

Sensibilidad a metalaxyl y potencial patogénico de *Phytophthora hydropathica* aislada de canales de irrigación del Valle de Culiacán

Brando Álvarez-Rodríguez¹
Raymundo Saúl García-Estrada¹
José Benigno Valdez-Torres¹
Josefina León-Félix¹
Raúl Allende-Molar^{2§}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC. Coordinación Culiacán. Carretera a Eldorado km 5.5, Col. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, CP. 80110. Tel. 01(667) 7605536. (brando-alvarez@estudiantes.ciad.mx; rsgarcia@ciad.mx; jvaldez@ciad.mx; ljosefina@ciad.mx). ²Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad Veracruzana. Carretera Tuxpan-Tampico km 7.5, Tuxpan, Veracruz. CP. 92895. Tel. 01(783) 8344350.

§Autor para correspondencia: rallende@uv.mx.

Resumen

Phytophthora hydropathica es una especie con escasos reportes relacionados con su capacidad de infectar cultivos agrícolas de manera natural, por lo cual se puede inferir que no ha estado en contacto con agentes químicos; por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la patogenicidad y la sensibilidad a metalaxyl de 18 cepas de *P. hydropathica* provenientes de canales de irrigación en Culiacán, Sinaloa. La evaluación de patogenicidad de los aislados se realizó en hojas de calabacita y pepino y en frutos de calabacita, pepino y tomate. La resistencia a metalaxyl se evaluó *in vitro* en medio PDA adicionado con metalaxyl. Los aislados de *P. hydropathica* ocasionaron síntomas de necrosis y ablandamiento en frutos y síntomas de necrosis en hojas de las especies de plantas evaluadas; no se encontraron cepas resistentes, siete cepas presentaron sensibilidad intermedia y el resto fueron susceptibles a metalaxyl. La CE₅₀ de los aislados fluctuó entre 0.000013 µg L⁻¹ a 1 µg L⁻¹. Se puede concluir que el uso de metalaxyl sería efectivo en el control de algún brote de enfermedad ocasionado por *P. hydropathica*.

Palabras clave: *Phytophthora hydropathica*, CE₅₀, Oomicetes, Ridomil Gold.

Recibido: julio de 2018

Aceptado: septiembre de 2018

Introducción

En el género *Phytophthora*, existen alrededor de 124 especies descritas (Martin *et al.*, 2014), las cuales tienen la capacidad de infectar cientos de especies de plantas alrededor del mundo (Gallegly y Hong, 2008). En la actualidad, la presencia de especies de *Phytophthora* en ambientes acuáticos se ha incrementado (Zappia *et al.*, 2014) por ejemplo, en años recientes destaca la presencia de *Phytophthora hydropathica* principalmente en agua de irrigación (Hulvey *et al.*, 2010; Hüberli *et al.*, 2013; Bienalfp y Balci, 2014; esto es de esperarse, ya que etimológicamente, el nombre de este microorganismo deriva de los vocablos griegos ‘hydro’ que se refiere a su naturaleza acuática y ‘pathica’ a su naturaleza patogénica (Hong *et al.*, 2010). La mayoría de los reportes de *P. hydropathica* se relacionan con infecciones en plantas ornamentales, tal es el caso de necrosis foliar en azalea (*Rhododendron catawbiense*), pudrición del cuello en laurel de montaña (*Kalmia latifolia*) (Hong *et al.*, 2010), así como marchitez y muerte regresiva del laurel silvestre (*Viburnum tinus*) (Vitale *et al.*, 2014).

Antes de ser descrita formalmente como *P. hydropathica*, Hong *et al.* (2008) demostraron que esta especie es capaz de causar ‘damping off’ en plántulas de pepino, mientras que, en plantas de tomate y chile causó infecciones en raíz; además, mencionan que *P. hydropathica* penetra en frutos de tomate y chile por medio de heridas. En México, la presencia de *P. hydropathica* se reportó en agua de irrigación en el Valle de Culiacán y se demostró que puede causar necrosis en hojas de tomate y chile (Álvarez *et al.*, 2017).

