (Shogun®), propamocarb clorhidrato (Previcur N®), mandipropamida (Revus®) y cymoxanil + famoxadona (Equation Pro®) con diferente número de aplicaciones semanales consecutivas (2, 4 y 6) a lo largo del ciclo del cultivo. Se agregó un tratamiento de un fungicida comercial usado como control positivo, mefenoxam-M (Ridomil Gold Bravo®) durante todo el ciclo, y también un testigo negativo el cual no tuvo ninguna aspersión (Cuadro 1).

Cuadro 1: Diseño de tratamientos

Trat.	No. De Aplicaciones semanales consecutivas	Fungicida	Dosis recomendada ha- 1 (i.a.)	Mochila aspersora de 15 L (g o mL de i.a.)
1	1	fluazinam	500 ml	20 ml
2	2	fluazinam	500 ml	20 ml
3	3	fluazinam	500 ml	20 ml
4	1	propamocarb clorhidrato	2.0 L	75 ml
5	2	propamocarb clorhidrato	2.0 L	75 ml
6	3	propamocarb clorhidrato	2.0 L	75 ml
7	1	mandipropamida	1.0 L	35 ml
8	2	mandipropamida	1.0 L	35 ml
9	3	mandipropamida	1.0 L	35 ml
10	1	cymoxanil+famoxadona	400 g	15 g
11	2	cymoxanil+famoxadona	400 g	15 g
12	3	cymoxanil+famoxadona	400 g	15 g
13	8	mefenoxam-m+clorotalonil	4.0 L	150 ml
14	0	sin aplicacion	-----	-----

El diseño experimental fue un bloques completos al azar, con cuatro bloques y 14 tratamientos y las variables evaluadas fueron la concentración de ácido salicílico en biomasa fresca (50 mg de hoja) de papa y la severidad de *P. infestans*. La primera toma de muestras de tejido vegetal se hizo a la semana de la aplicación de los tratamientos (7 de julio) y posteriormente se tomaron muestras cada 7 días (34, 41, 48, 55, 62, 69, 76 y 83 días después de la siembra) hasta la cosecha o hasta que las plantas murieron. Para el caso de severidad, solo se tomó el porcentaje de severidad con escala visual en porcentaje de 0 a 100 y se sacaron promedios por tratamiento, y para la determinación de ácido salicílico se utilizó un protocolo de extracción por método espectrofotométrico desarrollado por Warriar *et al.* (2013).

5.1 Determinación de ácido salicílico

Determinación de la curva de extracción: Se hicieron varios ensayos para determinar la curva de extracción de ácido salicílico donde a concentraciones conocidas (100, 200, 300, 400 y 500 μmL^{-1}) de ácido salicílico se les cuantificó la absorbancia en la región visible mediante espectrofotometría a 540 nanómetros con cuatro repeticiones (Figura 1).

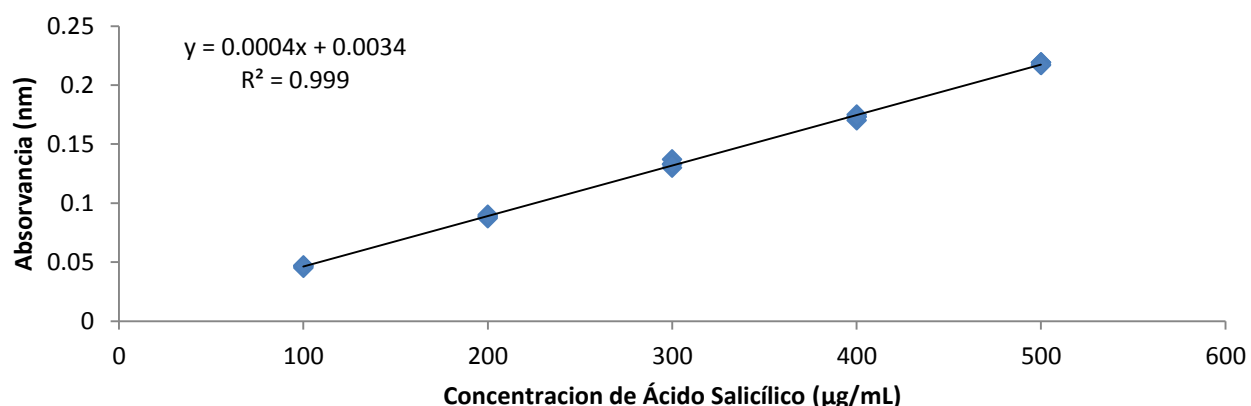


Figura 1: Curva de extracción con concentraciones conocidas de ácido salicílico a en el espectro visible a 540 nanómetros.

Obtención de muestra vegetal: Se tomó la cuarta hoja contando del ápice hacia abajo, las cuales se llevaron a laboratorio, donde se mantuvieron a -12°C para su conservación y su posterior determinación de ácido salicílico.

Procesamiento de muestras: Se picaron y pesaron 50 miligramos de tejido y se pusieron en un tubo de ensaye de fondo plan, donde se adicionaron 3 ml agua (extracción); posteriormente se molió hasta homogenizar el agua con el tejido fresco con ayuda de un homogeneizado; después se centrifugo a 10,000 g por 10 minutos a 10 °C y se tomaron 100 µl del sobrenadante, los cuales se pusieron en un tubo de fondo plano, donde se mezclaron los 100 µl del sobrenadante con Cloruro Férrico 0.1% recién preparado hasta obtener 3.0 ml de volumen de mezcla de reacción; posteriormente se determinó la absorbancia en la región visible (a 540 nm) con ayuda de un espectrofotómetro. Se repitió este procedimiento para todas y cada uno de los tratamientos y sus respectivas repeticiones.

De los datos obtenidos se sacaron promedios, se realizó un análisis de varianza y una prueba de medias por fungicida y por número de aplicaciones para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos; también se determinó la existencia de correlación entre la severidad y contenido de ácido salicílico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cuantificación del ácido salicílico se realizó a los siete días después de la primera aplicación de cada tratamiento y posteriormente se tomaron muestras semanales hasta que las plantas murieron o completaron su ciclo según fuera el caso.

6.1. Cuantificación de ácido salicílico en hojas con dos aplicaciones.

Los tratamientos T1, T4, T7 y T10 fueron los tratamientos con dos aplicaciones consecutivas de fungicidas en comparación con el testigo positivo (T+) con aplicación todo el ciclo y el Testigo negativo (T-) sin aplicación (Figura 2). Donde se pudo observar una tendencia similar en los tratamientos con propamocarb clorhidrato, mandipropamida, cymoxanil+famoxadona y el Testigo negativo en cada una de las fechas de muestreo y presentan la máxima concentración de ácido salicílico a los 55 días después de la siembra (dds), mientras que los tratamientos con fluazinam y el Testigo positivo presentan su máxima concentración a los 62 y 48 dds respectivamente y tienen variaciones de tendencia en algunas fechas de muestreo.

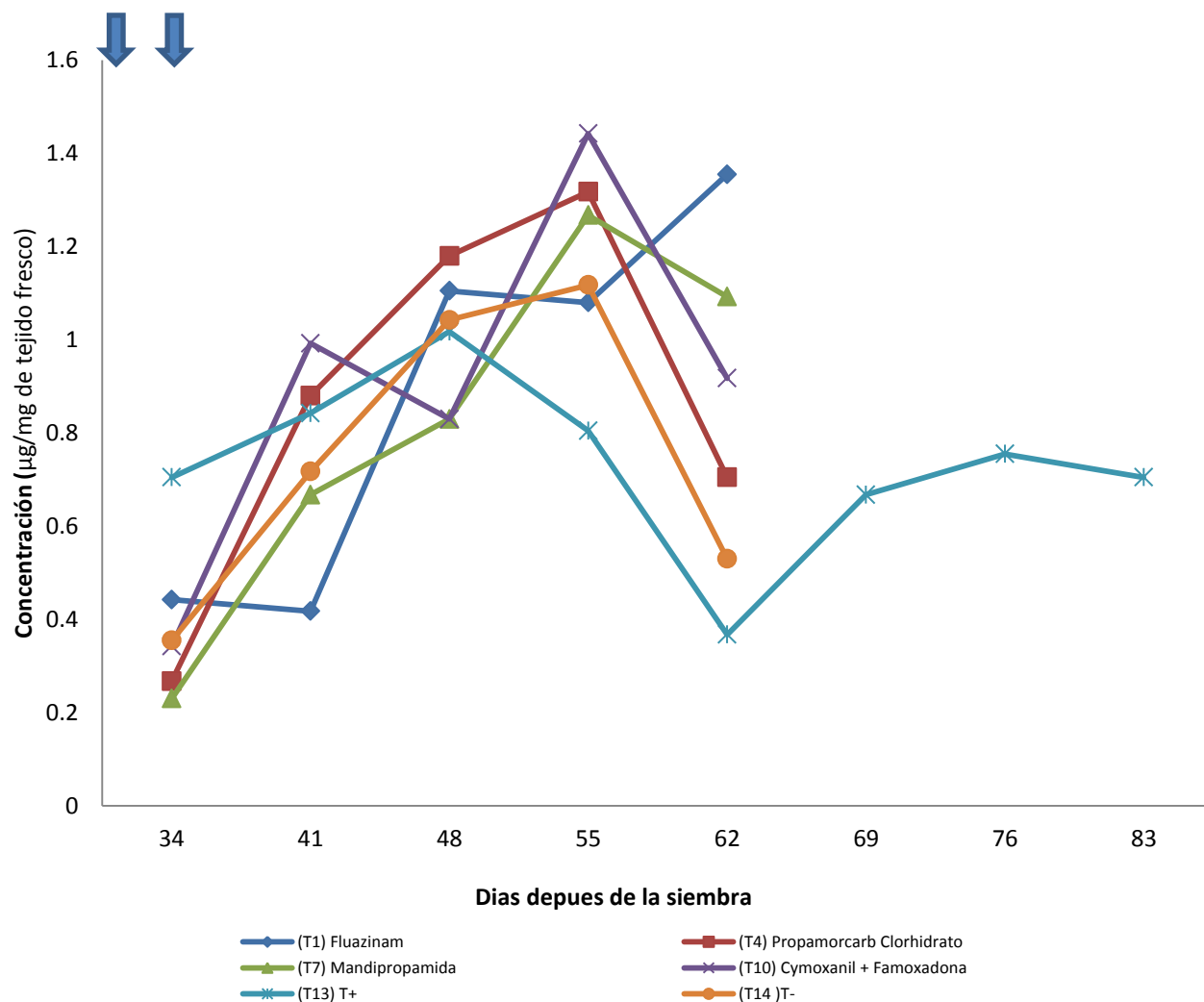


Figura 2: Concentración de ácido salicílico en tratamientos de fungicidas con dos aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

