



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**FOSFITO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA PARA
EL CONTROL DE *Phytophthora cactorum* EN FRESA**

JORGE ALBERTO GIL VALENZUELA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2012

La presente tesis, titulada **Fosfito en la solución nutritiva para el control de *Phytophthora cactorum* en fresa**, realizada por el alumno **Jorge Alberto Gil Valenzuela**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

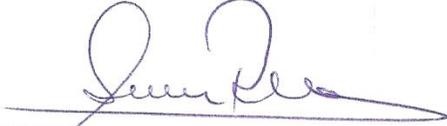
**MAESTRO EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA:



DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ

ASESORA:



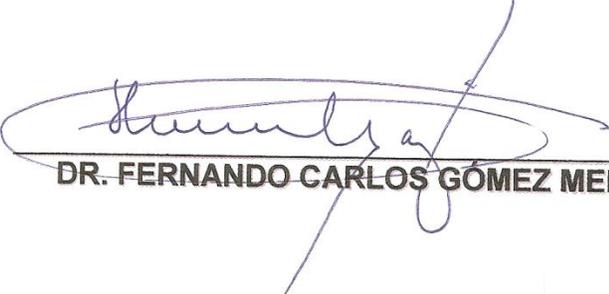
DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

Montecillo, Texcoco, México, Marzo de 2012

**FOSFITO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA
PARA EL CONTROL DE *Phytophthora cactorum* EN FRESA**

Jorge Alberto Gil Valenzuela, MC

Colegio de Postgraduados, 2012

Se establecieron plantas de fresa cv. Festival en sistema hidropónico abierto, utilizando como sustrato tezontle, con el objetivo de evaluar el efecto del fosfito en el control pre-infección de la pudrición cuerosa de la fresa ocasionada por *Phytophthora cactorum*. Los porcentajes del fósforo (P) total en la solución nutritiva en forma de fosfito (Phi) evaluados fueron 0, 5, 10, 15 y 20 %. Las soluciones nutritivas conteniendo Phi se suministraron una única ocasión en cinco riegos con intervalos de 1 h. Dos, cuatro y siete días después del tratamiento con fosfito, los frutos se inocularon con una solución conteniendo *P. cactorum* a una concentración de 10^5 zoosporas mL⁻¹. La aplicación foliar de mefenoxam™ (Ridomil Gold 480 SL 45.28%) en la concentración recomendada por el proveedor se utilizó como testigo positivo en el control de *P. cactorum*. La incidencia de pudrición cuerosa en frutos de fresa se evaluó a los 12 días después de la inoculación de los frutos. Los resultados obtenidos muestran que los diferentes porcentajes del P total en forma de Phi en la solución nutritiva, son igualmente efectivos que mefenoxam™ para el manejo de *P. cactorum* en un sistema hidropónico abierto. Se observó que la adición de iones Phi en menor cantidad a las recomendadas comercialmente favorece un mejor manejo de la enfermedad, al reducir los costos de producción y contaminación al ambiente.

Palabras clave: *Fragaria x ananasa* Duch., pudrición cuerosa, mefenoxam, sodio.

**PHOSPHITE IN THE NUTRIENT SOLUTION
FOR THE CONTROL OF *Phytophthora cactorum* IN STRAWBERRY**

Jorge Alberto Gil Valenzuela, MC

Colegio de Postgraduados, 2012

Strawberry plants cv. Festival were established in an open hydroponic system, using volcanic rock as substrate, in order to evaluate the effect of phosphite (Phi) in the pre-infection management of leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. The percentages of total phosphorus (P) as Phi in the nutrient solution evaluated were 0, 5, 10, 15 and 20%. The nutrient solutions containing Phi were supplied only once in five waterings at intervals of 1 h. Two, four and seven days after treatment with Phi, fruits were inoculated with a solution containing *P. cactorum* at a concentration of 10^5 zoospores. Foliar application of mefenoxam™ (Ridomil Gold 480 SL 45.28%) in the concentration recommended by the supplier was used as positive control against *P. cactorum*. The incidence of leather rot in strawberry fruit was assessed 12 days after inoculation. The results show that the different percentages of total P as Phi in the nutrient solution are equally effective as mefenoxam™ in controlling *P. cactorum* in an open hydroponic system. We observed that the addition of Phi at lower concentrations than those commercially recommended enables a better management of the disease, as it reduces costs of production and impacts in the environment.

Key words: *Fragaria x ananasa* Duch., leather rot, mefenoxam, sodium.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado por la realización de mis estudios de postgrado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal del Colegio de Postgraduados por todas las facilidades y apoyo prestados en la realización de esta investigación.

A todos, que de alguna u otra forma, contribuyeron a que esto fuera posible.

GRACIAS

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. OBJETIVO E HIPÓTESIS	3
3.1. Objetivo general	3
3.2. Hipótesis general	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Generalidades de la fresa	4
4.1.1. Origen	4
4.1.2. Importancia económica de la fresa	5
4.2. Fosfito en plantas superiores	6
4.2.1. Química del fosfito	6
4.2.2. Absorción, transporte y almacenamiento de fosfito	6
4.2.3. Acción fungicida del ión fosfito	8

	Página
4.2.4. Fosfito como fuente de fósforo asimilable para la planta	10
4.3. <i>Phytophthora cactorum</i>	11
4.3.1. Clasificación y características de <i>Phytophthora cactorum</i>	11
4.3.2. Sintomatología	12
4.3.3. Ciclo y epidemiología de la enfermedad	14
4.3.4. Manejo de la enfermedad	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1. Ubicación del experimento	17
5.2. Identificación de <i>Phytophthora cactorum</i>	17
5.2.1. Recolección y aislamiento	17
5.2.2. Identificación molecular del patógeno	18
5.2.2.1. Extracción del DNA genómico	18
5.2.2.2. Ampliación por PCR del DNA ribosomal	18
5.2.2.3. Análisis filogenético de la región del ITS	19
5.3. Material de inoculación (zoosporas de <i>Phytophthora cactorum</i>)	20
5.4. Material vegetal	21
5.5. Manejo del experimento	21
5.6. Diseño experimental utilizado	21
5.7. Aplicación de los tratamientos	22
5.7.1.- Fosfito y mefenoxam	22

	Página
5.7.2. Inoculación de frutos	23
5.8. Variable evaluada	23
5.8.1. Porcentaje de frutos enfermos	23
5.9. Análisis estadístico	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7. CONCLUSIONES	32
8. LITERATURA CITADA	33

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales estados productores de fresa (riego y temporal) en México	5
Cuadro 2. Productos comerciales a nivel mundial conteniendo fosfito como ingrediente activo	9
Cuadro 3. Cantidades de fosfito correspondientes a los diferentes porcentaje aplicados en la solución nutritiva	22

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Comparación de estructuras químicas entre los aniones fosfito (Phi) y fosfato (Pi).	6
Figura 2. Movimiento vía xilema y vía floema de fosfito dentro de la planta	7
Figura 3. Aspecto del sitio de recolección de frutos de fresa sintomáticos a <i>Phytophthora cactorum</i>	18
Figura 4. Diferentes niveles de daño de <i>Phytophthora cactorum</i> en frutos de fresa	24
Figura 5 Estructuras de <i>Phytophthora cactorum</i> observadas. A, micelio cenocítico; B. Esporangio; C, Oosporangio y anteridio paragino	25
Figura 6. Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes al espacio transcripto interno del rDNA ribosomal del <i>Phytophthora cactorum</i> y otras especies del género <i>Phytophthora</i> usando el método Máxima parsimonia. El aislamiento Michoacán se identificó como <i>P. cactorum</i> . Se aisló de frutos de fresa con síntomas de pudrición cuerosa de la fresa en Maravatío, Michoacán en 2010	26
Figura 7 Efecto de diferentes porcentajes del P total como fosfito en la solución nutritiva y de la aspersión foliar de mefenoxam, aplicados en preinfección, en el control de <i>P. cactorum</i> en frutos de fresa cv. Festival, 2 (a), 4 (b) y 7 (c) días antes de la inoculación. Barras con letras distintas en cada subfigura presentan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $\alpha=0.05$)	27

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de fresa representa el empleo de muchas familias en las zonas de producción de esta frutilla, así como una importante fuente de derrama económica, sin embargo, los problemas fitopatológicos limitan fuertemente su producción e incrementan los costos, uno de los controles más efectivos y económicos contra patógenos del suelo con que cuenta el productor es el uso de bromuro de metilo aplicado al suelo, el cual está prohibido de forma total ya que contamina el medio ambiente y destruye la capa de ozono. Lo anterior obliga a buscar alternativas viables, económicas e igualmente efectivas a la aplicación de bromuro de metilo para el control de fitopatógenos. Una opción es la adición de fosfito a la solución nutritiva con el objetivo de que sean absorbidos por la raíz y traslocados al resto de la planta, éstos han demostrado ser efectivos cuando han sido aplicados vía foliar en el control de hongos del grupo de los oomicetes en fresa. Su utilización en la solución nutritiva ahorraría el uso de mano de obra que implica la aplicación foliar y reduce la posible contaminación al medio ambiente.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos demuestran que la utilización de fosfito para el control de oomicetos, específicamente *Phytophthora cactorum*, provee un control excelente de la pudrición del fruto en fresa en pre y post-infección; sin embargo, las aplicaciones de éstos sólo se han realizado de manera foliar y en cultivos no hidropónicos, por lo que es necesario conocer si los efectos favorables se mantienen cuando el fosfito se adiciona en la solución nutritiva y en condiciones hidropónicas. Por lo anterior, en este estudio se evaluarán distintas concentraciones de fosfito en la solución nutritiva sobre el control de *Phytophthora cactorum*, en preinfección, en plantas de fresa cv. festival, cultivadas bajo condiciones de invernadero y en un sistema hidropónico abierto, utilizando tezontle rojo como sustrato.

