

## Identificación y alternativas de manejo del mildiu veloso en rosal

Pablo Israel Álvarez Romero<sup>1</sup>  
Rómulo García Velasco<sup>1§</sup>  
Martha Elena Mora Herrera<sup>1</sup>  
Martha Lidya Salgado Siclan<sup>2</sup>  
Daniel Domínguez Serrano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario Tenancingo-Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero km 1.5, Tenancingo, Estado de México. CP. 52400. Tel. 01 (714) 1407724. (pablo.i.alvarez.r@yahoo.com; marthaelenam@gmail.com; danusso10@hotmail.com). <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, CP. 50200. Tel. 01(722) 2965529. (mlsalgados@uaemex.mx).

§Autor para correspondencia: rgarciave@uaemex.mx.

### Resumen

El mildiu veloso causado por *Peronospora sparsa* Berkeley es una de las enfermedades más importantes del rosal en México, causando pérdidas de 100%. Su manejo se basa con fungicidas en continuas aplicaciones que tienden a generar poblaciones resistentes. La búsqueda de alternativas es indispensable. En el presente trabajo se confirmó la identidad morfológica y molecular del agente asociado con el mildiu del rosal, se evaluó la eficacia del fosfito de potasio ( $K_3PO_3$ ), quitosano, silicio y mefenoxam para el manejo de la enfermedad y se determinó su efecto en la longitud y diámetro de tallo floral. El estudio se realizó en verano y otoño de 2013 en Tenancingo, Estado de México. La caracterización morfológica se realizó bajo microscopio compuesto y electrónico de barrido. Para la caracterización molecular, se amplificó el ADN ribosomal de la región ITS con los primers PS3 y PS1. Los tratamientos fueron: fosfito de potasio ( $K_3PO_3$ ), quitosano, silicio, mefenoxam y testigo y se aplicaron a intervalos semanales. El diseño experimental fue de bloques al azar y la comparación de medias fue por Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Datos morfológicos y moleculares correspondieron a *Peronospora sparsa*. El  $K_3PO_3$  y silicio redujeron la incidencia y severidad con respecto al testigo. El tratamiento con  $K_3PO_3$  mostró incrementos de 24.8 y 97.5% en la longitud de tallos con diámetros de 7.5 y 6.2 mm en verano y otoño respectivamente, comparando con el testigo. Así, el  $K_3PO_3$  y silicio pueden ser alternativas en el manejo del mildiu veloso del rosal en condiciones de invernadero.

**Palabras clave:** *Peronospora sparsa*, fosfito de potasio, incidencia, severidad.

Recibido: octubre de 2018

Aceptado: diciembre de 2018

## Introducción

La *Rosa* spp. es uno de los cultivos ornamentales más importantes y la producción bajo invernadero se estima en alrededor de 8 500 ha, con una producción anual de aproximadamente 15 a 18 billones de tallos cortados en el mundo (Blom y Tjusita, 2003). En 2017, en México, se reportaron 1 127.1 ha cultivadas en invernadero y su rendimiento fue de 6 985.98 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2018). Sin embargo, el cultivo es susceptible a diversas enfermedades como el mildiu veloso causado por el oomycete *Peronospora sparsa* Berkeley (Debener y Byrne, 2014), uno de los principales problemas fitosanitarios de este cultivo a nivel mundial, que ocasiona pérdidas en la producción al disminuir la calidad de los tallos florales y aumentar el costo de producción, especialmente por el incremento en el número de aplicaciones de fungicidas (Ayala *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2010).

El manejo de *Peronospora sparsa* se basa fundamentalmente en la aplicación de fungicidas (Aegerter *et al.*, 2002; Quiroga y Arbeláez, 2004) con hasta tres aplicaciones por semana, con un aumento drástico en los costos de producción y los impactos sobre la salud humana y el ambiente, además de originar variantes resistentes del patógeno (Kuck *et al.*, 2011; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012). Debido a la presión de los mercados sobre un manejo inocuo de los cultivos menos contaminante y peligroso, es importante encontrar alternativas a los fungicidas para el manejo del mildiu veloso, tales como las sales de ácido fosforoso (fosfitos) que han mostrado potencial para controlar enfermedades causadas por oomycetes, en particular los géneros *Peronospora*, *Plasmopara*, *Phytophthora* y *Pythium* (Lobato *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Burra *et al.*, 2014; Brunings *et al.*, 2015).