El análisis de varianza a los 34 y 41 dds mostró que no hay diferencia significativa ($Pr > 0.05$) en las concentraciones de ácido salicílico de los tratamientos, sin embargo, a los 48, 55 y 62 dds si existieron diferencias significativas ($Pr < 0.05$) entre los tratamientos, a los cuales se les realizó una prueba de medias de Tukey haciendo agrupamientos con letras para tratamientos con efectos similares, esto para cada una de las fechas de muestreo, donde en la fecha de muestreo a los 48 dds el tratamiento con propamocarb clorhidrato mostró la máxima concentración de ácido salicílico ($1.180 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) seguido de fluazinam ($1.105 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), los fungicidas mandipropamida y cymoxanil+famoxadona mostraron la más baja concentración ($0.8309 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$); a los 55 dds cymoxanil+famoxadona mostró la más alta concentración

(1.4425 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) mientras que el testigo positivo (T+) mostró la más baja concentración (0.8050 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), para los 62 dds fluazinam mostró el más alto contenido de ácido salicílico (1.3550 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y el más bajo fue el testigo negativo (0.35750 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Cuadro 2).

Cuadro 2: Comparaciones de medias y agrupamiento Tukey para los tratamientos con dos aplicaciones y los testigos a los 48, 55 y 62 días después de la siembra.

Fungicida	48 dds	55 dds	62 dds
Fluazinam	1.10500 a ^z	1.0800 bc	1.35500 a
Propamocarb clorhidrato	1.18000 a	1.2175 ab	0.70500 dc
Mandipropamida	0.83000 b	1.2675 ab	1.09250 ab
Cymoxanil+famoxadona	0.83000 b	1.4425 a	0.91750 bc
Testigo positivo (T+)	1.01750 ab	0.8050 c	0.36750 d
Testigo negativo (T-)	1.04250 ab	1.1175 bc	0.53000 d

^zMedias con la misma letra son estadísticamente iguales ($P > 0.05$).

6.2. Cuantificación de ácido salicílico en hojas con cuatro aplicaciones.

Los tratamientos T2, T5, T8 y T11 fueron de los fungicidas con cuatro aplicaciones consecutivas en comparación con el testigo positivo (T+) con aplicación todo el ciclo y el Testigo negativo (T-) si aplicación (Figura 3). Donde se pudo observar una tendencia similar en los tratamientos con fluazinam, Propamocarb clorhidrato, cymoxanil+famoxadona, el testigo positivo y el testigo negativo en cada una de las fechas de muestreo, mientras que el tratamiento con mandipropamida tiene variaciones de tendencia en las fechas de muestreo.

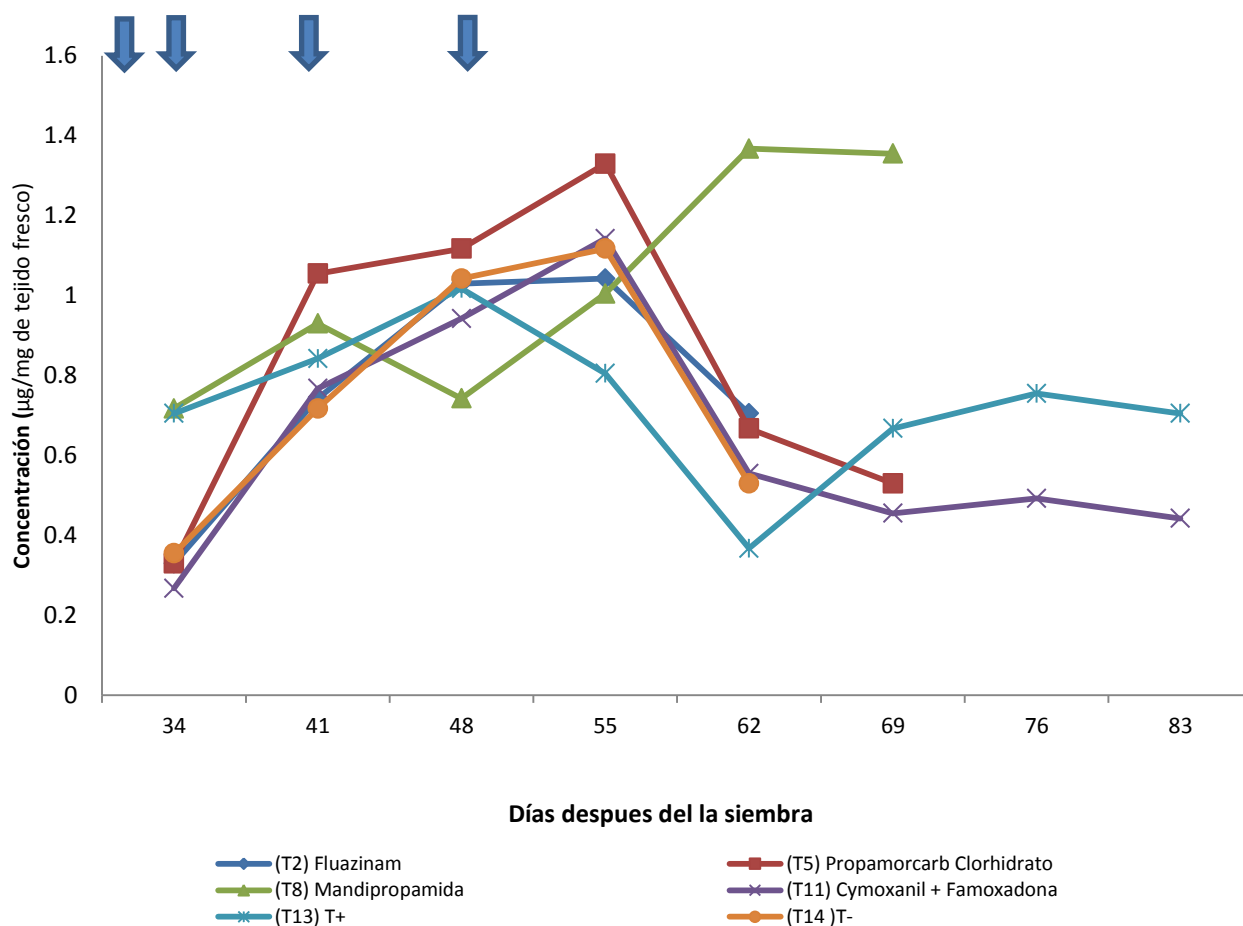


Figura 3: Concentración de ácido salicílico en tratamientos de fungicidas con cuatro aplicaciones consecutivas de los fungicidas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

En el caso del análisis de varianza a los 34 y 41 dds mostró que no hay diferencia significativa ($Pr > 0.05$) en las concentraciones de ácido salicílico de los tratamientos (mismo resultado que se encontró en el análisis para dos aplicaciones anterior), sin embargo, para las de los 48, 55, 62 y 69 dds si existieron diferencias significativas ($Pr < 0.05$) entre los tratamientos, a los cuales se les realizó una prueba de medias de Tukey haciendo agrupamientos con letras para tratamientos con efectos similares, esto para cada una de las fechas de muestreo (Cuadro 3). Para el caso del Testigo negativo (T-) y fluazinam no se pudieron incluir en el análisis a los 69 dds debido a que las plantas murieron y no fue posible tomar el dato. A los 48 dds las plantas del fungicida propamocarb clorhidrato y el Testigo Negativo fueron los que presentaron la más alta concentración de ácido salicílico (1.1175 y

0.0425 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivamente) y la mandipropamida la más baja concentración (0.7425 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$); a los 55 dds propamocarb clorhidrato presento nuevamente la más alta concentración (1.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), seguido de cymoxanil+famoxadona (1.1425 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y el Testigo positivo presento la más baja concentración (0.805 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$); a los 62 dds la el fungicida mandipropamida presento la más alta concentración (1.3675 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) muy superior al resto de los tratamientos, donde la más baja concentración la presento el testigo positivo (0.3675 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$); para los 69 dds el tratamiento con mandipropamida volvió a presentar la más alta concentración (1.355 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), superior al resto de los tratamientos donde cymoxanil+famoxadona presento la menor concentración (0.455 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Cuadro 3: Comparaciones de medias y agrupamiento Tukey para los tratamientos con cuatro aplicaciones y los testigos a los 48, 55, 62 y 69 días después de la siembra.