3. OBJETIVO E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la adición de fosfito a la solución nutritiva, a distintas concentraciones, sobre el control preinfección de *Phytophthora cactorum* (pudrición del fruto) en fresa cv. Festival, cultivada bajo condiciones de invernadero y en sistema hidropónico abierto.

3.2. Hipótesis general

La adición de fosfito, en concentraciones menores al 20% con relación al fósforo total suministrado en la solución nutritiva y aplicadas una sola vez, activa el sistema de defensa de las plantas de fresa y proporciona controles eficientes contra *Phytophthora cactorum*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades del cultivo de fresa

4.1.1. Origen

Existen especies de fresa oriundas de Europa, como *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* Duch y *Fragaria viridis* Duch, las cuales producen frutos pequeños; por otro lado, existen especies americanas, tales como *Fragaria chiloensis* Duch, *F. virginiana* Duch, las cuales producen frutos grandes y de cuyos cruzamientos derivan los actuales cultivares, que suelen ser conocidos botánicamente como *Fragaria x ananassa* Duch (Maramoto y López, 1988).

Dada la dedicación del hombre al cultivo de la fresa y su afán por obtener plantas con cualidades diferentes tales como: mayor potencial de rendimiento, diferente sabor, color y tamaño de fruto así como resistencia a los diferentes factores bióticos y abióticos que limitan la producción, se han creado un gran número de variedades, estas se dividen en tres grandes grupos (Maroto y López, 1988):

- 1.- Variedades híbridas o inglesas o de fruto grande, las cuales se derivan del fresal de Carolina.
- 2.- Variedades de las cuatro estaciones, también conocidas como de frutos pequeños.
- 3.- Variedades de frutos grandes pero reflorescientes (bíferas) caracterizadas por dar una segunda cosecha tardía

Las variedades principales que se cultivan en México proceden del programa de mejoramiento de la Universidad de California.

4.1.2. Importancia económica de la fresa

Este cultivo representa a nivel nacional e internacional una importante fuente generadora de empleos y divisas para los países productores. México es el principal exportador de fresa al mercado de los Estados Unidos de Norteamérica. En el Cuadro 1 se muestran los principales estados productores de fresa en nuestro país.

Cuadro 1.- Principales estados productores de fresa (riego y temporal) en México (SIAP, 2011).

Ubicación	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (Mg)	Rendimiento (Mg/ha⁻¹)
Baja California	1,464.70	1,464.70	83,428.82	56.96
Baja California Sur	157.7	157.7	6,108.35	38.73
Guanajuato	1,025.01	1,025.01	16,098.68	15.71
Jalisco	118.5	118.5	2,243.75	18.94
México	252	252	5,474.60	21.72
Michoacán	3,522	3,252.5	113,193.37	34.80
TOTAL	6,555.41	6,281.91	226,657.28	36.08

Michoacán es el mayor estado productor del país, donde destacan tres regiones productoras: el Valle de Zamora, la región de Panindícuaro y el Valle de Maravatío: esta última considerada la región más productora de todo el país (SIAP, 2011).

4.2 Fosfito en plantas superiores

4.2.1 Química del fosfito

El fosfito (PO_3^{3-}) resultado de una oxidación incompleta del fósforo, donde un ión hidrógeno ocupa el lugar que debiera haber ocupado un ión oxígeno, como muestra la Figura 1 (Lovatt y Mikkelsen, 2006), dando como resultado un isómero del ión fosfato (Ouimette y Coffey, 1990), que puede ser conocido como ácido fosforoso, ácido fosfónico, fosfonato o fosfito.

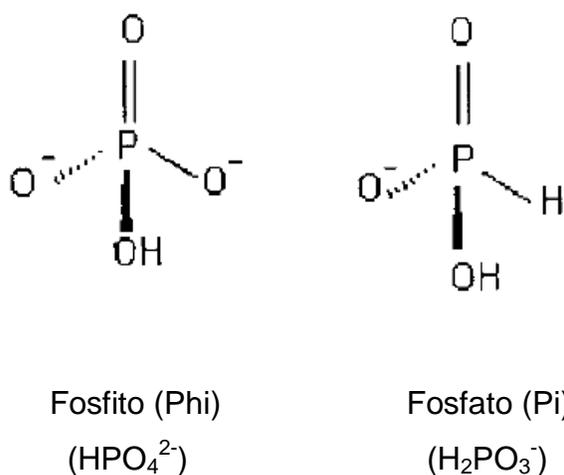


Figura 1. Comparación de estructuras químicas entre los aniones fosfito (Phi) y fosfato (Pi) (McDonald *et al.*, 2001).

4.2.2 Absorción, transporte y almacenamiento de fosfito

Cuando se aplica fosfito al suelo una mínima parte del mismo pueden ser oxidados a fosfato por microorganismos procariotes tales como: *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, y varias especies del género *Pseudomonas* y *Rhizobium* (McDonald *et al.*, 2001); la mayor parte es absorbido directamente como fosfito.

La raíces de las plantas superiores no desarrollan mecanismos que permitan diferenciar, al momento de la absorción, fosfato de fosfito, por lo cual estos últimos son absorbidos mediante transportadores de fosfato de alta afinidad a nivel

membrana (Danova-Alt *et al.*, 2008; d'Arcy-Lameta y Bompeix, 1992); el hecho que la planta no diferencie entre ambos iones ha sido demostrado por Ticconi *et al.* (2001), quienes observaron que el suministro de fosfito inhibe la manifestación de síntomas característicos de la deficiencia de fósforo: crecimiento radical, incremento de pelos radicales, elongación de las raíces; igualmente en tomate la adición de fosfito impide la respuesta molecular y morfológica que normalmente se observa ante la falta de fósforo (Förster *et al.*, 1998), impiden la manifestación de los genes *LePT1*, *LePT2*, *LePS2*, *LePS3* y *LePT2* (Varadarajan *et al.*, 2002).

Estudios en maíz y calabaza (*Cucurbita pepo* L.) demostraron que el ión fosfito es transportados por xilema y floema como se observa en la Figura 2 (Ratjen, 2005; Schroetter *et al.*, 2006), incluso es mejor absorbido vía foliar, que fosfato (Ratjen, 2005). La absorción de ambos vía radical es de fuerte competencia, es decir, que mientras mayor sea la concentración de fosfito en la solución del suelo mayor será su absorción y menor será la absorción de fosfato de la misma solución (Thao y Yamakawa, 2010).

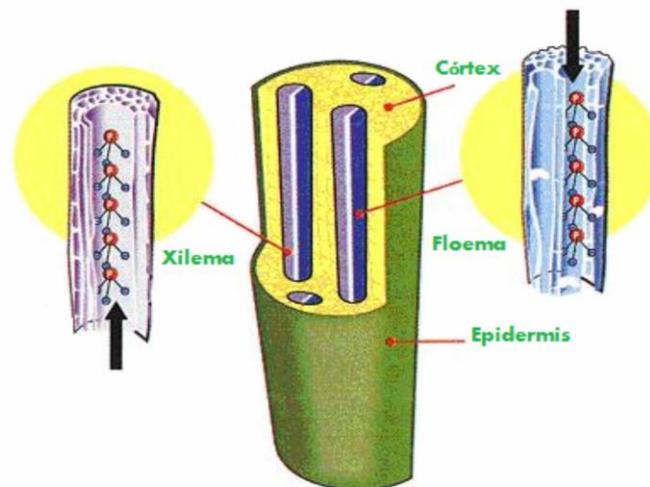


Figura 2. Movimiento ascendente y descendente, vía xilema y vía floema respectivamente, de fosfito dentro de la planta (Erwin y Ribeiro, 1996).

Cuando los niveles de fósforo asimilable en la planta son los adecuados para un desarrollo normal de la misma, el fosfito absorbido es almacenado en la vacuola, (Danova-Alt *et al.*, 2008): sin embargo, niveles bajos de fósforo asimilable dentro de la planta ocasiona que el fosfito se concentre en el citosol. El fosfito es extremadamente tóxico cuando se suministra en ausencia de iones fosfato (Varadarajan *et al.*, 2002).

4.2.3. Acción fungicida del ión fosfito

Desde mediados de los años setenta se inició la utilización del fosetil de aluminio (fosetil-Al) como fungicida; no obstante se desconocía que el verdadero responsable de la acción fungicida era el ión fosfito al cual se degrada la molécula de fosetil de aluminio dentro de la planta, este conocimiento y el vencimiento de la patente exclusiva de fosetil-Al, reactivó el interés por los fosfitos, demostrándose que poseen características fungicidas contra hongos del grupo de los oomicetos, nemátodos del género *Heterodera avenae* y *Meloidogyne marylandi* en cereales (Oka *et al.*, 2007) y activación de las defensas naturales de la planta contra el ataque de patógenos (Wicks *et al.*, 1991; Förster *et al.*, 1998; Rebollar-Alviter *et al.*, 2010).