Su modo de acción es complejo; presentan efectos directos sobre los patógenos (King *et al.*, 2010) e indirectos mediante la estimulación de respuestas de defensa del hospedante (Machinandiarena *et al.*, 2012; Burra *et al.*, 2014). Al respecto, Lobato *et al.* (2010) demostraron que aplicaciones de fosfitos redujeron los síntomas causados por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Rhizoctonia solani* Kühn en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.).

Además, de que los fosfitos actúan como un potencial inductor de respuestas metabólicas beneficiosas en las plantas, se ha confirmado su eficacia sobre la calidad y rendimiento de algunos cultivos (Lovatt y Mikkelsen, 2006; Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015). Asimismo, aplicaciones de silicio han demostrado ser eficaces en la supresión de enfermedades fungosas; al depositarse en espacios intra e inter celulares, actuando como una barrera física ante la infección de los patógenos (Ma y Takashi, 2002).

También la resistencia mediada por silicio a fitopatógenos se ha demostrado en varios patosistemas tales como pepino-*Podosphaera fuliginea* (Schltld.) U. Braun & S. Takam. (Liang *et al.*, 2005), calabacín-*P. xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff (Sawas *et al.*, 2009), trigo-*Blumeria graminis* (DC.) Speer (Bélangier *et al.*, 2003) y pimiento-*Phytophthora capsici* (Leonian) (Lee *et al.*, 2004) mediante la inducción y acumulación de metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular en respuesta a la infección durante el desarrollo de la enfermedad (Fawe *et al.*, 1998; Fauteux *et al.*, 2005). Asimismo, se ha demostrado que la aplicación de silicio promueve el crecimiento y calidad de las rosas (Hwang *et al.*, 2005; Reezi *et al.*, 2009). El control de oomycetes se ha logrado mediante el tratamiento con quitosano, actuando directamente sobre el patógeno o mediante la estimulación de respuestas de defensas de las plantas (Iriti *et al.*, 2011). Al respecto, se reportó que

el tratamiento con quitosano inhibió el crecimiento micelial de *P. capsici* en pimientos (Xu *et al.*, 2007), mientras que en plántulas de *Solanum tuberosum* se incrementó la actividad enzimática de la quitinasa en respuesta a la infección por *P. infestans* (O'Herlihy *et al.*, 2003).

Por su parte, Wojdyla (2004) reportó que la aplicación de quitosano a una concentración de 0.025% en rosal, mostró una efectividad biológica superior a 72% en el control de *Peronospora sparsa* y fue similar al fungicida. Independientemente de los efectos del quitosano sobre las enfermedades, mejoras significativas en crecimiento y calidad se han reportado en diversos cultivos ornamentales (Wanichpongpan *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2001; Nge *et al.*, 2006; Ramos-García *et al.*, 2009).

Con base a lo mencionado, los objetivos de este estudio fueron caracterizar morfológica y molecularmente al agente asociado con el mildiu vellosa en *Rosa* spp., evaluar la eficacia de cuatro productos comerciales (Metalaxil, fosfito de potasio, silicio y quitosano) en el manejo del mildiu vellosa en condiciones de campo y determinar su efecto en la longitud y diámetro de tallo floral.

## Materiales y métodos

### Caracterización morfométrica

Se colectaron en invernadero hojas de rosal var. Lupita<sup>®</sup> (Meilland International) con síntomas y signos del mildiu vellosa en el municipio de Tenancingo, México. Estructuras como esporangióforos y esporangios fueron desprendidos de los folíolos y con ellas se realizaron preparaciones semipermanentes con cinta Scotch en glicerol al 50% acidificado con HCl al 12N, en estas se observaron y midieron en el microscopio compuesto (Carl Zeiss<sup>®</sup> Axiostar plus) las características morfométricas de 30 esporangióforos y 50 esporangios. La identificación del género y especie se realizó de acuerdo a Achard (1997); Horts y Cloyd (2007).

### Microscopia electrónica de barrido

Fragmentos de hojas jóvenes (0.5 cm<sup>2</sup>) de rosal con signos de mildiu vellosa se fijaron en glutaraldehído al 3% durante 24 h, posteriormente se lavaron con buffer de fosfato Sorensen's (0.1 M). Las muestras se deshidrataron mediante la inmersión en etanol a concentraciones graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90) por 40 min cada uno y al 100% tres veces por 20 min. Posteriormente se secaron en CO<sub>2</sub> en un desecador de punto crítico (Sandri-780A<sup>®</sup>, EE UU) por 40 min, se montaron en portamuestras de cobre y se recubrieron con oro en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, JEOL<sup>®</sup>, Japón) por 1 min. Finalmente, las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6390<sup>®</sup>, Japón).