Para controlar enfermedades causadas por *Phytophthora* se utiliza principalmente el ingrediente químico metalaxyl, el cual es un fungicida tipo fenilamida que protege de manera sistémica a las plantas, principalmente para el control de oomicetes (Urech *et al.*, 1977). El metalaxyl actúa en sitios específicos del patógeno impidiendo la biosíntesis de proteínas mediante la interferencia en la síntesis del ARN ribosomal (Nunninger *et al.*, 1995); sin embargo, el uso excesivo de este producto puede ocasionar que los patógenos generen resistencia (Damicone, 2004). Un ejemplo es el rápido desarrollo de resistencia en poblaciones de *P. infestans*, el cual fue detectado en los años 80 en Europa (Davidse *et al.*, 1981) y en los años 90 en EE. UU, Canadá y México (Matuszak *et al.*, 1994; Power *et al.*, 1995).

Los aislados resistentes son igual o más agresivos que los aislados susceptibles, convirtiendo así la resistencia al metalaxyl en una característica agronómica importante en el manejo integrado de las enfermedades causadas por *Phytophthora*, especialmente en el tizón tardío de papa provocado por *P. infestans* (Forbes *et al.*, 1998); además, se han utilizado bioensayos *in vitro* para caracterizar y clasificar aislados de *Phytophthora* y de otros oomicetes de acuerdo al nivel de susceptibilidad al metalaxyl (Peters *et al.*, 2001; Fontem *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2016).

Los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar el potencial patogénico de aislamientos de *P. hydropathica* en hojas y frutos de tomate, pepino y calabacita; y 2) determinar la sensibilidad o resistencia de dichos aislamientos a metalaxyl.

Materiales y métodos

Potencial patogénico. Para determinar el potencial patogénico se utilizaron tres cepas representativas de la especie *P. hydropathica* [13F2 (KX298864), 16-1F2 (KX298868) y 18-2F1 (KX298873)]. Las cepas se reactivaron en medio papa dextrosa agar (PDA). En los experimentos de patogenicidad se utilizaron tres frutos de tomate (Saladette), pepino (SFPP) y calabaza (Nurizeli), así como tres hojas de calabaza (Nurizeli) y de pepino (SFPP) de 1 mes de edad. Los materiales vegetales se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con etanol al 70%. Tanto en hojas como en frutos se realizaron heridas con una aguja de disección estéril y se inocularon colocando discos de 5 mm de diámetro de medio PDA con crecimiento activo de las tres cepas. Las hojas y frutos inoculados se colocaron en cámara húmeda durante 120 h (Orlikowski *et al.*, 2012). Como control se utilizaron frutos y hojas en los que se realizaron heridas y se colocaron discos de medio de cultivo.

Sensibilidad a Metalaxyl. Para evaluar la susceptibilidad de las cepas de *P. hydropathica* a metalaxyl, se realizó un estudio *in vitro*, el cual consistió en adicionarle al medio de cultivo PDA 10 mg L⁻¹ de metalaxyl (Shattock, 1988; Rekanovic *et al.*, 2011), se utilizó la fórmula comercial Ridomil Gold 480 EC (480 g de ingrediente activo de metalaxyl), el cual se agregó al medio de cultivo después de esterilizarlo y justo antes de vaciarlo en placas Petri. Del borde de las colonias de cada cepa se tomaron discos de 5 mm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial y se colocaron en placas Petri con medio PDA adicionado con metalaxyl y sin metalaxyl (control). El crecimiento *in vitro* de cada aislado se evaluó después de seis días a 25 °C (Paez *et al.*, 2001).

El crecimiento se determinó al medir perpendicularmente el diámetro de la colonia. Para determinar el crecimiento relativo se utilizó la fórmula $PC = (DMC - 5mm / DMCA) 100$; donde PC= porcentaje de crecimiento, DMC= diámetro de la colonia con metalaxyl y DMCA= diámetro de la colonia sin metalaxyl. Un porcentaje de crecimiento en diámetro de la colonia igual o superior a 60%, se considera al aislado resistente, un crecimiento de la colonia entre 10-60% es catalogado como intermedio y cuando la colonia es menor a 10% es considerada como susceptible (Shattock, 1988; Deahl *et al.*, 1995; Riveros *et al.*, 2003).