Morfológicamente el efecto fungicida del fosfito sobre diferentes patógenos del género *Phytophthora* spp. se manifiesta como una reducción en el crecimiento micelial, distorsión de hifas, inhibición de la producción de esporangios (Daniel y Guest, 2006) y reducción en la producción de zoosporas, lo que indica que su eficacia se centra en inhibir la capacidad del patógeno para infectar y colonizar los tejidos del hospedante (Wilkinson, 2001). Desde el punto de vista bioquímico se considera que su sitio de acción es el metabolismo del fósforo (Darakis *et al.*, 1997), metabolismo del pirofosfato (Niere *et al.*, 1990) inhibiendo la actividad de la enzima pirofosfatasa (Martín *et al.*, 1998).

Actualmente podemos encontrar en el mercado mundial de agroquímicos productos a base fosfitos con diferentes nombres comerciales y empresas formuladoras (Cuadro 2).

Cuadro 2. Productos comercializados a nivel mundial conteniendo fosfito como ingrediente activo (Thao y Yamakawa, 2009).

Nombre comercial	Compañía formuladora	País de origen	Ingrediente activo	Uso registrado
Aliette	Bayer Cropscience	Alemania	Fosfito de aluminio	Fungicida
Nutri-phite	Biagro Western Sales	EUA	Fosfitos y ácidos orgánicos	Fertilizante
Ele-Max	Helena Chemical	EUA	Ácido fosforoso	Fertilizante foliar
ProPhyt	Luxembourg-pamol	EUA	Fosfito monopotásico	Fungicida sistémico
Nutrol	Lidochem	EUA	Fosfito de potasio	Fertilizante y fungicida
Phostrol	NuFarm America	EUA	Ácido fosforoso	Pesticida bioquímico
Agrifos	Liquid Fert Pty (Agrichem)	EUA	Fosfito monopotásico	Fungicida
Foli-r-fos 400	UiM Agrochemicals	Australia	Fosfito monopotásico	Fungicida
Fosphite	Jh Biotech	EUA	Fosfito monopotásico	Fungicida
Lexx-a-phos	Foliar Nutrients Inc	EUA	Fosfito monopotásico	Fungicida
Trafos line	Tradecorp	España	Fosfito de potasio	Fertilizante y estimulador
Phytos'K	Valagro	Italia	Fosfito de potasio	Bioestimulante
Phosfik line	Biolchem	Italia	Ácido fosforoso	Fertilizante
Fosfisan, Vigorsan	Agrofill	Italia	Fosfito de potasio	Estimulador de las defensas
Geros-K	L-Gobbi	Italia	Fosfito de potasio	Fertilizante
Kalium Plus	Lebosol	Alemania	Fosfito de potasio	Fertilizante
Frutoguard	Spiess Urania	Alemania	Fosfito de potasio	Fertilizante
Foliaphos	Plantin	Francia	Fosfito de potasio	Fertilizante

4.2.4. Fosfito como fuente de fósforo asimilable para la planta

Desde 1950 quedó especificado que la aplicación de fosfito no proporcionaba el fósforo total necesario para la planta. sin embargo, investigaciones de Lovatt (1990a; 1990b) concluyen que aplicaciones de fosfito al suelo o foliares podían reemplazar al fosfato como fuente de fósforo en cítricos y aguacate, reavivando el interés por la utilización de fosfito como fuente de resistencia a enfermedades y fuente de fósforo asimilable para los cultivos. Así mismo Föster *et al.* (1998) plantean que la combinación de los iones fosfito y fosfato permiten una mejor asimilación del fósforo en comparación con aplicaciones exclusivas de fosfato. Coincidiendo con lo anterior, Albrigo (1999) reportó incrementos significativos en el número de flores, rendimiento y sólidos solubles totales en naranja Valencia mediante una sola aplicación foliar de fosfito antes de la floración. Las investigaciones donde la aplicación de fosfitos incrementa los rendimientos y la calidad de los frutos cosechados no necesariamente indican que las plantas están utilizando fosfito como fuente directa de fósforo, muy probablemente los efectos positivos sean debido a las propiedades fungicidas de los mismos y el caso de las aplicaciones al suelo, podrían estar contribuyendo los microorganismos a la transformación de fosfito a fosfato (Thao *et al.*, 2009); es decir, el mantener o incrementar la sanidad del cultivo, por parte del fosfito, es lo que permite una mayor expresión del potencial genético de rendimiento del cultivo.

En Investigaciones más recientes, contrario a lo antes expuesto, se especifica que las aplicaciones de fosfito tanto vía foliar como radical, no deben ser consideradas como fuente de fósforo asimilable a la planta, ya que la oxidación de éstos dentro de la misma, cuando sucede, es tan lenta y en pocas cantidades que no es suficiente para proveer de fósforo asimilable a la planta (Thao *et al.*, 2009; Ratjen y Gerendás, 2009), incluso aplicaciones intensivas (muy frecuentes) de fuentes de fosfito vía foliar en plantas en cultivos hidropónicos con carencia de fósforo causan daños al follaje y a la raíz (Bertsch *et al.*, 2009) ya que la deficiencia de

fósforo asimilable las hace más sensible a la aplicación de fosfitos (Ratjen y Gerendás, 2009).

4.3. *Phytophthora cactorum*

En México, *Phytophthora cactorum* fue identificada por primera vez en las regiones freseras de Zamora, Michoacán e Irapuato, Guanajuato. En 1986, se observó que conjuntamente con *Colletotrichum* sp reducen los rendimientos en promedio en 22%, lo cual representa una pérdida económica importante, sobre todo por el alto valor económico que la fresa alcanza en las épocas de lluvias, que es cuando se presentan con frecuencia los patógenos citados (Dávalos y Castro, 1987). En las mismas regiones, durante el año 1987, *P. cactorum* infectó a la mayoría de las variedades sembradas en el área, pero con mayor incidencia en el cv. Pájaro (Castro y Dávalos, 1987). Mendoza (1987) también reportó la presencia del hongo sobre frutos de fresa de la variedad Tioga en la región de Villa Guerrero, Estado de México.

Seemuller (1984), reporta que la pudrición de la corona parece ser inducida por una raza específica del hongo porque sólo los aislamientos de las coronas enfermas son patogénicos a otras coronas de fresa; los aislamientos de *P. cactorum* de frutos afectados no causan pudriciones de la corona; investigaciones más recientes lo confirman, al detectarse una gran variabilidad genética entre aislamientos realizados de plantas de fresa, la misma variabilidad se detectó en aislamientos realizados en otras hospederas del mismo hongo (Hantula *et al.*, 2000; Thomidis, 2003; Huang *et al.*, 2004).

4.3.1. Clasificación y características de *Phytophthora cactorum*

Se encuentra clasificada dentro el dominio Eucariota, Reino Chromista, Phylum Stramenopila, Orden Pythiales, Familia Pythiaceae (Keeling *et al.*, 2005).

Las oosporas de *P. cactorum* son esféricas (usualmente de 24 a 30 μ de diámetro), con pared lisa, de doble capa y de color amarillento. Los anteridios son típicamente paraginos y están adheridos al oogonio cerca del tallo oogonial (Mass, 1984). Los esporangios pueden estar colocados terminal o lateralmente, son poco coloreados o transparentes, ovoides de 50 a 60 μ (ocasionalmente pueden llegar a medir hasta 90 μ) y de 30 a 40 μ de ancho, presentan una papila en el ápice. Cada esporangio puede contener más de cinco zoosporas. La hifa es delgada de crecimiento irregular y algunas veces ramificado en ángulo recto. Este pseudohongo se cultiva en agar papa dextrosa, donde forma colonias blancas pobremente enmarañadas (Mass, 1984).

En México, Mendoza (1987) reportó en Villa Guerrero a *P. cactorum* var. *Aplanata* con las siguientes características: esporangióforo ramificado en simposio simple, esporangios alargados, elipsoidales con base cónica, ovoides u obpiriformes y algunos distorsionados, de 39.2 a 90.1 por 25.4 a 39.2 μ , con tapón basal conspicuo y la papila prominente que mide de 3.9 a 6.8 μ . La inserción es simétrica y asimétrica. Oogonio esférico de base cónica (embudo), anteridio parágino, declino ubicado cerca de la base del oogonio o parágino monoclino, casi sésil. Oosporas esféricas, lisas, pleróticas, de 24.5 a 37.2 μ de diámetro (29.8 μ en promedio), pared gruesa (de 1.9 a 2.9 μ); micelio de 2.9 a 4.9 μ (promedio 4.2 μ) de diámetro, aunque también se encuentra a *P. cactorum* var. *Typica*. En España, De los Santos (2003) la identifica utilizando las siguientes características: oogonio esférico de pared delgada, anteridio paragino unido al oogonio cerca del tallo oogonial, oosporas esféricas de doble capa color amarillo-cafesoso (20 a 25 μ de diámetro), papila del esporangio de 22 a 30 μ de diámetro.

4.3.2. Sintomatología

Causa pudrición de la raíz, corona y frutos. Su desarrollo se favorece en suelos arcillosos con drenaje pobre, riegos pesados o durante períodos lluviosos con temperaturas cálidas. El ataque en frutos se presenta cuando éstos están en

contacto con el suelo mojado y cuando son salpicados por la lluvia (CESAVEG, 2002).