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de hojas con signos del mildiu vellosa, mediante el reactivo Plant DNAzol Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, con modificaciones para evitar el efecto de fenoles, por lo que se realizaron cinco lavados con 300 µL de etanol al 75%. La integridad de ADN se observó en un gel de agarosa (Ultrapure<sup>™</sup>) al 1%, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador (Syngene<sup>®</sup> GVM20), la calidad y concentración se determinaron en un biofotómetro (Eppendorf<sup>®</sup> D-5000-3000). El ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de agua grado biología molecular y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

## PCR y secuenciación de ADN

Para la prueba de PCR se utilizaron los primers específicos PS3 (5'ATTTTGTGCTGGCTGGC3') y PS1 (5'TGCCACACGACCGAAGC3') (Aegerter *et al.*, 2002) para amplificar diferencialmente la región ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr del patógeno en estudio. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla: 2.6  $\mu\text{L}$  de agua estéril desionizada (Gibco®), 10  $\mu\text{L}$  de 2X Phire Plant PCR Buffer (incluye 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTPs y 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), 2  $\mu\text{L}$  de cada primer PS3 y PS1 (10  $\mu\text{mol}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de leche sin grasa estéril (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de ADN y 0.4  $\mu\text{L}$  de DNA polimerasa (Phire® Hot Start II). La amplificación se realizó en un termociclador (MJ Research Thermal® PTC-100) de acuerdo al procedimiento descrito por Ayala *et al.* (2008). El producto de la amplificación se verificó mediante electroforesis a 90 V por 30 min en gel de agarosa al 1% y tinción con 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio, la visualización se realizó en un transiluminador (Syngene® GVM20). El ADN se purificó con el kit comercial DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research®).

Posteriormente los fragmentos amplificados mediante la PCR fueron secuenciados en ambas direcciones en un analizador genético (Applied Biosystem® ABI Prism 3130XL). La secuencia obtenida fue alineada en la base de datos del NCBI. La secuencia se depositó en la base del GenBank.

## Experimentos en invernadero

En plantas de rosal var. Lupita® cultivadas en condiciones de invernadero se realizaron dos ensayos: el primero en la temporada de verano y el segundo en otoño de 2013. Ambos se realizaron bajo un diseño de bloques al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Se utilizaron 20 unidades experimentales, cada unidad experimental consistió en una parcela de 2.7 m de largo por 1 m de ancho con 27 plantas de rosal distribuidas en hilera. Mediante una poda se estimuló la producción de brotes de forma homogénea, sobre los cuales se evaluaron los tratamientos.

## Tratamientos

Los tratamientos fueron: fosfito de potasio, silicio, quitosano, el fungicida mefenoxam y un testigo a base de agua destilada (Cuadro 1). Los tratamientos se asignaron al azar a cada unidad experimental, su aplicación inició ocho días después de la poda y posteriormente a intervalos semanales hasta finalizar los ensayos. La aplicación se realizó con una bomba de aspersión motorizada (Maruyama® MS072H) con boquilla de abanico.

**Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados sobre plantas de rosa var. Lupita® para el manejo de *Peronospora sparsa*.**

| Tratamiento        | Nombre comercial     | Concentración   | *Dosis ( $\text{mL L}^{-1}$ ) |
|--------------------|----------------------|---|-------------------------------|
| Testigo            | Agua destilada       | -   | -                             |
| Fosfito de potasio | Nutriphite magnum®   | 2% N, 40% $\text{P}_2\text{O}_5$ , 16% $\text{K}_2\text{O}$ | 2.5                           |
| Silicio            | Armurox®             | 2% complejo de péptidos con silicio soluble                 | 2.5                           |
| Quitosano          | Biorend®             | 2.5% poly-d-glucosamina                                     | 3                             |
| Mefenoxam          | Ridomil Gold® 480 SL | 480 g ia. $\text{L}^{-1}$                                   | 2                             |

\*Dosis recomendadas por el fabricante.

## **Variables evaluadas**

Se seleccionaron y etiquetaron 10 tallos al azar por unidad experimental para la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad, longitud y diámetro de tallos florales.