Para determinar los valores de la CE₅₀ en cada cepa, se utilizaron cuatro concentraciones de metalaxyl 0.1, 1, 5 y 10 mg L⁻¹; la CE₅₀ se calculó mediante una regresión lineal entre el log₁₀ del crecimiento radial relativo y el log₁₀ de la concentración del fungicida (Páez *et al.*, 2001). Para cada aislado y concentración de metalaxyl se realizaron tres repeticiones.

Diseño de experimentos. En el ensayo con medio de cultivo PDA con 10 mg L⁻¹ de metalaxyl se utilizó un diseño de un factor totalmente al azar, donde el factor fueron los 18 aislados. Se realizó un análisis de varianza y comparaciones de medias mediante la prueba de Tuckey. Para el ensayo *in vitro* en el cual se determinó la resistencia o sensibilidad de los aislados a metalaxyl, se utilizó un diseño de dos factores totalmente al azar; un factor consistió en los aislados con 18 niveles y el otro factor en la concentración de metalaxyl. La variable de respuesta fue el crecimiento de la colonia de las cepas en milímetros.

Resultados y discusión

Potencial patogénico. En hojas de pepino y de calabacita, los síntomas de enfermedad fueron visibles a las 48 h después de inoculación (hdi). En hojas de pepino, los tres aislados inoculados indujeron síntomas de necrosis con arrugamiento y oscurecimiento de los tejidos afectados (Figura 1). Existieron algunas diferencias entre los tres aislados inoculados, la principal ocurrió en la hoja inoculada con la cepa 18-2F1, en la cual se observaron signos del patógeno (micelio de color blanquecino) (Figura 1B).

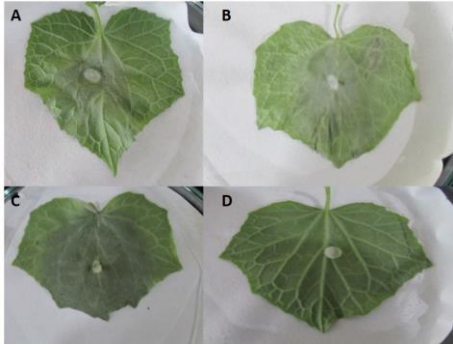


Figura 1. Lesión en hojas de pepino ocasionada por *P. hydropathica* 48 hdi. A) aislado 16-2F1; B) aislado 18-2F1; C) aislado 13-F2; D) hoja control.

En hojas de calabacita, los aislados también causaron síntomas de necrosis (Figura 2). En calabacita no existen reportes de estudios que la consideren como hospedante de *P. hydropathica*. En contraste, en pepino *P. hydropathica* se ha reportado causando damping-off en plántulas (Hong *et al.*, 2008).

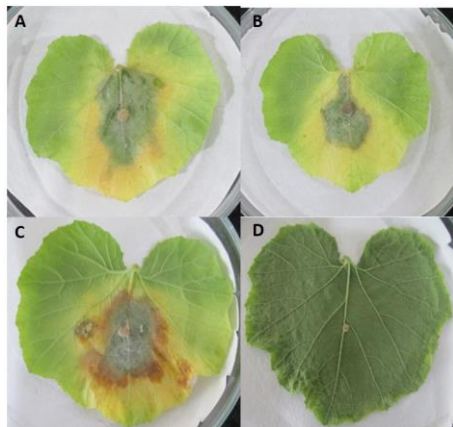


Figura 2. Síntomas en hojas de calabacita provocados por *P. hydropathica* 48 hdi. A. Aislado 13-F2; B. Aislado 18-2F1; C. Aislado 16-2F1. D. Hoja control.

En frutos de calabacita se presentaron síntomas de necrosis; mientras que, en tomate y pepino hubo síntomas de ablandamiento (Figuras 3, 4 y 5). La cepa 13F2 fue la más agresiva en frutos de pepino y tomate, incluso a las 72 hdi se observaron signos del patógeno (Figuras 3B y 3C) en contraste, la

cepa 16-2F1 causó síntomas de necrosis apenas visibles en fruto de calabacita y síntomas de ablandamiento en tomate (Figuras 4A y 4B). La cepa 18-2F1 fue la más agresiva en frutos de calabacita (Figura 5A), en donde al igual que en frutos de tomate, a las 72 hdi se apreciaron signos del patógeno (Figura 5B), estas diferencias observadas entre los distintos aislados se pueden atribuir al diferente grado de virulencia de cada cepa.