Seemuller (1984) señala que las hojas infectadas más jóvenes se marchitan repentinamente y con frecuencia se tornan verde azulosas y que el marchitamiento afecta rápidamente a toda la planta, la cual en pocos días muere, sobre la corona se observa una decoloración rojo-cafesosa (De los Santos, 2003). Con frecuencia las hojas jóvenes centrales se enroscan y sus pecíolos quedan flácidos y cuando se trata de arrancar una planta enferma, al tirar de ella sólo se obtiene la parte aérea, debido a que ésta fácilmente se separa de la corona y raíces. El color café rojizo o castaño intenso y la eventual desintegración de la corona es la característica típica de la enfermedad. En algunos casos la planta sufre una disminución en el crecimiento. Con respecto a los frutos, estos pueden ser atacados en toda su etapa de desarrollo, desde recién formados hasta completamente maduros, también afecta el cáliz y pedúnculos. Sobre los frutos verdes, la infección se manifiesta en áreas necróticas de color café a café oscuro o verde circundadas por un borde café. En los frutos maduros, las lesiones son de un color lila claro a púrpura con una coloración purpúrea en el perímetro. Las áreas infectadas son característicamente duras y con tejido ligeramente blando y los tejidos vasculares muestran un pronunciado bronceado. Los frutos presentan una decoloración interna y externa con un sabor amargo. Cuando la pudrición avanza, los frutos se vuelven duros y coriáceos. En condiciones de almacén, se puede desarrollar un micelio superficial de color blanco; sin embargo, es muy raro encontrarlo en campo (Mass, 1984).

El ambiente húmedo favorece la infección, lo cual ocurre en suelos de drenaje deficiente. Las temperaturas altas también incrementan el desarrollo de la enfermedad, pero la falta de agua también parece ser esencial, porque la enfermedad se presenta principalmente cuando la necesidad de agua es alta, es decir, después del trasplante, cuando la transpiración se incrementa y entre la

floración y la cosecha. También los días con menos de 13 horas luz favorecen la pudrición de la corona (Seemuller, 1984).

4.3.3. Ciclo y epidemiología de la enfermedad

Grove *et al.* (1985c) demostraron que una forma de dispersión de *P. cactorum* es por salpicadura de agua, y observaron que los esporangios, zoosporas y micelio fueron dispersados eficientemente a 1.2 y 0.5 m por esta vía, con gotas de 0.41 y 0.026 cm. de diámetro y una velocidad final de 830 y 217 cm s⁻¹, respectivamente, a diferentes alturas.

De acuerdo a Mass (1984), la infección inicia por medio de las zoosporas salpicadas con partículas de suelo en las partes florales o cuando los frutos próximos a la madurez están en contacto directo con el suelo húmedo.

Grove *et al.* (1985a) en Ohio, encontraron que el hongo inverna como oosporas sobre frutos momificados de fresa infectados. Esto comprueba que los frutos de fresa momificados constituyen una fuente potencial de inóculo primario para la pudrición cuerosa del fruto de fresa.

Mass (1984) menciona que la enfermedad se ve favorecida por temperaturas cálidas, pero influyen más las lluvias abundantes. Esto lo constató Grove *et al.* (1985b) al encontrar que la producción de esporangios aumenta cuando se incrementa la duración de la humedad (3 a 4 h) y la temperatura fluctúa entre 12.5 y 27.5 °C, pero en los diferentes períodos de humedad probados la producción de esporangios disminuye. Sin embargo, en algunas áreas, la enfermedad es favorecida por temperaturas bajas acompañadas con nieblas frecuentes y mañanas con rocío (Mass, 1984).

El patógeno sobrevive fuera del hospedante como oosporas formadas en el tejido enfermo, las cuales sobreviven en el suelo viables durante varios años; en agua y a temperaturas bajas o moderadas (10 a 20 °C), las oosporas germinan y producen zoosporas vía esporangios; probablemente los principales agentes

infectivos sean las zoosporas, aunque los esporangios pueden también iniciar la infección. Se disemina por el flujo de agua del suelo, de riego, o por salpicaduras de lluvia, y por lo tanto está asociado con condiciones húmedas o con suelos con drenaje deficiente. El patógeno puede introducirse por estolones de fresa infectados, las cuales dispersan con eficiencia la pudrición de la corona entre parcelas y entre países. La infección ocurre a través de heridas, superficies no protegidas o aberturas naturales como estomas y lenticelas. En los tejidos enfermos pueden desarrollarse los esporangios de forma masiva, pasar al suelo húmedo y dar lugar a nuevos ciclos de infección (Smith, 1992).

En la susceptibilidad del hospedante influyen factores endógenos y factores externos de estrés. En las dos enfermedades más estudiadas, la podredumbre del tronco del manzano y la podredumbre de la corona de la fresa, el hospedante sigue cambios marcados de susceptibilidad estacionales. La susceptibilidad de las fresas es máxima durante la floración y fructificación, y a menudo las infecciones de verano y otoño permanecen latentes hasta la primavera siguiente. Los estolones de fresa Frigo son susceptibles a este enfermedad (Smith, 1992).

Grove *et al.* (1985b) mencionan que la infección se incrementa con el crecimiento del período de humedad a todas las temperaturas probadas (6 a 30 °C). Para cada período de humedad la infección se incrementa hasta la temperatura óptima (21 °C) y luego declina. Con temperaturas entre 17 y 25% combinado con un período hora de humedad, resulta una infección mayor al 80%.

4.3.4 Manejo de la enfermedad

Los métodos preventivos culturales para el manejo de la enfermedad incluyen el uso de cultivares resistentes, riegos adecuados, evitar sitios con mal drenaje, dando labores intensivas y acolchado. Entre las medidas sanitarias están la esterilización del suelo, descontaminación del agua de riego y un sistema de producción de estolones sanos (Smith, 1992); además de incorporar abonos

verdes de *Brassica rapa* L. que reduce la incidencia de la enfermedad (Wilhelm y Nelson, 1980; Seemuller, 1984).

Hasta hace poco los fungicidas cúpricos eran casi los únicos utilizados para el manejo de este patógeno. Hoy en día varios fungicidas sintéticos, especialmente etridiazol y propamocarb, han resultado eficaces en ensayos contra *P. cactorum*, pero los productos con mejores perspectivas son metalaxyl y fosetil-Al (Smith, 1992). Las cubiertas de polietileno sobre el suelo forman un medio para reducir la densidad de propágulos de la enfermedad, ya que evitan el contacto entre el fruto y el suelo y minimizan el salpique de tierra por la lluvia hacia los frutos. Otras medidas sugeridas son evitar los excesos de humedad en el suelo, eliminar las partes dañadas y aplicar metalaxyl, Fosetil-Al y Oxadixyl (Mendoza, 1992); el uso de microorganismos antagónicos, tales como *Trichoderma* spp combinado con la solarización de los suelos reducen las poblaciones de *P. cactorum* en niveles que van de un 88.9% el primer año, 97.6% el segundo y 99% el tercer año (Porras *et al.*, 2007), otro organismos igualmente eficientes ha sido *Serratia plymuthica* HRO-C48 (Kurze *et al.*, 2001).

En México se encuentran disponible en el mercado azoxystrobium (abound 22.9 F), fosfito de potasio (AgriFos 45.8%) y mefenoxam (Ridomil Gold 4 E.C); las aplicaciones de azoxystrobium y los compuestos que tienen como base el ácido fosforoso (fosfitos) se inician cuando el cultivo de fresa presenta un 10% de floración y de ser necesarias nuevas aplicaciones estas se realizan con intervalos de 7 a 10 (Rebollar-Alviter *et al.*, 2010). Bajo condiciones de invernadero, los controles obtenidos, en fresa al utilizar fosfitos como fuente para el control de la pudrición de fruto causada por *P. cactorum* no difieren estadísticamente de los controles que muestran los fungicidas azoxystrobium, pyraclostrobium y mefenoxam, cabe hacer mención que la evaluación se realizó en pre y post-infección, donde las aplicaciones de los productos se hicieron 2, 4, y 7 días antes de la inoculación y 13, 24, 36 y 48 horas después de la misma (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007a; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007b).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación del experimento

El experimento se desarrolló en los invernaderos del área de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados campus Montecillo con coordenadas 19° 28´ 05” latitud Norte y 98° 54´ 09” longitud Oeste y una altitud de 2250 m.

5.2. Identificación de *Phytophthora cactorum*

5.2.1. Recolección y aislamiento

Los frutos de fresa, de los cuales se aisló *Phytophthora cactorum*, se recolectaron en plantaciones abandonadas de fresa del municipio de Maravatío, Michoacán en el mes de julio de 2010 (Figura 3). Frutos con los síntomas típicos de pudrición cuerosa (Ellis *et al.*, 1998; Rebollar-Alviter *et al.*, 2010 y Rebollar-Alviter *et al.*, 2007a) fueron recolectados en campo se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, se secaron y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo V-8 (300 mL de jugo V-8, 15 g de agar-agar y aforado con agua destilada a 1000 mL). Las cajas se incubaron a temperaturas promedio de 20 °C con intervalos de 12 horas de luz blanca y 12 horas de oscuridad, en cámara de crecimiento SHEL-LAB Modelo LI15, fabricada por la empresa Sheldong MFG. Inc. Cornelius, Or.



Figura 3. Aspecto del sitio de recolección de frutos de fresa sintomáticos a *Phytophthora cactorum* en Maravatío, Michoacán.