### **Evaluación de la incidencia y severidad**

Para favorecer el desarrollo natural del mildiu vellosa durante los ensayos, se incrementó la humedad relativa (90-100%) mediante un sistema de nebulización. La incidencia y severidad se evaluaron inmediatamente después de la aparición de los primeros síntomas, posteriormente a intervalos semanales. El porcentaje de incidencia se calculó contabilizando el número de tallos con síntomas con relación a los 10 tallos evaluados por unidad experimental. La severidad de la enfermedad se determinó mediante una escala porcentual de acuerdo a Rebollar *et al.* (2012) con las siguientes clases: 0= (no síntomas), 1= hasta 5%, 2= 5-10%, 3= 10-25%, 4= 25-50%, 5= 50-75% y 6= >75% de área foliar cubierta con lesiones. Los valores se transformaron a porcentaje de severidad mediante la ecuación de Townsend y Heuberger (1943). Los datos de incidencia y severidad se transformaron a área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), aplicando el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990).

### **Evaluación de longitud y diámetro de tallo floral**

En punto de corte, se midió la longitud de tallo (cm) con un flexómetro, desde la base hasta el ápice del mismo. El diámetro se determinó en la parte media del tallo con un vernier digital (Truper® CALDI-6MP).

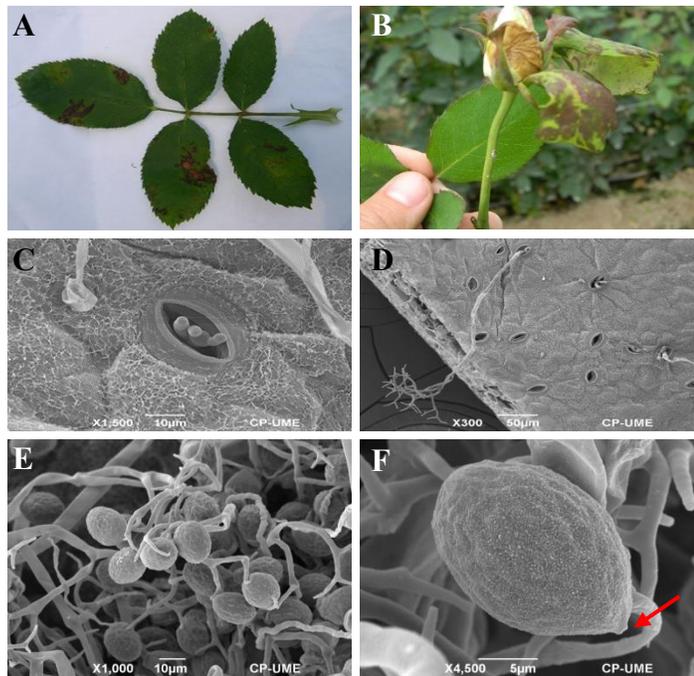
### **Análisis de datos**

Los datos de las variables fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ( $\alpha= 0.05\%$ ) mediante el programa estadístico InfoStat, versión estudiantil 2015.

## **Resultados y discusión**

### **Caracterización morfométrica**

El patógeno asociado con la enfermedad fue identificado como *Peronospora sparsa* Berk. con base en la sintomatología mostrada en las hojas, que se caracterizó por el desarrollo de manchas irregulares de color púrpura a café oscuro en el haz de las hojas (Figura 1A y 1B), mientras por el envés se observaron los signos del patógeno (esporangióforos y esporangios), posteriormente se evidenció la abscisión de las hojas. Dichos síntomas concuerdan con los reportados por Horst y Cloyd (2007). Se observaron esporangióforos hialinos emergiendo de los estomas en el envés de las hojas, de 150-240 x 7.5-12  $\mu\text{m}$ , con ramificación dicotómica de 3 a 4 veces con puntas bifurcadas (Figura 1C y D). Los esporangios fueron hialinos, subglobosos a elipsoidales, de 17.5-25 x 12.5-17.5  $\mu\text{m}$ , con pared de textura rugosa y en la base presentó una papila de germinación (Figura 1E y 1F). Características morfométricas que coinciden con los reportes de Achar (1997); Horst y Cloyd (2007); López-Guisa *et al.* (2013).



**Figura 1.** A y B) síntomas causados por *Peronospora sparsa* en rosal. var. *Lupita*<sup>®</sup>; C y D) esporangióforos hialinos emergiendo de los estomas, con ramificaciones dicotómicas y puntas bifurcadas; E y F) esporangios hialinos con pared rugosa y papila de germinación.