Fungicida	48 dds	55 dds	62 dds	69 dds
Fluazinam	1.0300 ab ^z	1.0425 b	0.7050 b	-
Propamocarb clorhidrato	1.1175 a	1.3300 a	0.6675 b	0.5300 b
Mandipropamida	0.7425 b	1.0050 b	1.3675 a	1.3550 a
Cymoxanil+famoxadona	0.9425 ab	1.1425 ab	0.5550 b	0.4550 b
Testigo positivo (T+)	1.0175 ab	0.8050 c	0.3675 b	0.6675 b
Testigo negativo (T-)	1.0425 a	1.1175 b	0.5300 b	-

^zMedias con la misma letra son estadísticamente iguales (Pr>0.05).

6.3. Cuantificación de ácido salicílico en hojas con seis aplicaciones.

Los tratamientos T3, T6, T9 y T12 fueron de los fungicidas con seis aplicaciones consecutivas en comparación con el testigo positivo (T+) con aplicación todo el ciclo y el Testigo negativo (T-) si aplicación (Figura 4). Donde se puede observar una tendencia similar en los tratamientos propamocarb clorhidrato, mandipropamida, cymoxanil+famoxadona y el Testigo Negativo en las primeras cinco fechas de muestreo, mientras que el tratamiento con fluazinam tiene variaciones de tendencia en algunas fechas de muestreo, siendo más alta la concentración de ácido salicílico en este tratamiento (1.42 $\mu\text{g}/\text{mg}$) a los 55 dds, para las últimas tres fechas de muestreo ya hay variaciones más marcadas en los tratamientos, donde el tratamiento con mandipropamida muestra el más alto contenido de ácido salicílico seguido del Testigo Positivo y el tratamiento con propamocarb clorhidrato muestra el más bajo contenido, seguido de cymoxanil+famoxadona.

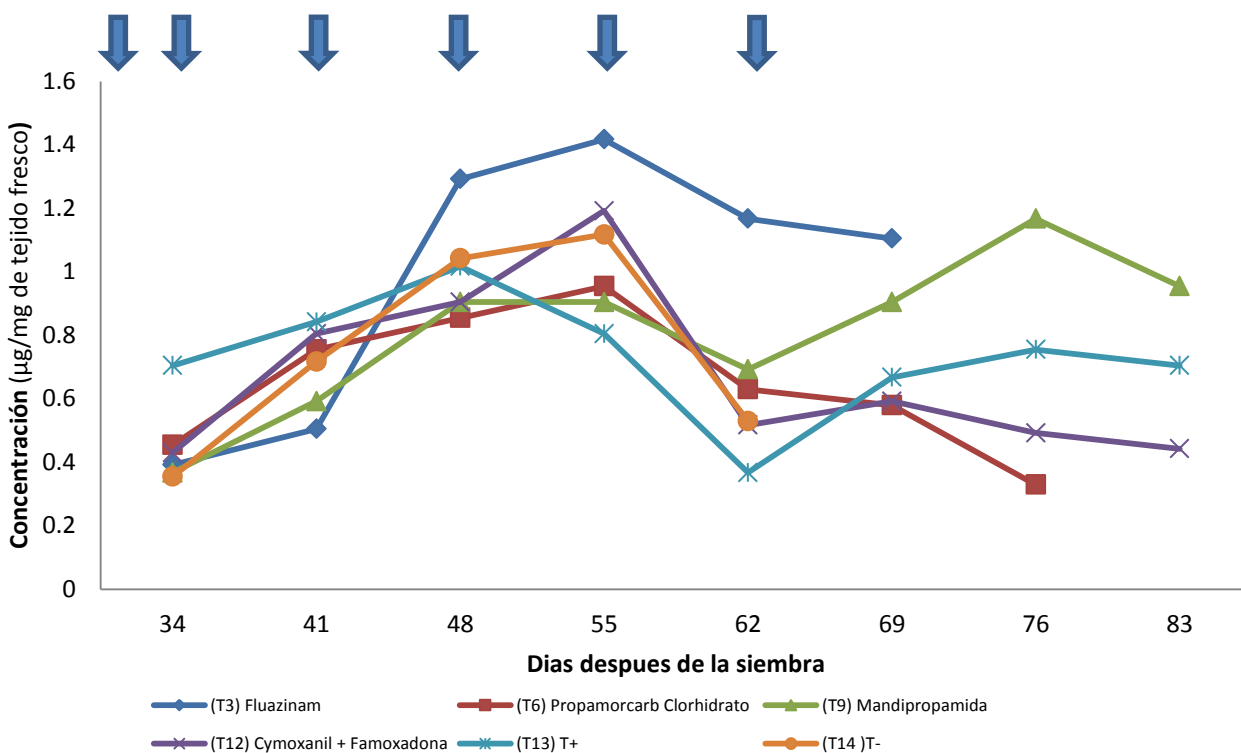


Figura 4: Concentración de ácido salicílico en tratamientos con seis aplicaciones consecutivas de los fungicidas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

En el caso del análisis de varianza no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) a los 34 y 41 dds, para el resto de las fechas de muestreo si existieron diferencias significativas entre los tratamientos, a los cuales se les realizó una prueba de medias de Tukey haciendo agrupamientos con letras para tratamientos con efectos similares, donde los 48 dds fluazinam fue el que mostró la mayor concentración de ácido salicílico ($1.2925 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), seguido de los Testigo Negativo y Positivo (1.0175 y $1.0425 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectivamente), propamocarb clorhidrato mostró la menor concentración ($0.855 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$); para los 55 dds fluazinam volvió a mostrar la más alta concentración ($1.4175 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) seguido de Cymoxanil+Famoxadon y el Testigo Negativo (1.1925 y $1.1175 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectivamente), la menor concentración la presento el Testigo Positivo ($0.805 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$); a los 62 dds fluazinam presento nuevamente a mayor concentración ($1.1675 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) y el Testigo Positivo mostró la menor concentración ($0.3675 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$); para los 69 dds, fluazinam nuevamente fue quien presento la mayor concentración ($1.105 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) y la cymoxanil+famoxadona la menor

concentración ($0.5925 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Cuadro 4), cabe mencionar que para esta fecha, el Testigo Negativo había perecido debido a la severidad de *P. infestans* por lo que no se incluyó en esta y posteriores fechas de muestreo; para los 76 dds mandipropamida fue quien mostró la mayor concentración de ácido salicílico ($1.1675 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y Propamocar Clorhidrato la menor concentración ($0.33 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), a esta fecha, fluazinam había perecido y no se contempló en este y posteriores análisis; a los 83 dds, mandipropamida mostró la mayor concentración ($0.995 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), seguido del Testigo Positivo ($0.705 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y al final cymoxanil+famoxadona ($0.4245 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Cuadro 4: Comparaciones de medias y agrupamiento Tukey para los tratamientos con seis aplicaciones y los testigos a los 48, 55, 62, 69, 76, y 83 días después de la siembra.

Fungicida	48 dds	55 dds	62 dds	69 dds	76 dds	83 dds
Fluazinam	1.2925 a ^z	1.4175 a	1.1675 a	1.1050 a	-	-
Propamocarb clorhidrato	0.8550 c	0.9550 bc	0.6300 ab	0.5800 b	0.3300 b	-
Mandipropamida	0.9050 bc	0.9050 bc	0.6925 ab	0.9050 ab	1.1675 a	0.9550 a
Cymoxanil+famoxadona	0.9050 c	1.1925 ab	0.5175 b	0.5925 b	0.4925 b	0.4425 b
Testigo positivo (t+)	1.0175 b	0.8050 c	0.3675 b	0.6675 b	0.7550 ab	0.7050 ab
Testigo negativo (t-)	1.0425 b	1.1175 ab	0.5300 b	-	-	-

^z Medias con la misma letra producen efectos similares ($\text{Pr} > 0.05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo, se pudo ver que las moléculas de fungicida sí influyen en la concentración de ácido salicílico en la planta, pudiendo incrementarse o disminuirse dependiendo del tipo de molécula, esto pudiera deberse no al efecto directo de la molécula sobre el ácido salicílico, sino por su actividad sobre *P. infestans* (efectividad y residualidad), ya que el ácido salicílico es sintetizado e incrementa sus niveles, solo cuando la planta es atacada por patógenos biotrofos o por algún estrés abiótico como salinidad, daño mecánico, temperatura, entre otros (Vlot *et al.*, 2008) o cuando se aplica inductores de resistencia (elicitors) que responden a agentes bióticos y abióticos (Torres *et al.* 2006; Stangarlin *et al.* 2011), sin embargo, ninguno de estos fungicidas está catalogado como inductor de resistencia en sus fichas técnicas de los desarrolladores, aunque González

et al. (2015) reportó que el metalaxyl+clorotalonil (Milor®) incrementa la concentración de ácido salicílico en la planta de papa al ser aplicado vía foliar.

En el caso de fluazinam cuando se realizaron seis aplicaciones, este tratamiento mostró los más altos contenidos de ácido salicílico, lo cual pudiera no deberse a un efecto directo sobre la inducción de síntesis de este compuesto, más bien que este producto causó intoxicación (quemaduras al follaje) y pudiera ser éste daño (estrés) el que incrementó los niveles de ácido salicílico ya que este compuesto incrementa sus niveles en situación de estrés abiótico como salinidad, temperatura, daño mecánico, entre otros (Vlot *et al.*, 2008).