5.2.2. Identificación filogenética del patógeno

5.2.2.1. Extracción del DNA genómico

Los aislamientos de *Phytophthora* sp. cultivados en medio sólido V-8, las cajas de Petri se colocaron a una temperatura promedio de 20 °C con luz blanca continua. Después de cuatro días de crecimiento micelial, se tomó una porción de 5 mm de éste y se colocó en un tubo eppendorf de 200 µL conteniendo 30 µL de la solución de lisis, Lyse N Go (Pierce, USA). Posteriormente, se colocaron los tubos a 95 °C durante 5 min, después se centrifugaron por 10 min a 5000 x g. Seguido, se tomaron 5 µL del sobrenadante para las amplificaciones de la región ITS de los genes ribosomales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.2.2.2. Ampliación por PCR del DNA ribosomal

Para la ampliación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y ITS4 (5`-CCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), que amplifica un fragmento de 580 pares de bases aproximadamente (bp). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 L conteniendo la enzima µ 1 x *Taq* DNA polimerasa, 0.8 mM

deoxinucleósido trifosfato (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, 35 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 1 min, el alineamiento a 57 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 2 min; finalmente un ciclo de amplificación a 72 °C por 10 min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con solución amortiguadora 1x TAE (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 87 V cm⁻³ durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹), y las bandas se visualizaron en un transiluminador Gel Doc 2000 UV (BIORAD, USA). Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de DNA de Applied Biosystems modelo 3730XL (Applied BioSystems, USA); para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas.

5.2.2.3. Análisis filogenético de la región del ITS

Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando el software BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso de cada uno de los aislamientos. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Para el análisis filogenético, las secuencias consenso se compilaron en un archivo fasta y se alinearon con el programa CLUSTAL W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) y analizada con el método de Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange

(CNI) search (nivel=1), con Initial tree por adición al azar (10 reps), y los gap/missing se consideraron como deleciones completas.

Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985). Secuencias de *Phytophthora nicotianae* (número de accesión JQ070101), la especie filogenética más cercana y otras especies de *Phytophthora* (número de accesión GU259408 y GU259488) se obtuvieron del GenBank (NCBI), y se incluyeron como especies de referencia en el presente estudio. *Pythium aphanidermatum* número de acceso AB355599 se asignó como fuera de grupo para la construcción del árbol filogenético.

5.3. Material de inoculación (zoosporas de *Phytophthora cactorum*)

Para realizar la inoculación de los frutos de fresa de los diferentes tratamientos, se indujo un cultivo puro de *P. cactorum* con 12 días de incubación a producir zoosporas, una vez que el micelio cubrió todo el medio y la producción de esporangios fue abundante. Para lograr la producción abundante de zoosporangios el cultivo se mantuvo 5 días a luz blanca continua, dentro de una cámara de crecimiento (SHEL LAB Modelo LI15) a temperatura promedio de 20 °C. En cada caja Petri se vertieron 10 mL de agua esterilizada para posteriormente incubarse a 4 °C por 30 min seguido de 30 min a temperatura ambiente. Concluido el proceso se observaron zoosporas flajeladas características de *P. cactorum* en concentraciones superiores a 10^5 zoosporas por mililitro. La cuantificación zoospórica se realizó utilizando un hematocitómetro (marca celeromics).

5.4. Material vegetal

Se utilizaron plantas de fresa de la variedad Festival, aparentemente sanas, provenientes de un vivero comercial del municipio de Jacona, operado por Sistema Producto Fresa del estado de Michoacán.

5.5. Manejo del experimento

La nutrición de las plantas se realizó en base a la solución nutritiva universal de Steiner (1984), la cual en forma completa está constituida por (en mol_c m⁻³): 12 de NO₃⁻, 1 de H₂PO₄⁻, 7 de SO₄⁻², 7 K⁺, 9 de Ca⁺² y 4 de Mg⁺²; misma que fue utilizada en un 25% de su concentración los primeros 15 días después del trasplante (ddt), 75% de su concentración de los 16 a los 60 ddt, a 90 % de su concentración de los 61 a los 75 ddt y después de los 75 ddt se utilizó al 100% de su concentración; esta última concentración se mantuvo durante el tiempo restante del cultivo. La solución nutritiva fue complementada con micronutrientes mediante el suministro de Ultrasol micro™ (SQM) y de Tracecorp® Fe. El pH de la solución nutritiva se ajustó a un valor 5.5 y 5.8, utilizando ácido sulfúrico al 99%. Un día a la semana, las plantas se regaron con sólo agua acidulada a pH 5.5, con el fin de evitar la acumulación de sales dentro del contenedor.

Las plantas se trasplantaron en bolsas de 30 X 30 cm, utilizando tezontle rojo estéril como sustrato.

5.6 Diseño experimental utilizado

Se utilizó un diseño experimental bloques al azar generalizados (BAG) con cuatro bloques y en cada bloque se repitió dos veces cada tratamiento, lo que nos da un total de ocho repeticiones de cada tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por tres plantas de fresa. Considerando los resultados reportados por Estrada *et al.* (2011), donde se observa que las dosis que van de 0 a 20% de fosfito en la solución nutritiva no alteran el desarrollo normal de la planta de fresa y

no afectan la calidad y rendimiento de fruto, los tratamientos evaluados fueron: 0, 5, 10, 15 y 20% del P total como Phi en la solución nutritiva, y como testigo químico se aplicó mefenoxan al follaje, por ser el mejor fungicida químico reportado para el control de la pudrición cuerosa de la fresa (Rebollar-Alviter *et al.*, 2005; 2007a; 2007b; 2010).

5.7. Aplicación de los tratamientos

5.7.1. Fosfito y mefenoxam

Las diferentes concentraciones de fosfito aplicadas se calcularon utilizando como base un miliequivalente de fósforo en forma de fosfato especificado en la Solución Nutritiva Universal de Steiner (1984) al 100% de su concentración, obteniéndose las cantidades especificadas en el Cuadro 5. Lo anterior indica que al momento de la aplicación de los diferentes tratamientos se utilizó la Solución Nutritiva Universal de Steiner al 100% más la cantidad de fosfito equivalente al porcentaje del tratamiento correspondiente. Cada planta recibió 990 mL de la solución, distribuidos en cinco riegos, con duración de 2 minutos cada uno y espaciados cada hora. El primer riego se aplicó a las 11:00 h y el último a las 16:00 h.

Cuadro 3. Cantidades de fosfito correspondiente a los diferentes porcentajes aplicados en la solución nutritiva.

	5%	10%	15%	20%
meq L⁻¹ Na₂HPO₃ 5H₂O (98%)	0.05	0.10	0.15	0.20
g L⁻¹ Na₂HPO₃ 5H₂O (98%)	0.0055	0.0110	0.01653	0.0220

Como fuente de fosfitos se utilizó fosfito dibásico de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), grado reactivo (98%) fabricado por laboratorios Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland.

Mefenoxam (Ridomil Gold 480 SL 45.28% de i.a. fabricado por Syngenta Crop Protection Inc. Greensboro, Carolina del Norte, Estados Unidos de América) se aplicó de manera foliar a una dosis de 3.77 mL. de i. a. por litro de agua, equivalente a la dosis comercial recomendada por el fabricante, con un aspersor manual sobre hojas y frutos de cada planta tratada hasta punto de goteo.

5.7.2. Inoculación de frutos

La inoculación de frutos se realizó cuando éstos presentaban una coloración verde-blanco, 2, 4 y 7 días después del tratamiento con fosfito vía solución nutritiva, acorde al tratamiento correspondiente. Las plantas seleccionadas para tal fin se separaron del resto, llevándose a cámara húmeda, donde la humedad relativa se mantuvo al 100% antes y 16 horas después de la inoculación (Grove *et al.*, 1985b). Sólo se inocularon frutos, utilizando un aspersor manual.

5.8. Variable evaluada

5.8.1. Porcentaje de frutos enfermos

Se determinó la incidencia de la enfermedad a los 12 días contando el número de frutos sanos y enfermos (sintomáticos, Figura 4) en cada unidad experimental. Con estos datos se estimó el porcentaje de incidencia de la enfermedad en cada unidad experimental y repetición. Para el análisis estadístico se consideró el promedio del porcentaje de incidencia de las tres plantas que conformaban cada unidad experimental. Algunos frutos inoculados se usaron para aislar el patógeno una vez que aparecieron los síntomas.



Figura 4. Diferentes niveles de daño de *Phytophthora cactorum* en frutos de fresa.

5.9 Análisis estadístico

Los datos de incidencia obtenidos se sometieron a un análisis de varianza mediante el procedimiento ANOVA y a una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), utilizando el programa estadístico SAS versión 9.0

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base a las estructuras del patógeno observadas (Figura 5), los resultados de BLASTN y el árbol filogenético construido utilizando el método de Máximo Parsimonia (Figura 6) se determinó que la cepa, aislada de frutos de fresa colectados en el sitio de Maravatío, Michoacán en 2010, corresponde a *Phytophthora cactorum* con una máxima identidad de 98% respecto a secuencias de *Phytophthora cactorum* (número de accesoión CBS112275).