### Caracterización molecular

Secuenciación del producto de la región ITS del rDNA amplificado por PCR usando los primers PS3 y PS1 (Aegerter *et al.*, 2002) permitió amplificar una secuencia de nucleótidos de 689 pb. Al comparar la secuencia de nucleótidos de este estudio (número de depósito KJ817198), con las depositadas en el GenBank, el análisis BLAST mostró una identidad de 99% con accesiones de *Peronospora sparsa* sobre *Potentilla reptans* (DQ874342) en Korea (Choi *et al.*, 2007) y en *Rubus* sp. (EU369694) de México (Revollar-Alviter *et al.*, 2008) y 98% con secuencias aisladas de *Rosa multiflora* (AY608610) en Korea, *Rubus fruticosus* (EU391654) de Dinamarca y en *Rosa* sp. (AF266783) de Inglaterra (Cooke *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2005; Sundelin *et al.*, 2009).

### Evaluación de incidencia y severidad

El ABCPE de la incidencia y severidad mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos (Cuadro 2). El tratamiento con fosfito de potasio a dosis de 2.5 mL L<sup>-1</sup> redujo significativamente la incidencia (7.6% en verano y 58% en otoño) y la severidad (50.3% en verano y 84.2% en otoño) de *Peronospora sparsa*, esto con respecto al testigo. Resultados similares han sido reportados por Chavarro-Carrero *et al.* (2012), quienes demostraron que aplicaciones periódicas de fosfito de potasio (2.5 mL L<sup>-1</sup>) sobre rosal var. Bingo White<sup>®</sup> redujeron la incidencia hasta 35% y la severidad en 6.3% de *P. sparsa*.

Recientemente, Boyzo-Marín *et al.* (2015) reportaron que el tratamiento con fosfito de potasio en zarzamora redujo la incidencia de *P. sparsa* de 0.66 a 13% en comparación con el testigo. El efecto de los fosfitos se debe a que son compuestos que se mueven sistémicamente a través del xilema y el floema (Cooke y Little, 2001), actuando directamente en el desarrollo del patógeno, inhibiendo el crecimiento micelial, provocando la deformación de las hifas y lisis de la pared celular (King *et al.*, 2010), o indirectamente a través de la activación de los mecanismos de defensa de las plantas a través de la vía del ácido salicílico (Massoud *et al.*, 2012).

Los resultados de este estudio también indican que el silicio puede ser una alternativa para el manejo de esta enfermedad, puesto que en el verano hubo una reducción significativa de incidencia (4.5%) y severidad (20.3%), con respecto al testigo. En la temporada de otoño la incidencia disminuyó 13.1%, pero sin diferencia estadística, mientras que en la severidad se observó una reducción significativa de 66.8%, en contraste con el testigo (Cuadro 2). Al respecto, Ratnayake *et al.* (2016), reportaron que la aplicación de silicato de potasio (200 ppm) en plantas de *Momordica charantia* L., redujo significativamente la severidad de *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M. A. Curtis) Rostovzev, de 37-53%, en comparación con el testigo.

**Cuadro 2. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para la incidencia y severidad de *P. sparsa* en el cultivo de rosa var. Lupita®.**

| Tratamiento        | Incidencia           |                       | Severidad             |                      |
|--------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
|                    | Verano               | Otoño                 | Verano                | Otoño                |
| Fosfito de potasio | 2 135 <sup>A</sup>   | 1 286.2 <sup>A</sup>  | 1 014.4 <sup>A</sup>  | 258.1 <sup>A</sup>   |
| Silicio            | 2 205 <sup>A</sup>   | 2 660 <sup>BC</sup>   | 1 624.8 <sup>B</sup>  | 542.5 <sup>A</sup>   |
| Quitosano          | 2 187.5 <sup>A</sup> | 2 817.5 <sup>BC</sup> | 1 676.5 <sup>BC</sup> | 1 255.6 <sup>B</sup> |
| Mefenoxam          | 2 187.5 <sup>A</sup> | 2 852.5 <sup>BC</sup> | 1 739.9 <sup>BC</sup> | 1 255.6 <sup>B</sup> |
| Testigo            | 2 310 <sup>B</sup>   | 3 062.5 <sup>C</sup>  | 2 039.7 <sup>C</sup>  | 1 631.8 <sup>B</sup> |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, Tukey ( $p > 0.05$ ).