Figura 3. Síntomas en frutos causados por *P. hydropathica* aislado 13-F2 72 hdi. A) calabacita; B) tomate; C) pepino.



Figura 4. Síntomas en frutos provocados por *P. hydropathica* aislado 16-2F1 72 hdi. A) calabacita; B) tomate; C) pepino.



Figura 5. Síntomas en frutos provocados por *P. hydropathica* aislado 18-2F1 72 hdi. A) calabacita; B) tomate; C) pepino.

Sensibilidad a Metalaxyl. Las 18 cepas utilizadas en el ensayo presentaron una reducción en su crecimiento al ser expuestas a 10 mg L^{-1} de metalaxyl en comparación al crecimiento en medio sin metalaxyl (Figura 6); no se encontraron cepas resistentes, esto significa que ningún aislado creció más de 60% en el medio adicionado con 10 mg L^{-1} de metalaxyl. Siete cepas presentaron una resistencia intermedia y 11 fueron susceptibles de acuerdo a los valores propuestos por Shattock, (1988) (Cuadro 1). De las 11 cepas sensibles, seis de ellas fueron totalmente inhibidas a la concentración de 10 mg L^{-1} de metalaxyl, estos datos son similares a los obtenidos en ensayos realizados por Riveros *et al.* (2003), en donde el aislado que utilizaron como control (sensible a metalaxyl) fue inhibido a la concentración de 10 mg L^{-1} . En algunos casos se ha presentado resultados *in vitro* de sensibilidad en oomicetes los cuales no predicen con precisión la sensibilidad que éstos tendrán a productos químicos en condiciones *in vivo* (Moorman y Kim, 2004).

Por ejemplo, en *P. infestans* no existió una buena correlación entre los resultados obtenidos en discos de tubérculos con los resultados en medio de cultivo (Straub *et al.*, 1979). A pesar de esto, el alto grado de sensibilidad presentado por los aislados de *P. hydropathica* puede deberse a que dichos aislados no han estado expuestos a este producto químico, ya que no se tienen reportes de esta especie ocasionando daños en cultivos agrícolas en la región.

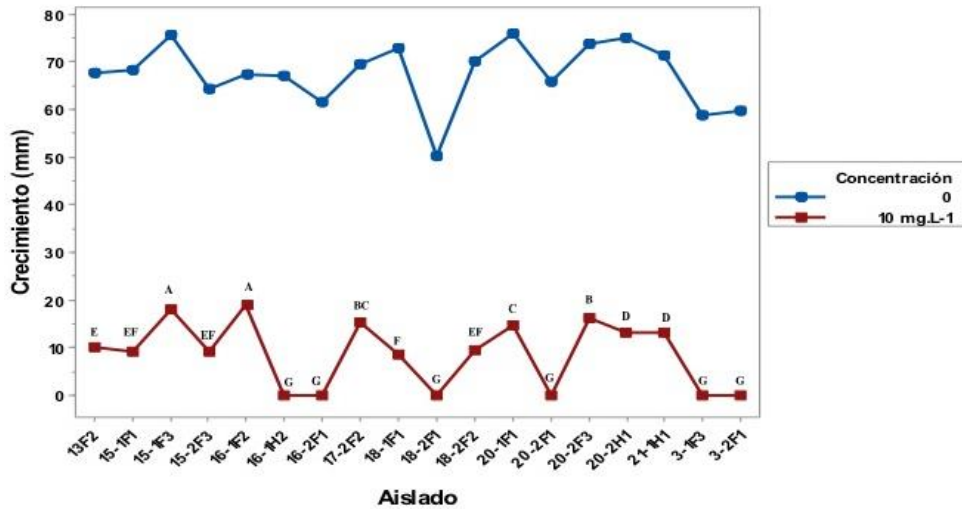


Figura 6. Crecimiento de aislados de *P. hydropathica* en medio de cultivo con 10 mg L⁻¹ de metalaxyl y en medio de cultivo libre de metalaxyl después de 6 días de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey $p < 0.05$).

Cuadro 1. Sensibilidad y concentración efectiva de metalaxyl en aislados de *P. hydropathica*.