6.4. Cuantificación de ácido salicílico en los tratamientos por fungicidas

Para el ingrediente activo fluazinam, se puede observar que la tendencia de la concentración de ácido salicílico en lo que respecta al número de aplicaciones y a los testigos a través del tiempo se comportó de una manera similar en cada una de las fecha de toma de muestra, a excepción del tratamiento con dos aplicaciones, el cual muestra una tendencia siempre ascendente (Figura 5), esto se puede deber a que con forme la planta se desarrolla, su metabolismo es más acelerado y es hasta que llega a un estado de madurez, que baja este metabolismo y comienza a mover los fotosintatos hacia sus órganos de reserva (tubérculo), lo que puede provocar que deje de sintetizarse ácido salicílico hasta que esta que muere por el ataque de *P. infestans*, ya que se observa en las primeras cuatro fechas de muestreo que la concentración de ácido salicílico se incrementa, y a partir del quinto muestreo esta concentración tiende a disminuir en la mayoría de los tratamientos, y a los 62 días después de la siembra (dds), Aproximadamente a los dos meses de edad de la planta es cuando la tuberización comienza a ser más intensa.

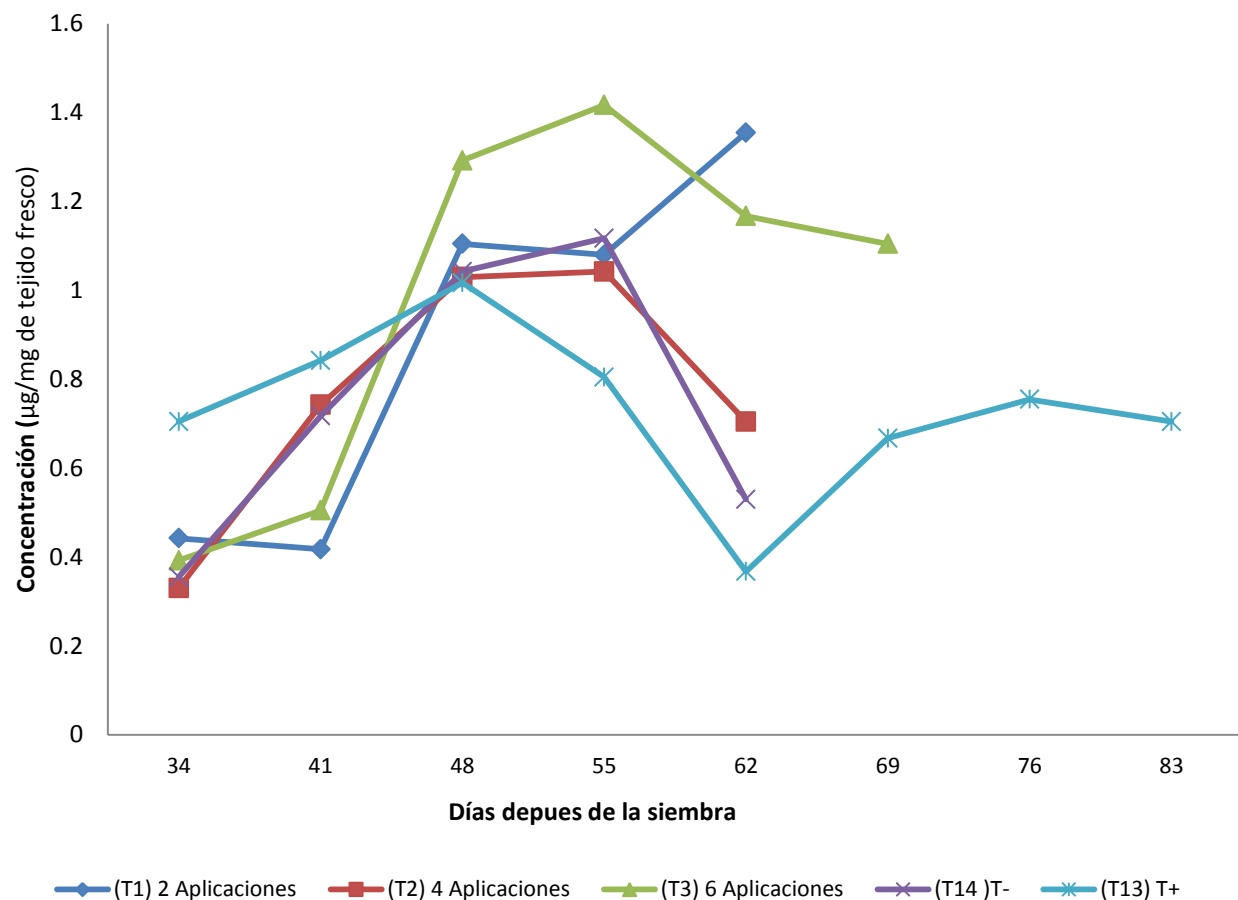


Figura 5: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida fluazinam con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.

Para el caso del ingrediente propamocarb clorhidrato para el número de aplicaciones y los testigos, se observó una tendencia muy similar entre los tratamientos, lo que generó que su correlación no fuera significativamente diferente ($\alpha=0.05$), lo que puede indicar que si puede haber una relación entre la concentración-tendencia del ácido salicílico y la edad de la planta, ya que se repite la tendencia en esta molécula fungicida (Figura 6).

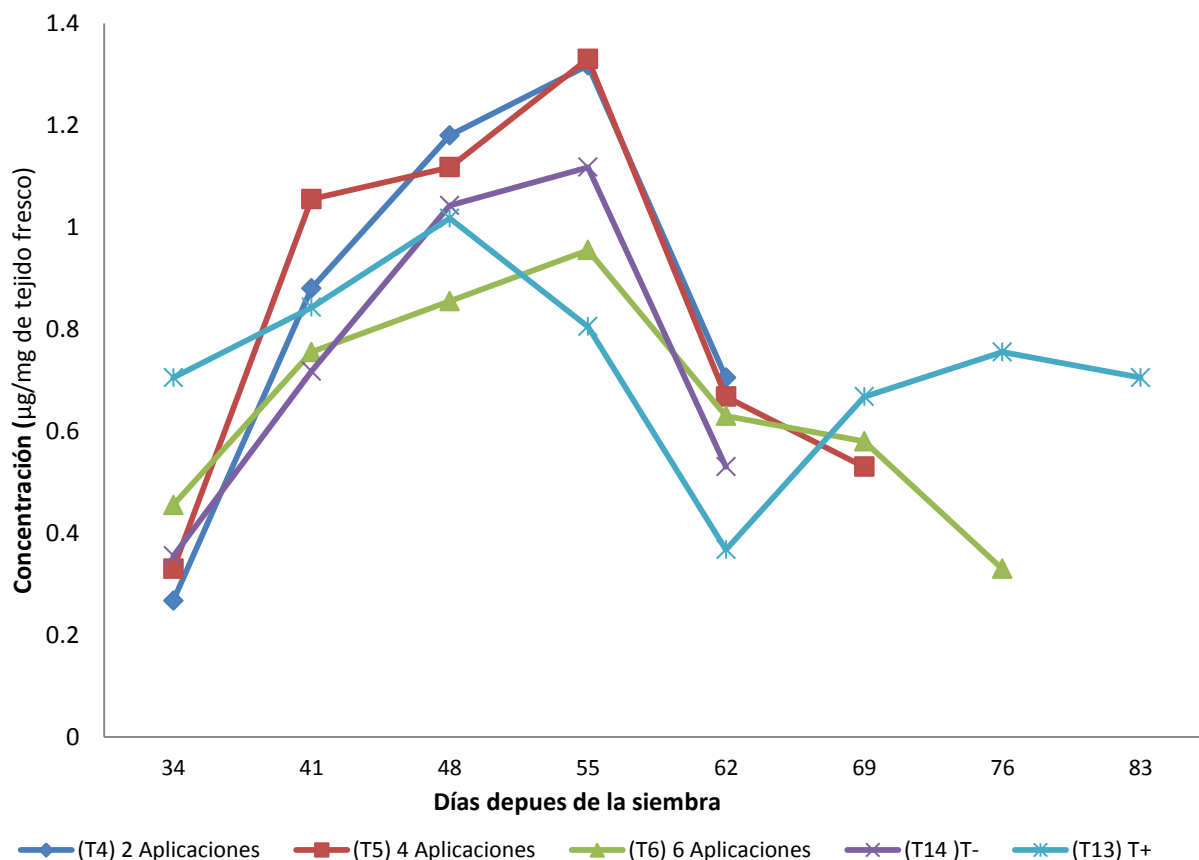


Figura 6: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida propamocarb clorhidrato con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.

En cuanto a la molécula mandipropamida la concentración presenta una tendencia similar en las primeras cuatro fechas de muestreo (55 dds), para los 62 dds se observó que los tratamientos con cuatro y seis aplicaciones se mantiene ascendentes, mientras que los tratamientos con dos aplicaciones desciende y muere la planta, en comparación el tratamiento con seis aplicaciones presenta una tendencia similar en la concentración de ácido salicílico con el testigo positivo (T+) pero con una mayor concentración de este (Figura 7), se puede observar algo similar a las anteriores moléculas, donde a partir de la quinta fecha de muestre se pierde la tendencia ascendente y cambia descendente o en algunos tratamientos se mantiene.