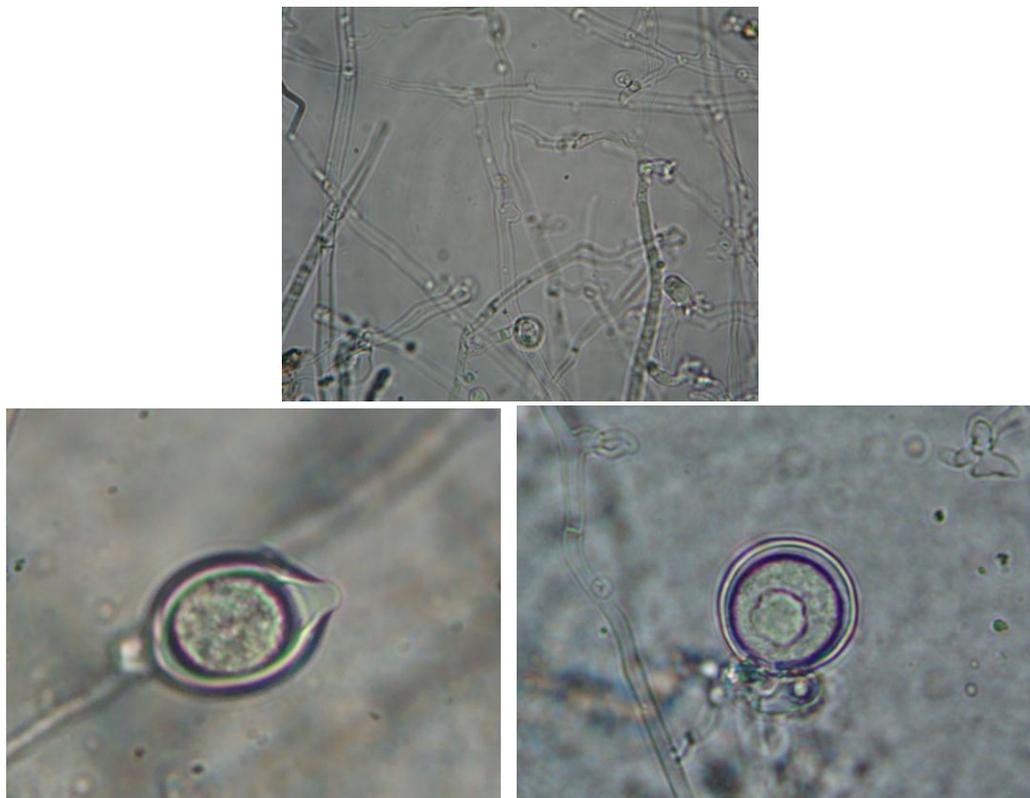


Figura 5. Estructuras de *Phytophthora cactorum* observadas. A, micelio cenocítico; B, Esporangio; C, Oosporangio y anteridio paragino.

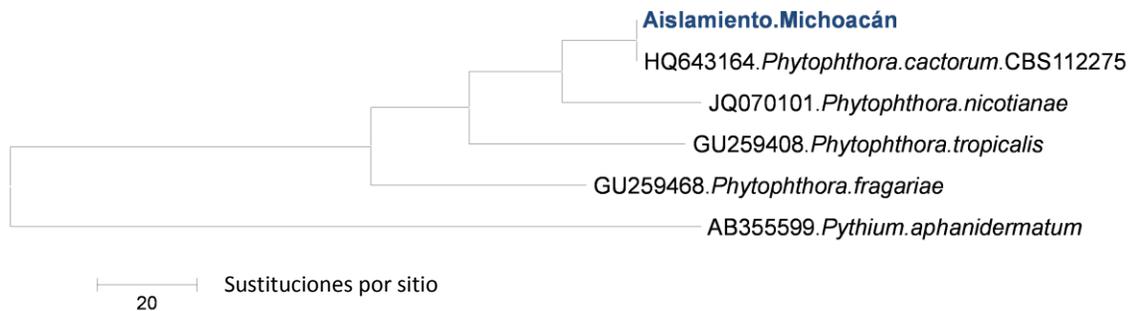


Figura 6. Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes al espacio transcrita interno del rDNA ribosomal del *Phytophthora cactorum* y otras especies del género *Phytophthora* usando el método Máxima parsimonia. El aislamiento Michoacán se identificó como *P. cactorum*. Se aisló de frutos de fresa con síntomas de pudrición cuerosa de la fresa en Maravatío, Michoacán en 2010.

Las pruebas de patogenicidad en el laboratorio reprodujeron los síntomas previamente descritos por Ellis *et al.*, 1998; Rebollar-Alviter *et al.*, 2010 y Rebollar-Alviter *et al.*, 2007a, entre los 10 y 12 días después de la inoculación.

El porcentaje de incidencia de *P. cactorum* sobre frutos de fresa inoculados mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P < 0.0001$) en las tres fechas de muestreo como se observa en la Figura 7.

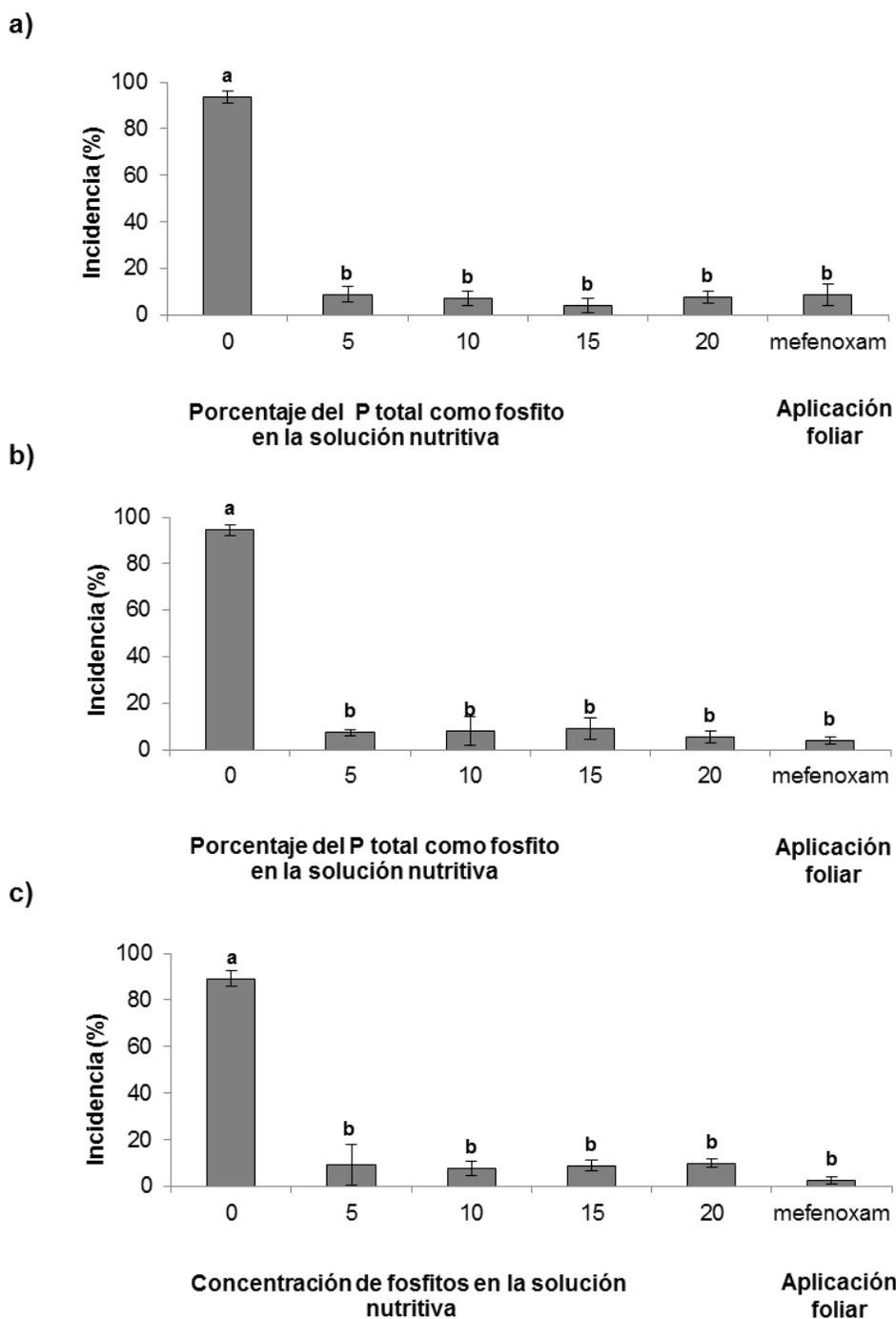


Figura 7. Efecto de diferentes porcentajes del P total como fosfito en la solución nutritiva y de la aspersion foliar de mefenoxam, aplicados en preinfección, en el control de *P. cactorum* en frutos de fresa cv. Festival, 2 (a), 4 (b) y 7 (c) días antes de la inoculación. Medias con letras distintas en cada subfigura presentan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P < 0.0001$). Barras sobre las columnas indican \pm desviación estándar.

En el tratamiento sin adición de fosfito, el porcentaje promedio de incidencia de *P. cactorum* fue de 92.47%. En el manejo de la enfermedad destacaron mefenoxam aplicado al follaje, en dosis de 3.77 mL de i. a. por litro de agua, y la adición de fosfito a la solución nutritiva en todas sus concentraciones, ya que en estos tratamientos se presentó la menor incidencia. Rebollar-Alviter *et al.* (2005; 2007a; 2007b; 2010) clasifican al mefenoxam, en dosis de 2.35, 2.34 kg de i. a. ha⁻¹ y 2.10 L de i. a. ha⁻¹, aplicado al follaje, como uno de los mejores fungicidas para el control de la enfermedad pudrición cuerosa de la fresa; asimismo se utiliza para el control de oomicetos del suelo (Weiland *et al.*, 2009; Thomidis, 2002; Thomidis y Elena, 2001).