Resultados similares fueron obtenidos por Garibaldi *et al.* (2012), quienes reportaron que la aplicación de silicato de potasio, redujo la incidencia y la severidad del mildiu veloso causado por *Bremia lactucae* Regel, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). El efecto del silicio es atribuido a la creación de barreras físicas (grosor de la cutícula) por la acumulación del mismo en las hojas, lo que impide la penetración de los patógenos y por la estimulación directa de las respuestas en el hospedero (Rodríguez *et al.*, 2005; Ma y Yamaji, 2006; Ratnayake *et al.*, 2016).

Por otra parte, el tratamiento con quitosano únicamente redujo significativamente la incidencia de *P. sparsa* en la temporada de verano, contrastando con el testigo, mientras que la severidad no se redujo en ninguna de las dos temporadas (Cuadro 2). Los resultados posiblemente se relacionan con la concentración aplicada, el peso molecular, el grado de desacetilación y el tipo de quitosano, tal como lo reportan Bautista-Baños *et al.* (2006) y Kong *et al.* (2010).

Similarmente, el fungicida mefenoxam no inhibió de manera absoluta el desarrollo de *P. sparsa*, puesto que los valores de ABCPE fueron estadísticamente iguales al testigo a excepción de la incidencia observada en la temporada de verano (Cuadro 2). Una tendencia similar fue observada por Quiroga y Arbeláez (2004), quienes reportaron que aplicaciones de mefenoxam al suelo y al

follaje no controlaron eficazmente el desarrollo de *P. sparsa* en el cultivo de rosa en Colombia. La resistencia a mfenoxam también ha sido observada en un aislamiento de *Peronospora belbahrii* Thines sobre albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en Israel (Cohen *et al.*, 2013).

La pérdida de sensibilidad del patógeno al mfenoxam encontrada en el presente trabajo, puede deberse al desarrollo de resistencia de *P. sparsa*, lo que sugiere analizar el uso de mfenoxam en la producción de rosa, sobre todo porque este fungicida es ampliamente usado en México para el manejo de este patógeno. Otro factor que pudo influir fue la presión de la enfermedad, tal como lo reportan Walter *et al.* (2004) quienes demostraron que el metalaxyl no tuvo un efecto considerable para el control de *P. sparsa* en zarza boysen (*Rubus hybrid*) cuando se observó presión alta de la enfermedad.

### Evaluación de longitud y diámetro de tallo floral

El tratamiento con fosfito de potasio en plantas de rosa var. Lupita<sup>®</sup> incrementó significativamente la longitud de tallos de 24.8% y 97.5% en la temporada de verano y otoño respectivamente, contrastando con el testigo, que indujo la menor longitud en ambas temporadas (Cuadro 3). Similarmente, las plantas tratadas con fosfito de potasio, mostraron los mayores diámetros de tallo con 7.5 y 6.2 mm en la temporada de verano y otoño respectivamente, y fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ) con respecto al testigo (Cuadro 3). A pesar, que no existen evidencias que demuestren los efectos positivos del fosfito de potasio en flores y especies ornamentales (Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015), los resultados de la presente investigación permiten inferir que aplicaciones de fosfito de potasio en plantas de rosal, incrementa la longitud y diámetro de tallos; por lo que se convierte en una alternativa para el manejo integrado de dicho cultivo. Resultados similares han sido reportados en otros cultivos, por ejemplo; Glinicki *et al.* (2010) reportaron efectos beneficiosos del fosfito de potasio en los parámetros de crecimiento de tres cultivares de fresa; por su parte Tambascio *et al.* (2014) documentaron que la aplicación de fosfito de potasio en tubérculos (semilla) de *Solanum tuberosum* L. aceleró la emergencia e incrementó el área foliar y la materia seca.

**Cuadro 3. Efecto de los tratamientos en longitud y diámetro de tallos florales de rosa variedad Lupita<sup>®</sup>.**

| Tratamiento        | Longitud (cm)     |                   | Diámetro (mm)     |                   |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                    | Verano            | Otoño             | Verano            | Otoño             |
| Fosfito de potasio | 76.1 <sup>A</sup> | 39.3 <sup>A</sup> | 7.5 <sup>A</sup>  | 6.2 <sup>A</sup>  |
| Silicio            | 61.8 <sup>B</sup> | 22.9 <sup>B</sup> | 6.8 <sup>BC</sup> | 4.6 <sup>BC</sup> |
| Quitosano          | 61.9 <sup>B</sup> | 21.7 <sup>B</sup> | 7.1 <sup>B</sup>  | 4.8 <sup>B</sup>  |
| Mfenoxam           | 66.1 <sup>B</sup> | 23.7 <sup>B</sup> | 7.4 <sup>A</sup>  | 4.7 <sup>BC</sup> |
| Testigo            | 61 <sup>B</sup>   | 19.9 <sup>B</sup> | 6.6 <sup>C</sup>  | 4.4 <sup>C</sup>  |

Valores con una letra en común no son significativamente diferentes, Tukey ( $p > 0.05$ ).