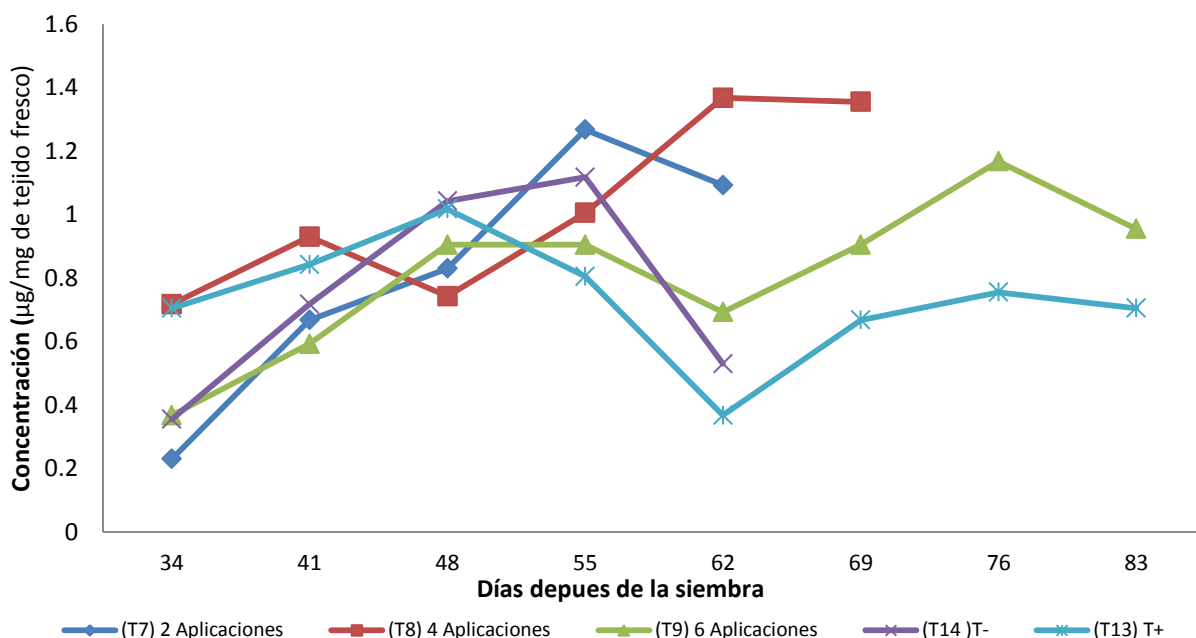


Figura 7: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida mandipropamida con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.

Para las moléculas cymoxanil+famoxadona, se muestra una tendencia similar en todos los tratamientos y en el tratamiento con seis aplicaciones se muestra una similitud con el testigo positivo (T+) hasta la fecha ocho de muestreo (Figura 8).

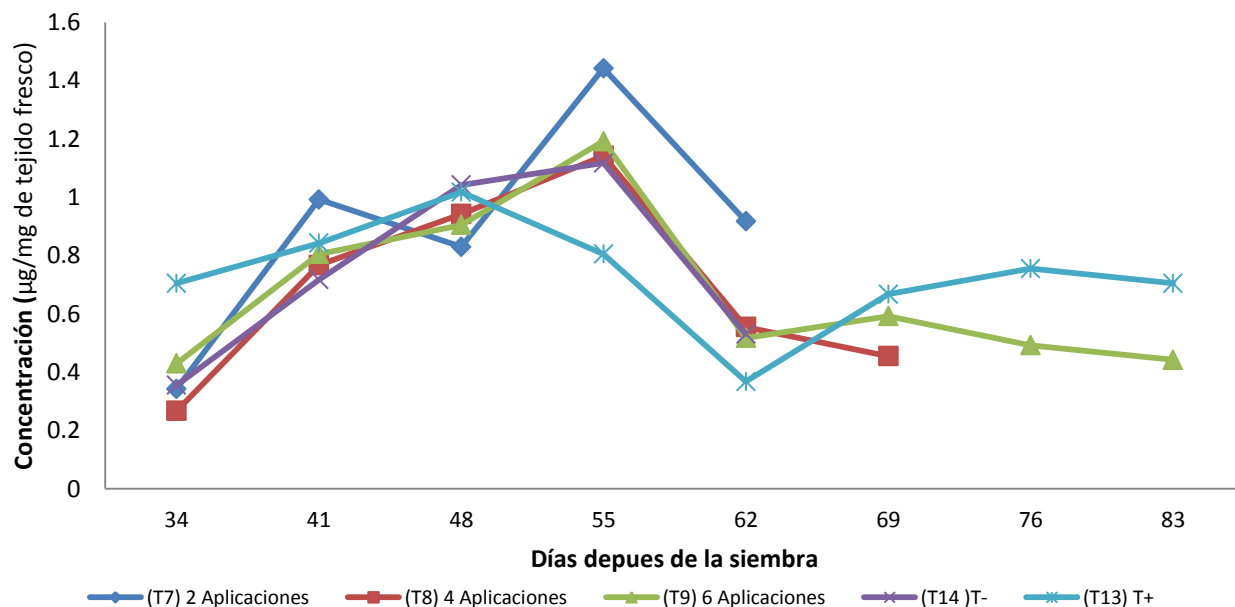


Figura 8: Comparación de la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida Cymoxanil + Famoxadona con 2, 4 y seis aplicaciones y los testigos en el tiempo.

Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que el número de aplicaciones de un fungicida pudo tener un efecto en la concentración de ácido salicílico en la planta. Se pudo observar que entre más sean las aplicaciones del producto fungicida, la concentración de ácido salicílico fue ligeramente menor durante el periodo de aplicación y posteriormente, aunque esto no se repitió en todas las fechas de muestreo; esto pudiera deberse a que la planta recibió menos presión del patógeno debido a la protección de la molécula fungicida, por lo tanto pudo haber bajado ligeramente sus niveles del compuesto. Para el caso de fluazinam, al aplicar seis veces se mostró un incremento superior de la concentración de ácido salicílico, dicho incremento adjudicado anteriormente a la toxicidad que causó el producto.

Cabe mencionar que en la última fecha de muestreo, previa a la muerte de las plantas por efecto de *P. infestans*, el ácido salicílico bajó sus niveles en la mayoría de los tratamientos, esto pudiera deberse a que el ácido salicílico también está relacionado con la expresión de genes de senescencia de la planta (Vlot *et al.*, 2008).

6.5. Concentración de ácido salicílico y severidad de *P. infestans*

En el caso de la relación entre la concentración de ácido salicílico y la severidad de *P. infestans*, en los tratamientos con fluazinam para dos aplicaciones consecutivas, estadísticamente si existió correlación (r), entre la cantidad de ácido salicílico y la severidad, la cual fue positiva, siendo significativa solo para los tratamientos con dos y seis aplicaciones (0.707 y 0.506 respectivamente), con un $\alpha=0.05$, mientras que para cuatro aplicaciones no fue significativa (NS) esta correlación (0.104), que se pudo apreciar de manera visual (Figura 9), donde se observó en la mayoría de las comparaciones que la concentración de ácido salicílico aumenta con la severidad de la enfermedad, cabe mencionar que la aplicación de este fungicida causó algunos problemas de intoxicación en la planta y la severidad de *P. infestans* siempre fue elevada.