El efecto de manejo de las diferentes concentraciones de fosfito aplicados en la solución nutritiva en los distintos tiempos antes de la inoculación del patógeno, no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí y con el mefenoxam (Figura 7), pero sí con respecto al tratamiento sin adición de fosfito. Lo anterior indica que el fosfito está siendo absorbido y traslocado a través del floema y xilema por las plantas de fresa en concentraciones suficientes para prevenir la infección del patógeno. Su alta solubilidad (120 g de i. a. L⁻¹) combinada con su naturaleza ácida les permite ser movilizados apoplásticamente y simplásticamente (Gisi, 2002). No está bien definida la ruta por la cual las moléculas antifúngicas, ya sea fosfito como tal o metabolitos producidos por la planta, se dirigen al fruto y ejercen la protección del mismo contra el ataque de *P. cactorum*, es probable que en aplicaciones foliares (donde se incluya a los frutos) una parte de los fosfitos aplicados penetre por difusión a través de la epidermis del fruto y otra parte llegue al mismo transportado desde las hojas. En aplicaciones a la raíz, las plantas superiores no desarrollan mecanismos que permitan diferenciar, al momento de la absorción, fosfato de fosfito, por lo cual estos últimos son absorbidos mediante transportadores de fosfato de alta afinidad a nivel de membrana (Danova-Alt *et al.*, 2008). Evidencias de la no diferenciación entre fosfito y fosfato por transportadores en plantas, son aportadas por Varajadan *et al.* (2002) al probar que la expresión de genes inducidos por deficiencia de fosfato, tales como *LePT1*, *LePT2*, *AtPT1* y

AtPT2 (transportadores de alta afinidad de fosfato); *LePS2* (una nueva fosfatasa ácida); *LePS3* y *TPSI1* (genes nuevos); y *PAP1* (fosfatasa ácida púrpura) es suprimida en presencia de Phi en plantas y cultivo de células.

El efecto en el manejo de la enfermedad de las diferentes concentraciones de fosfito, aplicadas una sola vez y evaluadas en el presente trabajo no se diferencian estadísticamente del tratamiento foliar con mefenoxam; esto es, ambos fungicidas ejercen el mismo efecto sobre el manejo sobre la enfermedad pudrición cuerosa de la fresa, diferenciándose en modo de aplicación: mefenoxam se aplicó, una sola vez, en forma foliar y la aplicación del fosfito fue a la raíz, disueltos en la solución nutritiva y acorde al patrón de riegos establecido: cinco riegos diarios, cada riego con una duración de 2 min, con un gasto de 99 mL por min.

Dentro de los diferentes tratamientos con fosfito evaluados, el correspondiente al 5% del P total como Phi, aporta una concentración de Phi ($0.05 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de solución nutritiva) menor a las reportadas por Rebollar-Alviter *et al.* (2005; 2007a; 2007b; 2010) como eficientes de acuerdo a las dosis recomendadas, en aplicaciones foliares para el manejo de *P. cactorum* en frutos de fresa, observándose el mismo efecto de manejo sobre la enfermedad en cuestión. La diferencia con este experimento radica en el modo de aplicación; en aplicaciones radicales existe una absorción y transporte de fosfito más eficientes que las aplicaciones foliares, ya que éstos se traslocan de manera indistinta por floema o xilema dentro de la planta (Gisi, 2002), puntualizando que la raíz es un órgano vegetal especializado en la absorción, a diferencia de hojas y tallo donde existe una capacidad limitada para ejercer esta función.

Niveles de manejo similares de la pudrición cuerosa de la fresa entre altas dosis de fosfito aplicados de manera foliar y dosis menores aplicadas en forma radical en la solución nutritiva, significan una alternativa en la reducción de costos de producción en el cultivo de fresa y daño al medio ambiente. Si bien existen reportes de resistencia del género *Phytophthora* sp. a fosfito (Dobrowolski *et al.*, 2008; Riveros *et al.*, 2003; Páez, 2001); la adición de éste a la solución nutritiva

reduce la posibilidad de aparición y desarrollo de cepas resistentes. La utilización de las concentraciones de fosfito evaluadas no interfieren negativamente en el desarrollo de las plantas de fresa ni en los parámetros cuantitativos ni en los cualitativos de su producción de acuerdo a Estrada *et al.* (2011); contrariamente, si existe suficiente disponibilidad de fósforo como fosfato en la solución nutritiva con la adición de 30% del P total como fosfito estimula el metabolismo de la planta, incrementándose en consecuencia, las concentraciones de clorofilas, aminoácidos y proteínas. Asimismo, la adición del 20% del P total como Phi en la solución nutritiva incrementa azúcares solubles totales, grados Brix y firmeza en frutos de fresa (Estrada *et al.*, 2012).

Una nutrición equilibrada entre suficiente fosfato disponible y fosfito en la solución nutritiva en el cultivo de fresa en hidroponía, permite obtener los beneficios antifúngico del fosfito e incrementos en rendimiento y calidad de fruto, ya que la aplicación de fosfito en déficit de fósforo aprovechable en la planta, causará efectos negativos en el desarrollo de la misma (Estrada *et al.*, 2011; Thao y Yamakawa, 2010; Thao *et al.*, 2009; Schroetter *et al.*, 2006; McDonald *et al.*, 2001).

Existe la necesidad de más investigaciones que permitan determinar el tiempo de traslocación y la cantidad de fosfito necesario en fresa, ya sea de manera general o en ciertos órganos específicos, que propicie la activación eficiente de los sistemas de defensa de las mismas en contra de *P. cactorum* y actúe directamente sobre el desarrollo del patógeno sin demeritar otros procesos útiles a la planta. La concentración de fosfito dentro de los tejidos vegetales del hospedante determina la función biológica que éstos propiciarán en contra del patógeno, Jackson *et al.* (2000) encontró que concentraciones bajas de fosfito en tejidos de raíces de *Eucalyptus marginata* inoculadas con zoosporas de *P. cinnamomi* propician la activación del sistema de defensa de la planta en contra del patógeno y en concentraciones altas en el mismo sitio, el fosfito actúa directamente sobre el hongo, inhibiendo su crecimiento, mientras el sistema de

defensa de la planta no se activa; permanece latente. Para lo anterior, será necesario desarrollar métodos de determinación de fosfito en material vegetal, precisos, baratos y factibles de implementarse.

7. CONCLUSIONES

El fosfito controla de manera eficiente a *Phytophthora cactorum* en fresa cuando es suministrado vía radical en la solución nutritiva. La eficacia vía radical es comparable con la reportada por distintos autores con el suministro foliar.

Adiciones del 5% del fósforo total en forma de fosfito a la solución nutritiva universal de Steiner al 100%, aplicados una sola vez en preinfección, controlan satisfactoriamente *Phytophthora cactorum* en frutos de fresa, sin diferencias significativas con el mefenoxam.

8. LITERATURA CITADA

- ALBRIGO, L. C.** 1999. Effects of Foliar Applications of Urea or Nutriphite on Flowering and Yields of Valencia Orange Trees. Proc. Fla. State Hort. Soc. 112: 1-4.
- BERTSCH, F.; RAMÍREZ, F.; HENRÍQUEZ, C.** 2009. Evaluación del fosfito como fuente fertilizante de fósforo vía radical y foliar. Agronomía Costarricense 33: 249-265.
- CESAVEG.** 2002. Campaña de manejo fitosanitario de la fresa. SAGARPA-Secretaria de Desarrollo Agropecuario del Estado de Guanajuato. Irapuato, Gto.
- d'ARCY-LAMETA A.; BOMPEIX, G.** 1992. Systemic transport of tritiated phosphonate in tomato plantlets (*Lycopersicon sculentum* Mill.). Pest Management Science 32: 7-14.
- DANIEL, R.; GUEST, D.** 2006. Defense responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora* –Challenged *Arabiopsis thaliana*. Physiological and Molecular Plant Pathology 67: 194-201.
- DANOVA-ALT, R.; DIJKEMA, C.; WAAR, D. P.; KÖCK, M.** 2008. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells –kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. Plant Cell and Environment 31: 1510-1521.
- DARAKIS, G. A.; BOURBS, V. A.; SHOUDRIDAKIS, M. T.** 1997. Phosphonate transport in *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 46: 762-772.
- DÁVALOS, P.; CASTRO F. J.** 1987. Estimación de daños por *Colletotrichum* sp. y *Phytophthora cactorum*, principales causantes de la pudrición de la fresa en Irapuato, Gto. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología. Morelia, Michoacán. SMF.
- DE LOS SANTOS, B. M.** 2003. First Report of *Phytophthora cactorum* on Strawberry Plants in Spain. Plant Disease 70: 1038-1043.
- DOBROWOLSKI, M. P.; SHEARER, I. B. L. J.; COLQUHOUN, P. A.; O'BRIEN; HARDY, G. E. St. J.** 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. Plant Pathology 57: 928-936.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K.** 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*.(APS Press, 3340 Pilot Knob Road, St.Paul, Minnesota, USA)

- ESTRADA O., E.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; GÓMEZ MERINO, F. C.; NUÑEZ-ESCOBAR, R.; SANDOVAL-VILLA, M.** 2011. Respuestas Bioquímicas en fresa al suministro de fósforo en forma de fosfito. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(3): 129-138.
- ESTRADA O., E.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; GÓMEZ-MERINO, F. C.; NUÑEZ-ESCOBAR, R.; SANDOVAL-VILLA, M.** 2012. Phosphite on growth and fruit quality in strawberry. *Acta Horticulturae En prensa*.
- FELSENSTEIN, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J. E.; KIM, D. H.; STANGHELLINI, M. E.** 1998. Effect of Phosphite on Tomato and Pepper Plants and on Susceptibility of Pepper to *Phytophthora* Root and Crown Rot in Hydroponic Culture. *Plant Disease* 82: 1165-1170.
- GISI, U.** 2002. Chemical Control of Downy Mildews. Pp. 199-159. *In: Spencer-Phillips, P. T. N.; Gisi, U.; Lebeda, A. (eds.). Advances in Downy Mildew Research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.*
- GROVE, G. G.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V.; SCHMITTHENNER, A. F.** 1985a. Overwinter survival of *Phytophthora cactorum* in infected strawberry fruit. *Plant Disease* 69: 514-515.
- GROVE, G. G.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A.** 1985b. Influence of temperature and wetness duration on sporulation of *Phytophthora cactorum* on infected strawberry fruit. *Phytopathology* 75: 700-703.
- GROVE, G. G.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A.; SCHMITTHENNER, A. F.** 1985c. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature strawberry fruit by *Phytophthora cactorum*. *Ecology and Epidemiology* 75(2): 165-169.
- HALL, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- HANTULA J.; LILJA, H.; NUORTEVA, H; PARIKKA, P; WERRES, S.** 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycological Research* 104: 1062-1068.
- HUANG H.; JEFFERS, S. N.; LAYNE, D. R.; SCHNABEL, G.** 2004. AFLP analysis of *Phytophthora cactorum* isolates from strawberry and other hosts: Implications for identifying the primary source of inoculum. *Plant Disease* 88: 714-720.