Aislado	Tipo de resistencia			CE ₅₀ (µg L ⁻¹)
	Resistente	Intermedio	Sensible	
3-1F3			●	<0.000013
3-2F1			●	<0.000013
13-F2			●	0.0040
15-1F1			●	0.0054
15-2F3			●	0.0055
15-1F3		●		1
16-1F2		●		0.0034
16-1H2			●	<0.000013
16-2F1			●	<0.000013
17-2F2		●		0.26
18-1F1			●	0.000086
18-2F1			●	0.017
18-2F2			●	0.079
20-1F1		●		0.14
20-2F1			●	0.000013
20-2F3		●		0.52
20-2H1		●		0.074
21-1H1		●		0.1

CE₅₀= concentración efectiva a la cual el microorganismo crece 50% respecto al control. R²= 94.5%.

Las CE₅₀ de las 18 cepas fueron muy bajas, fluctuando en concentraciones menores a 0.000013 µg L⁻¹ y hasta 1 µg L⁻¹ (Cuadro 1), CE₅₀ similares se determinaron en cepas de *Phytophthora infestans* consideradas sensibles a metalaxyl en donde la concentración más baja fue de 0.02 µg L⁻¹ (Power *et al.*, 1995), mientras que, en un estudio con la especie *P. nicotianae* se obtuvieron concentraciones máximas de CE₅₀ de 0.04 µg mL⁻¹ para aislados clasificados como sensibles (Hu *et al.*, 2008), también se han encontrado concentraciones más altas de CE₅₀ en aislados clasificados como sensibles, tal es el caso de las obtenidas por Paez *et al.* (2001) en donde determinaron concentraciones mínimas de 1 000 µg mL⁻¹ para aislados de *P. infestans*.

Conclusiones

P. hydropathica tiene el potencial de infectar hojas y frutos de tomate, pepino y calabacita, plantas que son importantes en el sector hortícola en Sinaloa. Las 18 cepas de *Phytophthora hydropathica* son sensibles al metalaxyl.

Agradecimientos

Al CONACYT por financiar los estudios de B. Álvarez Rodríguez.

Literatura citada

- Álvarez, R. B.; García, E. R. S.; Valdez, T. J. B.; León, F. J.; Allende, M. R. and Fernández, P. S. P. 2017. *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation channels in the Culiacan Valley. México. Rev. Mex. Fitopatol. 35(1):20-39.
- Bienapfl, J. C. and Balci, Y. 2014. Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's trade. USA. Plant Dis. 98(1):134-144.
- Damicone, J. 2004. Fungicide resistance management. Cooperative Oklahoma Extension Service EPP-7663. Stillwater, OK.
- Davidse, L. C.; Looijen, D.; Turkesteen, L. J. and Van Der Wal, D. 1981. Occurrence of metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato field. Holanda. Eur. J. Plant Pathol. 87(2):65-68.
- Deahl, K. L.; DeMuth, S. P.; Sinden, S. L. 1995. Identification of mating types and metalaxyl resistance in North American populations of *Phytophthora infestans*. USA. Am. Potato J. 72(1):35-49.
- Fontem, D. A.; Olanya, O. M.; Tsopmbeng, G. R.; and Owona, M. A. P. 2005. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. USA. Crop Protection. 24(5):449-456.
- Forbes, G. A.; Goodwin, S. B.; Drenth, A.; Oyarzun, P.; Ordoñez, M. A. and Fry, W. E. 1998. A global marker database for *Phytophthora infestans*. USA. Plant Dis. 82(7):811-818.
- Gallegly, M. E. and Hong, C. X. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. Primera edición. APS Press. St Paul, MN, USA. 168 p.
- Hong, C. X.; Gallegly, M. E.; Richardson, P. A.; Kong, P.; Moorman, G. W.; Lea, C. J. D. and Ross, D. S. 2010. *Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. Inglaterra. Plant Pathol. 59(5):913-921.