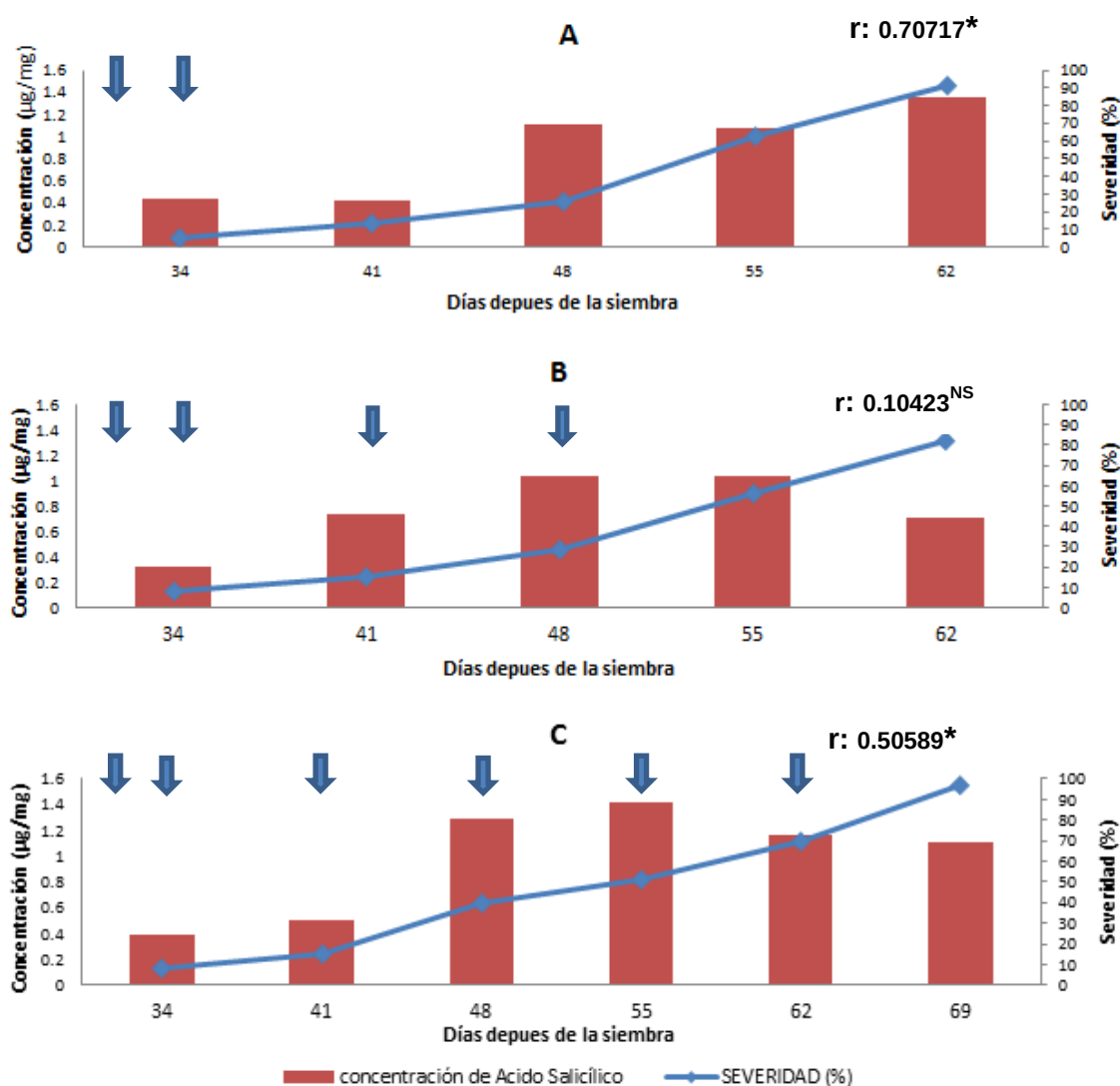


Figura 9: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida fluazinam con dos (A), cuatro (B) y seis aplicaciones (C) consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

* Significativo con $\alpha=0.05$, ^{NS} No significativo con $\alpha=0.05$

En el caso de los tratamientos con propamocarb clorhidrato, estadísticamente existió correlación entre la concentración de ácido salicílico y la severidad de la enfermedad, siendo negativa y significativa con $\alpha=0.05$ solo para el tratamiento con seis aplicaciones (-0.457), y no significativas para el tratamiento con dos y cuatro aplicaciones (0.17 y -0.1396 respectivamente), lo que indica que la concentración de ácido salicílico disminuye cuando la

severidad de la enfermedad aumenta y se aplica mayor número de veces el fungicida, cabe mencionar que los niveles de ácido salicílico se abaten cuando la enfermedad sobrepasó el 30% de severidad (Figura 10).

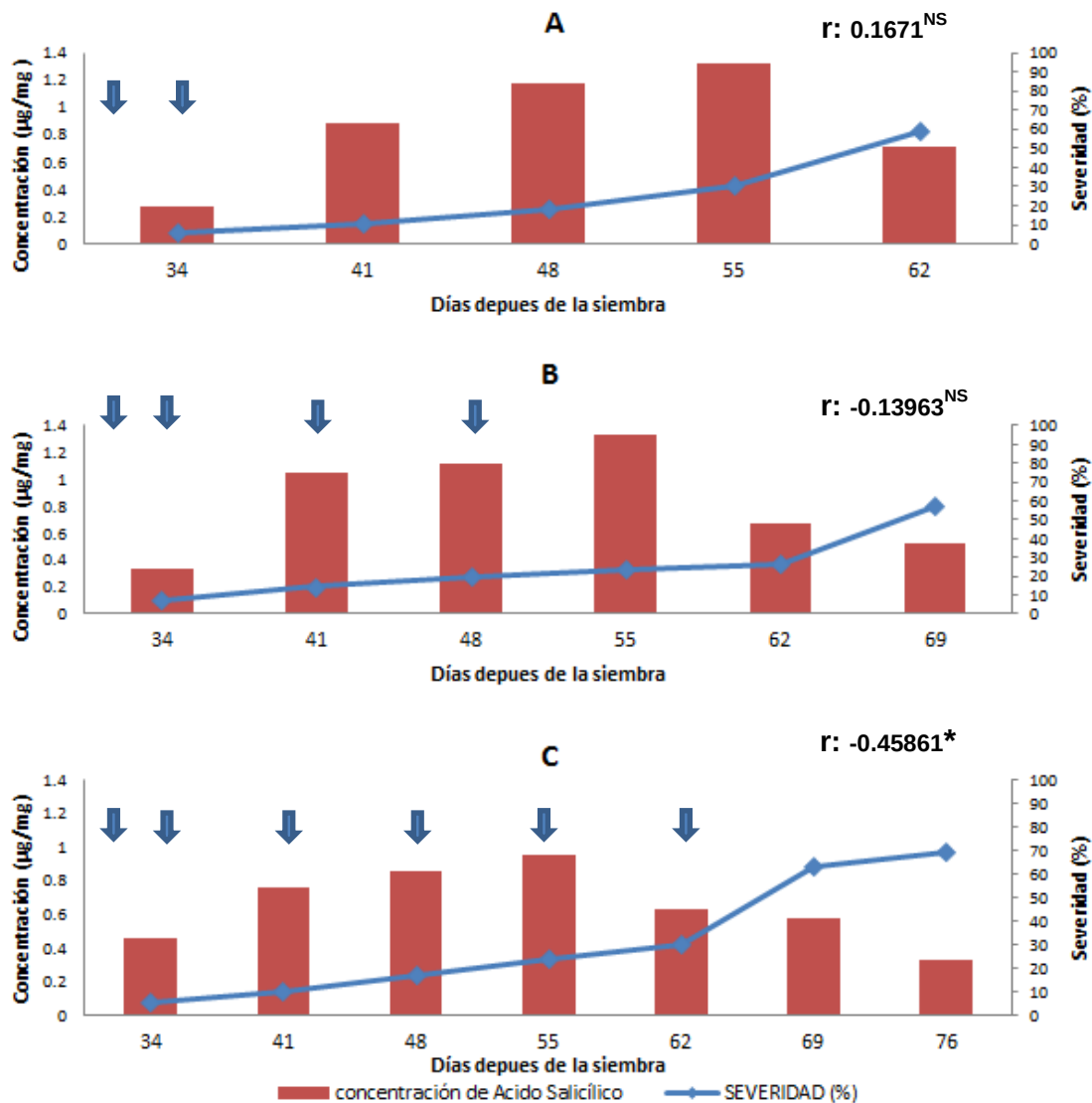


Figura 10: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida propamocarb clorhidrato con dos (A), cuatro (B) y seis (C) aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

* Significativo con $\alpha=0.05$, ^{NS} No significativo con $\alpha=0.05$

Para los tratamientos con cymoxanil+famoxadona, estadísticamente existió correlación entre la concentración de ácido salicílico y la severidad para todos los tratamientos, sin embargo solo fue significativa y negativa (-0.441) para el tratamiento con seis aplicaciones

consecutivas con $\alpha=0.05$ y no significativa para los tratamientos con dos y cuatro aplicaciones (0.239 y -0.216 respectivamente), lo que indica que la concentración de ácido salicílico disminuye cuando la severidad de la enfermedad se incrementa y se aplica mayor número de veces el fungicida, también se observó que los niveles de ácido salicílico se abaten cuando la enfermedad sobrepasa el 30% de severidad (Figura 11).