- JACKSON, T. J.; BURGESS T.; COLQUHOUN, I. J.; HARDY, G. E St. J.** 2000. Biochemical effects of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 49: 147-154.
- KEELING, P. J.; BURGER, G.; DURNFORD, D. G.; LANG, B. F.; LEE, R. W.; PEARLMAN, R. E.; ROGER, A. J.; GRAY, M. W.** 2005. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20(12): 670–676.
- KURZE, S.; BAHL, H.; DAHL, R.; BERG, G.** 2001. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Disease*. 85: 529-534.
- LOVATT, C. J.** 1990a. A definitive test to determine whether phosphite fertilization can replace phosphate fertilization to supply P in the metabolism of “Hass” on “Duke T”. *California Avocado Society Year Book* 74: 61-64.
- LOVATT, C. J.** 1990b. Foliar phosphorus fertilization of citrus by foliar application of phosphite. Edited by Citrus Research Advisory Committee. *Summary of Citrus research*. University of California, Riverside, Cal., USA.
- LOVATT, C. J.; MIKKELSEN, R. L.** 2006. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do? *Better Crops With Plant Food* 90: 11-13.
- MARAMOTO, B. J.; LÓPEZ, G. S.** 1988. *Producción de fresas y fresones*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- MARTIN, H.; GRANT, B. R.; STEHMANN, C.** 1998. Inhibition of inorganic pyrophosphatase by phosphonate – A site of action in *Phytophthora* spp. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 61: 65-77.
- MASS, J. L.** 1984. *Compendium of strawberry diseases*. APS Press Edit. St. Paul Minnesota, U.S.A.
- MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C.** 2001. Phosphite (phosphorus acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*. 24: 1505-1519.
- MENDOZA, Z. C.** 1987. Principales enfermedades fungosas y control químico de la cenicilla de la fresa (*Fragaria chiloensis* Duchesne var. Ananassa) en Villa Guerrero, Estado de México. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. UCh. Chapingo, México.

- MENDOZA, Z. C.** 1992. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. *In*: Anaya, R. S.; Bautista M. N.; Domínguez, R. B. (eds.). Manejo fitosanitario de las hortalizas en México. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México, Edo de México.
- NIERE, J. O.; GRIFFITH, J. M.; GRANT, B. R.** 1990. ^{31}P NMR studies on the effect of phosphonite on *Phytophthora palmivora*. *Journal of General Microbiology* 140: 1661-1670.
- OKA, Y.; TKACHI, N. and MOR, M.** 2007. Phosphite inhibits development of the nematodes *Heterodera avenae* and *Meloidogyne marylandi* in cereals. *Phytopathology* 97: 396-404.
- OUIMETTE, D. G.; COFFEY, M. D.** 1990. Symplastic entry and problem translocation of phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 38: 18-25.
- PÁEZ, O.; GÓMEZ, L.; BRENES, A.; VALVERDE, R.** 2001. Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en el cultivo de la papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 25: 33-44.
- PORRAS, M.; BARRAU, C.; ARROYO, F. T.; SANTOS, B.; BLANCO, C.; ROMERO, F.** 2007. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. *Plant Disease* 91: 142-146.
- RATJEN, A M.;** 2005. Bedeutung von Phosphite in Landwirtschaft und Gartenbau. Kiel, Univ, Bachelor Thesis, 2005, 84 p.
- RATJEN, A. M.; GERENDÁS, J.** 2009. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 172: 821-828.
- REBOLLAR-ALVITER, A.; WILSON, L. L.; MADDEN, L. V.; ELIS, M. A.** 2005. Efficacy of azoxystrobin, pyraclostrobin, potassium phosphite and mefenoxam for control of strawberry leather rot caused by *Phytophthora cactorum*. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2005-0107-01-RS.
- REBOLLAR-ALVITER, A.; WILSON, L. L.; MADDEN, L. V.; ELIS, M. A.** 2007a. Pre and Post-infection Activity of Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Mefenoxam, and Phosphite Against Leather Rot of Strawberry, Caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* 91: 559-564.
- REBOLLAR-ALVITER, A.; WILSON, L. L.; MADDEN, L. V.; ELIS, M. A.** 2007b. Evaluation of Post-infection efficacy of fungicides for controlling leather rot of Strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology* 97: S97.
- REBOLLAR-ALVITER, A.; WILSON, L. L.; MADDEN, L. V.; ELIS, M. A.** 2010. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphite with protectant

efficacy of azoxystrobin and potassium phosphate for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. Crop Protection 29: 349-353.

RIVEROS, F. B.; SOTOMAYOR, R.; RIVERA, V.; SECOR, G.; ESPINOZA, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary a metalaxyl en cultivo de papas en el norte de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 63: 117-124.

SCHROETTER, S, D.; ANGELES-WEDLER, R.; KREUZING, E.; SCHNUG. 2006. Effects of posphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). Landbauforschung Völkenrode 56: 87-99.

SEEMULLER, E. 1984. Crown rot (Vascular collapse). *In*: Mass, J. L. (ed.). Compendium of strawberry diseases. American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. U.S.A.

SIAP. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2011. En línea: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=197

SMITH, I. M. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Edit. Mundi-Prensa. Barcelona España.

STEINER, A. 1984. The universal nutrient solution. Pp. 633-649. *In*: I. S. O. S. C. Proceeding 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software ver. 4.0. Molecular Biology Evolution 24: 1596- 1599.

THAO, H. T. B.; YAMAKAWA, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator?. Soil Science and Plant Nutrition 55: 228-234.

THAO, H. T. B.; YAMAKAWA, T.; SHIBATA, K. 2009. Effect of phosphate-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). Journal of Plant Nutrition and Soil Science 172: 378-384.

THAO, H. T. B.; YAMAKAWA, T. 2010. Phosphate absorption of intact Komatsuna plants as influenced by phosphate. Soil Science and Plant Nutrition 56: 133-139.

THOMIDIS, T. 2002. Persistence of the systemic activity of metalaxyl and fosetyl-AI applied as a soil drench or foliar spray to control *Phytophthora* crown rot of peach. Phytopathologia Mediterranea 41: 28-32.

- THOMIDIS, T.** 2003. Variability in pathogenicity among Greek isolates of *Phytophthora cactorum* to four peach rootstock. Australian Journal of Experimental Agriculture 43: 99-103.
- THOMIDIS, T.; ELENA, K.;** 2001. Effects of Metalaxyl, Fosetyl-Al, Dimethomorph and Cymoxanil on *Phytophthora cactorum* of Peach Tree. Journal of Phytopathology 149: 97-101.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.** 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.
- TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A.; ABEL, S.** 2001. Attenuation of Phosphate Starvation Responses by Phosphite in Arabidopsis. Plant Physiology 127: 963-972.
- VARADARAJAN, D. K.; KARTHIKEYAN, A. S.; MATILDA, P. D.; RAGHOTHAMA, K. G.** 2002. Phosphite, an Analog of Phosphate, suppresses the Coordinated Expression of Genes under Phosphate Starvation. Plant Physiology 129: 1232-1240.
- WEILAND, J. E., NELSON, A. H.; HUDLER, G.W.** 2009. Effects of Mefenoxam, Phosphonate, and Paclobutrazol on In Vitro Characteristics of *Phytophthora cactorum* and *P. citricola* and on Canker Size of European Beech. Plant Disease 95: 741-746.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. and TAYLOR, J. W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innis M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc. USA. 482 p.
- WICKS, T. J.; MAGAREY, P. A.; WACHTEL, M. F.; FRENHAM, A. B.** 1991. Effect of Postinfection Application of Phosphorous (Phosphonic) Acid on the Incidence and Sporulation of *Plasmopara viticola* on Grapevine. Plant Disease 75: 40-43.
- WILHELM, S.; NELSON, R. D.** 1980. Pp. 245-292. Fungal Diseases of the strawberry plant. In: Childers, F. (ed.). The strawberry. Proceedings and added information from the National strawberry Conference. Saint Louis, Missouri.
- WILKINSON, C. J.; HOLMES, J. M.; DELL, B.; TYNAN, K. M.; McCOMB, J.; SHEARER, B. C.; COLQUHOUN, I. J.; StD. HARDY, G. E.** 2001. Effect of phosphate on in plant Zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 50: 587-593.
- ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7: 203-214.