- Hong, C. X.; Richardson, P. A. and Kong, P. 2008. Pathogenicity to ornamental plants of some existing species and new taxa of *Phytophthora* from irrigation water. USA. *Plant Dis.* 92(8):1201-1207.
- Hu, J.; Hong, C.; Stromberg, E. L. and Moorman, G. W. 2008. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Inglaterra. Plant Pathol.* 57(4):728-736.
- Hüberli, D.; Hardy, G. E. St J.; White, D.; Williams, N. and Burgess, T. I. 2013. Fishing for *Phytophthora* from Western Australia's waterways: a distribution and diversity survey. Australia. *Austr. Plant Pathol.* 42(3):251-260.
- Hulvey, J.; Gobena, D.; Finley, L. and Lamour, K. 2010. Co-occurrence and genotypic distribution of *Phytophthora* species recovered from watersheds and plant nurseries of eastern Tennessee. USA. *Mycologia.* 102(5):1127-1133.
- Martin, F. N.; Blair, J. E. and Coffey, M. D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. USA. *Fungal Gen. Biol.* 66(1):19-32.
- Matuszak, J. M.; Fernandez, E. J.; Gu, W. K.; Villarreal, G. M. and Fry, W. E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico. *Distribution and Dynamics.* USA. *Plant Dis.* 78(1):911-916.
- Moorman, G. W. and Kim, S. H. 2004. Species of *Pythium* from greenhouses in Pennsylvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. USA. *Plant Dis.* 88(6):630-632.
- Nuninger, C.; Steden, C. and Staub, T. 1995. The contribution of metalaxyl-based fungicide mixtures to potato late blight control. *Phytophthora infestans* 150. Pages 122-129. In: Dowley, L. J.; Bannon, E.; Cooke, L. R.; Keane, T. and OSullivan, E. (Eds.). European Association for Potato Research-Pathology Section Conference. Dublin, Ireland. Boole Press Ltd.
- Paez, O.; Gomez, L.; Brenes, A. y Valverde, R. 2001. Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en papa de Costa Rica. *Costa Rica. Agron. Costarric.* 25(1):33-44.
- Peters, R. D.; Sturz, V. A.; Matheson, B. G.; Arsenault, W. J. and Malone, A. 2001. Metalaxyl sensitivity of isolates of *Phytophthora erythroseptica* in Prince Edward Island. *Inglaterra. Plant Pathol.* 50(3):302-309.
- Power, R. J.; Hamlen, R. A. and Morehart, L. A. 1995. Variation in sensitivity of *Phytophthora infestans* fields isolates to cimoxanil, chlorotalonil and metalaxyl. P 154-159. In: European Association for Potato Research. *Phytophthora infestans.* 1845-1995. Boole Press Ltd. Dublin, Ireland.
- Rekanovic, E.; Potocnik, I.; Milijasevic-Marcic, S.; Stepanovic, M.; Todorovic, B. and Mihajlovic, M. 2012. Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from Serbia. USA. *J. Environ. Sci. Health B.* 47(5):403-409.
- Riveros, F. B.; Sotomayor, R.; Rivera, V.; Secor, G. y Espinoza, B. 2003. Resistance of *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary to metalaxyl in potato crops in Northern Chile. Chile. *Agricultura Técnica.* http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072003000200001.
- Shattock, R. C. 1988. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Inglaterra. Plant Pathol.* 37(1):4-11.
- Straub, T.; Dahmen, H.; Urech, P. and Schwinn, F. 1979. Failure to select for *in vivo* resistance in *Phytophthora infestans* to phenylamide fungicides. USA. *Plant Dis.* 63(1):385-389.

- Tian, M.; Zhao, L.; Li, S.; Huang, J.; Sui, Z.; Wen, J. and Li, Y. 2016. Pathotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora sojae* and their distribution in Heilongjiang, China 2011-2015. Japón. J. General Plant Pathol. 82(3):132-141.
- Urech, P. A.; Schwinn, F. and Staub, T. 1977. A novel fungicide for the control of late blight downy mildews, and related soil-borne disease. Proceedings British Crop Protection Conference. 623-631 pp.
- Vitale, S.; Luongo, L.; Galli, M. and Belisario, A. 2014. First report of *Phytophthora hydropathica* causing wilting and shoot dieback on *Viburnum* in Italy. USA. Plant Dis. 98(11):1582.
- Zappia, R. E.; Hüberli, D.; Hardy, G. E St. J. and Bayliss, K. L. 2014. Fungi and oomycetes in open irrigation systems: knowledge gaps and biosecurity implications. Inglaterra. Plant Pathol. 63(5):961-972.