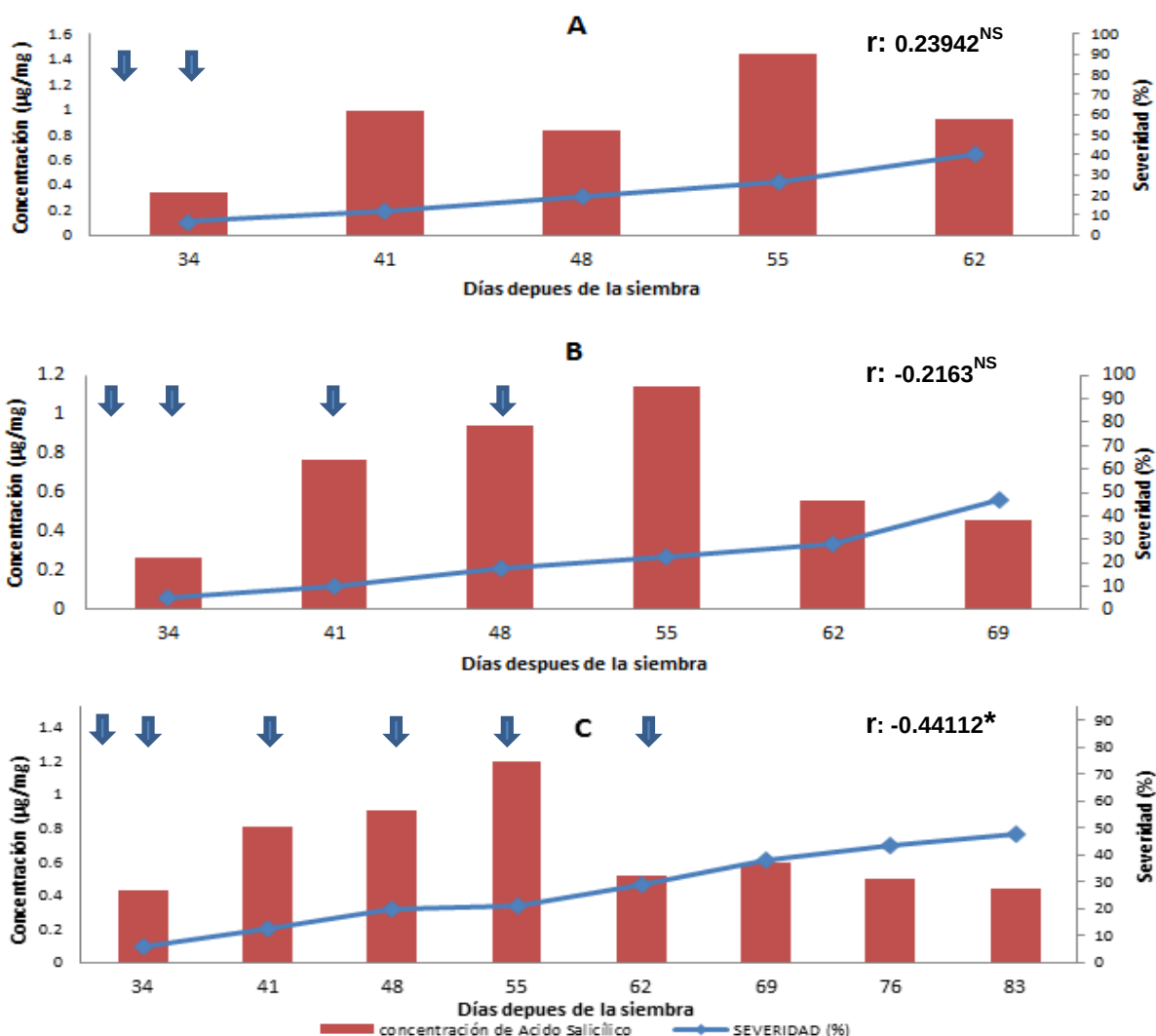


Figura 11: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida cymoxanli+famoxadona con dos (A), cuatro (B) y seis (C) aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

* Significativo con $\alpha=0.05$, ^{NS} No significativo con $\alpha=0.05$

Para los tratamientos con mandipropamida, estadísticamente existió relación entre la concentración de ácido salicílico y la severidad de la enfermedad siendo positiva para todos

los tratamientos con dos, cuatro y seis aplicaciones consecutivas (0.524, 0.419 y 0.523 respectivamente), esto también se pudo observar de manera visual donde la concentración de ácido salicílico aumenta cuando se incrementa la severidad de la enfermedad y el número de aplicaciones (Figura 12).

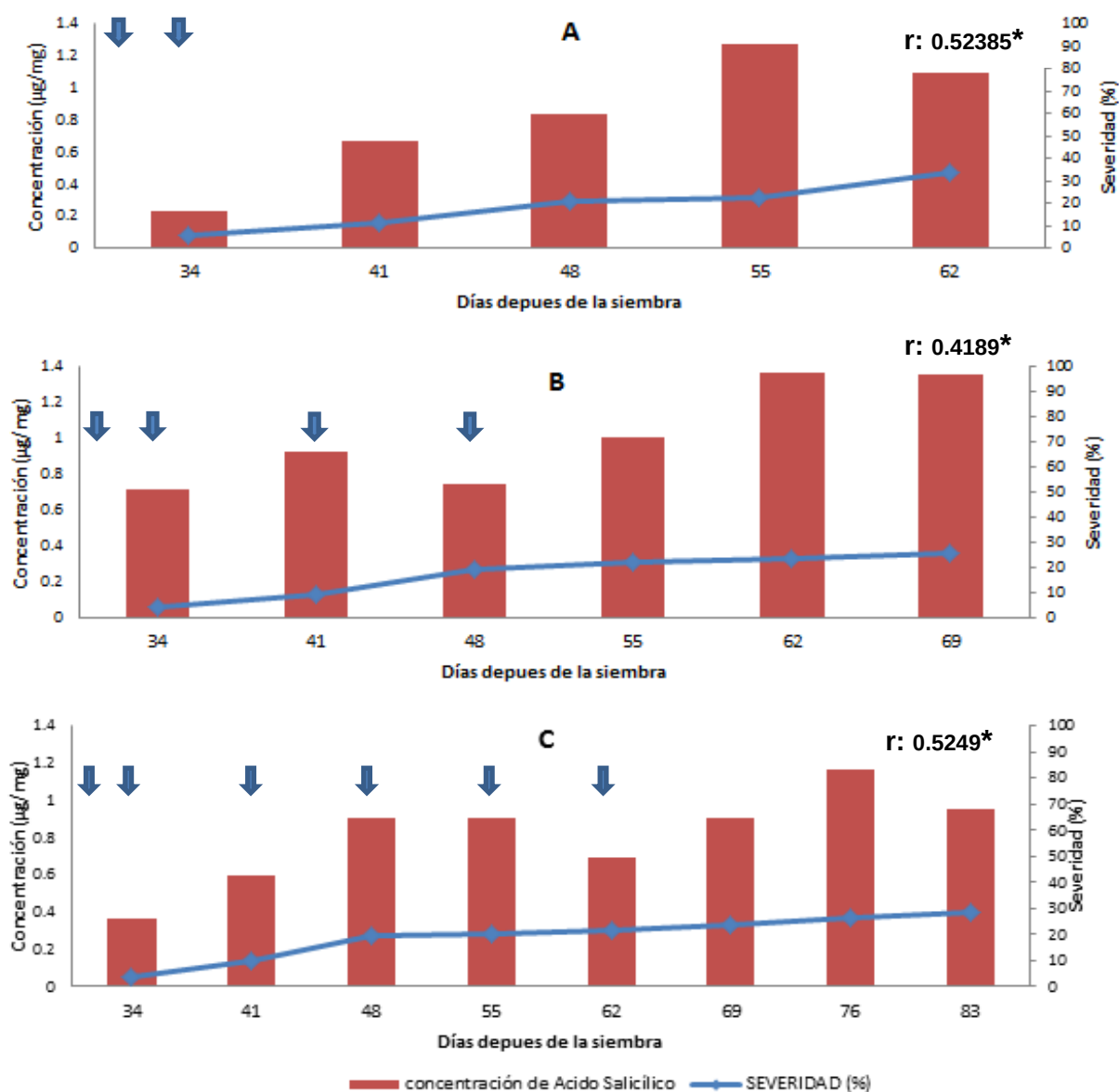


Figura 12: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en los tratamientos con fungicida mandipropamida con dos (A), cuatro (B)

y seis (C) aplicaciones consecutivas (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

* Significativo con $\alpha=0.05$, ^{NS} No significativo con $\alpha=0.05$

En el caso de los testigos, para testigo negativo (sin aplicación), estadísticamente existió relación entre la concentración de ácido salicílico y la severidad de la enfermedad siendo negativa y no significativa (-0.108) para el testigo positivo (siempre aplicación de mfenoxam-M-M), y positiva no significativa (0.187) para el testigo negativo sin aplicaciones (Figura 13), además se puede observar que en el testigo positivo (mefenoxam-M-M) hubo mejor control de *P. infestans* y los niveles de ácido salicílico son variantes en el periodo de evaluación, mientras que en el testigo negativo como no hubo control, la severidad fue mayor y provocó la muerte de la planta a los 62 dds.

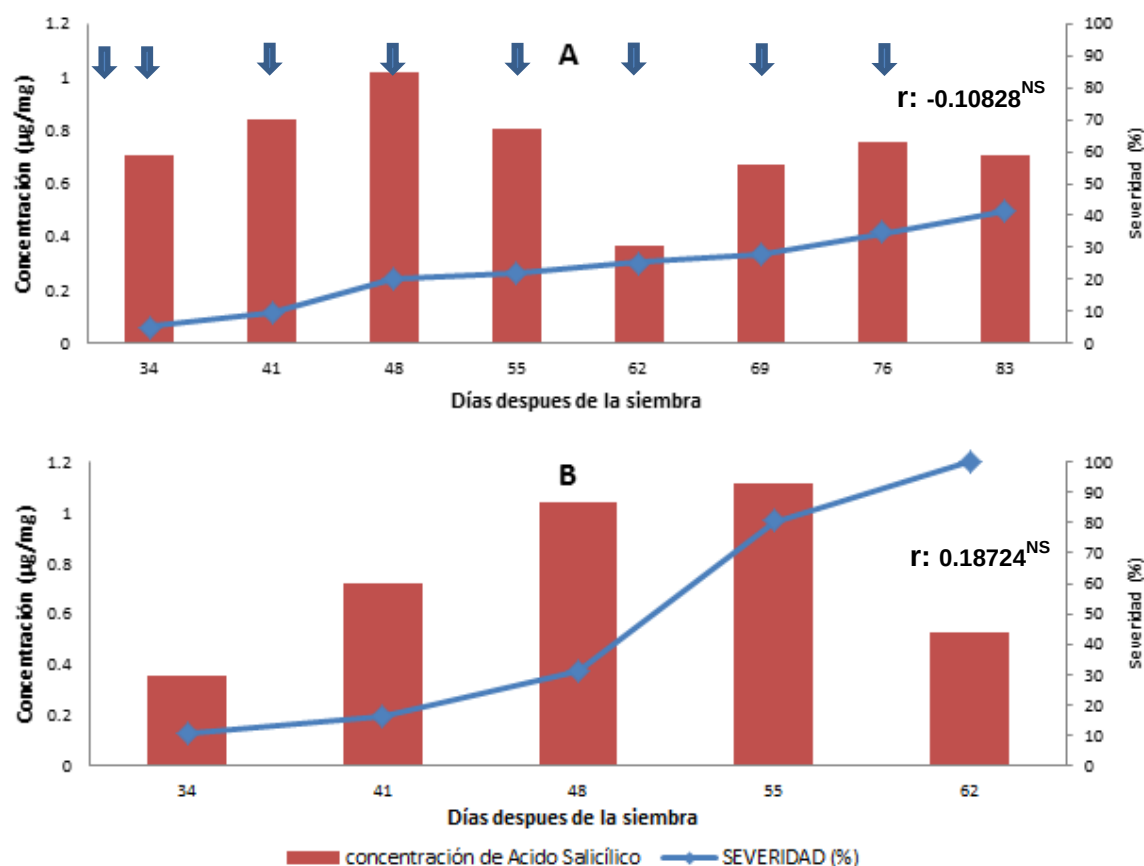


Figura 13: Comparación de tenencia y correlación (r) entre la severidad y la concentración de ácido salicílico en el testigo positivo (A) y el testigo negativo (B) (las flechas indican los momentos de aplicación de tratamientos).