Además, en cítricos y aguacate, se ha demostrado que una sola aplicación foliar de fosfitos incrementa la intensidad floral, el rendimiento, el tamaño de fruto, los sólidos solubles totales y la concentración de antocianinas (Lovatt y Mikkelsen, 2006).

Así mismo, se ha demostrado que las aplicaciones de silicio tienen efectos benéficos sobre el crecimiento y calidad de las rosas (Hwang *et al.*, 2005; Reezi *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestros ensayos la aplicación de silicio no mostró diferencias significativas sobre la longitud y diámetro de tallos florales, esto con respecto al testigo (Cuadro 3). Los resultados pudieron estar relacionados con la dosis de aplicación, ya que existen evidencias que demuestran que dosis altas de silicio provocan una reducción en la longitud y diámetro de tallos de rosa (Reezi *et al.*, 2009), en *Gerbera jamesonii* L. Bolus, disminuye la longitud de tallo y provoca deformación de flores (Kamenidou *et al.*, 2010).

Con respecto al quitosano, se observó un incremento en la longitud de tallo 1.5% en verano y de 9% en otoño, pero sin diferencia significativa con respecto al testigo. Mientras que en el diámetro de tallo se observaron incrementos de 7.6 y 9.1% para el verano y el otoño respectivamente, y fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ) al compararlos con el testigo (Cuadro 3). Algunos reportes indican que la aplicación de quitosano presenta mejoras significativas sobre el crecimiento y desarrollo en cultivos ornamentales, tales como gerbera (Wanichpongpan *et al.*, 2000), orquídeas (Chandrkrachang, 2002), lisianthus (Ohta *et al.*, 2001), *Lilium* spp. (Kim *et al.*, 2005) y Gladiola (Ramos-García *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante destacar que el éxito del quitosano puede estar asociado con la concentración utilizada, el peso molecular y el grado de desacetilación (Aranaz *et al.*, 2009; Salachna y Zawadzińska, 2014).

## Conclusiones

La caracterización morfométrica y molecular confirmaron que *Peronospora sparsa* Berkeley es el agente asociado con el mildiu vellosa del rosal en el municipio de Tenancingo, Estado de México, México. Las aplicaciones con fosfito de potasio y silicio redujeron la incidencia y severidad de *P. sparsa*, por lo que deben considerarse como alternativas viables para el manejo de la enfermedad. La aplicación semanal de fosfito de potasio (Nutriphite magnum<sup>®</sup>) tiene efectos positivos sobre la longitud y diámetro de tallo. El fungicida mefenoxam no inhibió de manera absoluta el desarrollo de *P. sparsa*.

## Literatura citada

- Achar, P. N. 1997. First report of downy mildew disease of rose caused by *Peronospora sparsa* in KwaZulu Natal, Southern Africa. *Plant Dis.* 81(6):695.
- Aegerter, B. J.; Nuñez, J. J. and Davis, R. M. 2002. Detection and management of downy mildew in rose rootstock. *Plant Dis.* 86(12):1363-1368.
- Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Panos, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G. and Heras, A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chem. Biol.* 3(2):203-230.
- Ayala, V. M.; Argel, R. L. E; Jaramillo, V. S. y Marín, M. M. 2008. Diversidad genética de *Peronospora sparsa* (Peronosporaceae) en cultivos de rosa de Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 13(1):79-94.
- Bautista, B. S.; Hernández, L. A. N.; Velázquez, del V. M. G.; Hernández, L. M.; Ait, B. E.; Bosquez, M. E. and Wilson, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection.* 25(2):108-118.