* Significativo con $\alpha=0.05$, ^{NS} No significativo con $\alpha=0.05$

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que en los tratamientos con fungicida mandipropamida con dos, cuatro y seis aplicaciones, existió una correlación entre la severidad de *P. infestans* y la concentración de ácido salicílico dentro de la planta, que aunque no fue alta, si fue significativa, lo cual no sucedió para el resto de los fungicidas, sin embargo, en la mayoría de los tratamientos, se pudo apreciar que, en las primeras etapas de infección del patógeno (primeros 55 a 62 días después de la siembra) la planta presentó un incremento de ácido salicílico (tendencia ascendente) hasta alcanzar un máximo a los 55 a 62 días después de la siembra, para posteriormente presentar un descenso o variaciones de aumento y descenso, esto pudiera deberse a que al infectar *P. infestans* la planta tiende a activar sus mecanismos de defensa mediado por ácido salicílico, ya que, una característica distintiva de la respuesta de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), es la capacidad de la planta de sintetizar ácido salicílico, que activa la expresión de genes relacionados con defensa (Loake y Grant, 2007) y generalmente esto sucede posterior a la infección por algún patógeno. Esto lo han demostrado Kojima *et al.* (2013), que en sus investigaciones con *Arabidopsis*, encontraron que la inoculación de *Fusarium equiseti* permitió que la concentración de ácido salicílico se incrementara hasta alcanzar el pico máximo a las 18 horas posteriores a la inoculación para posteriormente empezar a descender.

Molders *et al.* (1996), encontraron que al inocular virus de la necrosis del tabaco (TNV) en *Arabidopsis*, la concentración de ácido salicílico se incrementó cuatro días después de inoculación, pero en este estudio, no se observó un incremento en el corto tiempo como lo reportaron estos autores, ya que las evaluaciones se realizaron semanalmente, pero se observó que el ácido salicílico se incrementó de forma gradual, esto pudiera deberse a que la mayoría de las hojas muestreadas no tenían daño por *P. infestans* al momento de la evaluación, lo que pudo provocar que este incremento se diera de esta manera, resultados similares fueron encontrados por Mirjana *et al.* (1998) en sus estudios con plantas de tabaco, donde al inocular las hojas con virus mosaico del tabaco (TMV) el ácido salicílico se incrementó pronunciadamente en las hojas de tabaco inoculadas y posteriormente se mantuvo en niveles altos, en cambio, en las hojas no inoculadas localizadas por debajo de la inoculada de la misma planta, el incremento de ácido salicílico fue gradual ascendente en el periodo de 150 horas evaluado.

Este incremento y posterior descenso de ácido salicílico igualmente, pudiera deberse a que una vez que la severidad aumenta por arriba del 30%, las defensas naturales de la planta son superadas por la enfermedad y se aprecia este abatimiento del ácido salicílico ya que en la mayoría de los tratamientos este descenso se presentó cuando la severidad de *P. infestans* supero este porcentaje. También se observó que en los tratamientos con propamocarb clorhidrato y cymoxanil+famoxadona cuando se aplicaron dos veces, la correlación fue positiva, pero al aplicarse cuatro y seis veces consecutivas la correlación se volvió negativa, esto es que a mayor número de aplicaciones menor fue el contenido de ácido salicílico y la severidad siguió su incremento, siendo mayor la correlación, negativa y significativa cuando se aplicaron seis veces consecutivas, mismo que sucedió en el testigo positivo (mefenoxam-M) con ocho aplicaciones, pudiendo deberse esto a que la presencia de estos fungicidas en la planta hace que la planta disminuya sus defensas, dependiendo de la actividad de estas moléculas sobre *P. infestans* y sobre el metabolismo de la planta, ya que para el caso de mandipropamida, esta presentó el mejor control de *P. infestans* y una mayor correlación entre los niveles de ácido salicílico y la severidad de la enfermedad, pudiéndose deber a que no interfiere en la síntesis de ácido salicílico y mantiene en óptimas condiciones a la planta (menor severidad) para que tenga activo su mecanismo de defensa ante el constante ataque de la enfermedad. El fluazinam presentó variaciones de correlación y de significancia, pero cabe mencionar que pudiera deberse a la intoxicación que causó en la planta, provocando estas variantes y alternando el resultado.

7. CONCLUSIONES

El ácido salicílico aparte de ser sintetizados de manera constante en la planta debido que forma parte de muchos procesos, sus niveles pueden ser modificados por la presencia de una enfermedad, en este caso por *P. infestans*.

El ácido salicílico en la planta, presentó un incremento en sus niveles en las primeras etapas de infección de *P. infestans* (primeros 55 a 62 dds) y cuando la enfermedad superó más del 30% de severidad sus niveles se ven abatidos.

Existe correlación entre la severidad de *P. infestans* y la concentración de ácido salicílico en la planta, y cuando hay una molécula fungicida esta correlación se ve modificada por efecto de ésta.

Los fungicidas influyen indirectamente en la cantidad de ácido salicílico que sintetiza la planta, ya que su efecto directo es al controlar la enfermedad, donde la severidad de *P. infestans* se ve regulada por efecto de estos y por lo tanto la síntesis de ácido salicílico varía dependiendo del fungicida.

Existen fungicidas como el propamocarb clorhidrato, cymoxanil+famoxadona y mefenoxam-M, que al ser aplicados cuatro o más veces consecutivas pueden reprimir la síntesis de ácido salicílico en la planta.

El fungicida mandipropamida fue el que generó un mejor control de la enfermedad y mantuvo elevados y constantes los niveles el ácido salicílico, lo que indica que no reprime la síntesis de ácido salicílico.

Cuando la planta entra en senescencia o está cercana a la muerte por efecto de *P. infestans*, los niveles de ácido salicílico se ven abatidos.

8. LITERATURA CITADA

Agrios G. N. (1996). Fitopatología. México D.F. (México): Limusa.

Collinge D. B., Gregersen P., Thordal C. H. (1994) The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. Basra,AS. Ed.New York, Marcel Dekker. p. 391-433.

Glazebrook J., (2005) Constrating mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology 43:205-227.

González G. E., Laredo A. J., Ascacio V. J., Jasso de R. D. y Hernández C. D. (2015) Changes in the Production of Salicylic Acid in Potato Plants (*Solanum tuberosum*) as Response to Foliar Application of Biotic and Abiotic Inductors, American Journal of Plkant Sciences, 6, 1785-1791.

- He W., Li H., Li X., Li M. Q. and Chen Y.W. (2007)** Tetranynchus urticae Koch Induced Accumulation of Salicylic Acid in Frijole Leaves. Pesticide Biochemistry and Physiology, 88:78-81.
- Kojima H., Hossain M. M., Kubota M. and Hyakumachi M. (2013)** Involvement of the Salicylic Acid Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Arabidopsis by Plant Growth-Promoting Fungus Fusarium equiseti GF19-1. Journal of Oleo Science, 62:415-426.
- Mirjana S., Vladimir S. E., Ilya R. (2007)** Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants. Plant Physiol. 116:387–392
- Molders W., Buchala A. and Metraux J.P. (1996)** Transport of Salicylic Acid in Tobacco Necrosis Virus Infected Cucumber Plants. Plant Physiology, 112:787-792.
- Nojosa G. B. A., Resende M. L. V., Barguil B. M., Moraes S. R. G. and Boas C. H. V. (2009)** Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. Summa Phytopathologica, 35, 60-62.
- Ogawa T., Ara T., Aoki K., Suzuki H. and Shibata D. (2010)** Transient Increase in Salicylic Acid and Its Glucose, Conjugates after Wounding in Arabidopsis Leaves. Plant Biotechnology, 27:205-209.
- Robledo E. M. N., (2014)** Suceptibilidad/Resistencia de Phytophthora infestans (Mont.) de Bary a fungicidas. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, 75 pp.
- Shulaev V., Silverman P., and Raskin I. (1997)** Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature 385: 718-721.
- Stangarlin J. R., Kuhn O. J., Toledo M. V., Portz R. L., Schwan-Estrada K. R. F. and Pascholati S.F. (2011)** A defesa vegetal contra fitopatógenos. Scientia Agraria Paranaensis, 10:8-46.
- Torres M. A., Jones J. D. G. and Dangl J.L. (2006)** Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. Plant Physiology, 141:373-378.
- Vlot C. A., Klessig F. D. and Wook S. P. (2008)** Systemic acquired resistance: elusive signal(s). Current Opinion in Plant Biology 11:436-442.

- Warrier R. R., Paul M., Vineetha M. V. (2013)** Estimation of salicylic acid in Eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology*, 3(1–2): 90–97.
- 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.
- Yoshioka K., Nakashita H., Klessig D.F. and Yamaguchi I. (2001)** Probenazole Induces Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis with a Novel Type of Action. *The Plant Journal*, 25: 149-157.