- Bélanger, R. R.; Benhamou, N. and Menzies, J. G. 2003. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance of powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). *Phytopathology*. 93(4):402-412.
- Blom, T. J. and Tsujita, M. J. 2003. Cut rose production. *In: Encyclopedia of rose science*. Roberts, A. V.; Debener, T. and Gudin, S. (Eds.). Elsevier Academic Press. Amsterdam, Netherland. 594-600 pp.
- Boyzo, M. J.; Silva, R. H. V. and Rebolgar, A. A. 2015. Biorational treatments to manage dryberry of blackberry caused by *Peronospora sparsa*. *Crop Protection*. 76:121-126.
- Brunings, A. M.; Liu, G.; Simonne, E. H.; Zhang, S.; Li, Y. and Datnoff, L. E. 2015. Are phosphorous and phosphoric acids equal phosphorous sources for plant growth? UF IFAS Extension, University of Florida. 1-8 pp.
- Burra, D. D.; Berkowitz, O.; Hedley, P. E.; Morris, J.; Resjö, S.; Levander, F.; Liljeroth, E.; Andreasson, E. and Alexandersson, E. 2014. Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. *BMC Plant Biology*. 14:254.
- Campbell, C. L. and Madden, V. L. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. 532 p.
- Castillo, C. F.; Álvarez, E.; Gómez, E.; Llano, G. A. y Castaño, Z. J. 2010. Mejoramiento nutricional de la rosa para el manejo de *Peronospora sparsa* Berkeley, causante del mildew vellosa. *Rev. Acad. Colomb. de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 34(131):137-142.
- Chandrkrachang, S. 2002. The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. *Adv. Chitin Sci*. 5:458-462.
- Chavarro, C. E. A.; García, V. R.; González, D. J. G.; González, C. L. E. y Jiménez, Á. L. J. 2012. Uso del fosfito de potasio para el manejo de *Peronospora sparsa* en *Rosa* spp. *Fitopatol. Colomb*. 36(2):53-56.
- Choi, Y. J.; Constantinescu, O. and Shin, H. D. 2007. A new downy-mildew of the Rosaceae: *Peronospora oblatispora* sp. nov. (Chromista, Peronosporales). *Nova Hedwigia*. 85(1-2):93-101.
- Choi, Y. J.; Hong, S. B. and Shin, H. D. 2005. A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data. *Mycological Res*. 109(7):841-848.
- Cohen, Y.; Vaknin, M.; Ben, N. Y.; Rubin, A. E. and Galperin, M. 2013. First report of the occurrence and resistance to mefenoxam of *Peronospora belbahrii*, causal agent of downy mildew of basil (*Ocimum basilicum*) in Israel. *Plan Dis*. 97(5):692.
- Cooke, D. E. L.; Dreth, A.; Duncan, J. M.; Wagels, G. and Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Gen. Biol*. 30(1):17-32.
- Cooke, L. R. and Little, G. 2001. The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Manag. Sci*. 58(1):17-25.
- Debener, T. and Byrne, D. H. 2014. Disease resistance breeding in rose: Current status and potential of biotechnological tools. *Plant Sci*. 228:107-117.
- Fautex, F.; Rémus, B. W.; Menzies, J. G. and Bélanger, R. R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Letters*. 249(1):1-6.
- Fawe, A.; Abou, Z. M.; Menzies, J. G. and Bélanger, R. R. 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathol*. 88(5):396-401.
- Garibaldi, A.; Gilardi, G.; Cogliati, E. E. and Gullino, M. L. 2012. Silicon and increased electrical conductivity reduce downy mildew of soilless grown lettuce. *Eur. J. Plant Pathol*. 132(1):123-132.

- Glinicki, R.; Sas-Paszt, L. and Jadczyk-Tobjasz, E. 2010. The effect of plant stimulant-fertilizer 'Resistim' on growth and development of strawberry plants. *J. Fruit Ornamental Plant Res.* 18(1):111-124.
- Gómez, M. F. C. and Trejo, T. L. I. 2015. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Sci. Hortic.* 196:82-90.
- Horst, K. and Cloyd, R. 2007. Compendium of rose diseases. The American Phytopathological Society. Second Edition. St. Paul, Minnesota, USA. 96 p.
- Hwang, S. J.; Han-Min, P. and Jeong, B. R. 2005. Effects of potassium silicate on the growth of miniature rose 'Pinocchio' grown on rockwool and its cut flower quality. *J. Japan. Soc. for Hort. Sci.* 74(3):242-247.
- Iriti, M.; Vitalini, S.; Di Tommaso, G.; D'Amico, S.; Borgo, M. and Faoro, F. 2011. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* 17(2):263-269.
- Kamenidou, S.; Cavins, T. J. and Marek, S. 2010. Silicon supplements affect floricultural quality traits and elemental nutrient concentrations of greenhouse produced gerbera. *Sci. Hortic.* 123(3):390-394.
- Kim, J. H.; Lee, A. K. and Suh, J. K. 2005. Effect of certain pretreatment substances on vase life and physiological character in *Lilium* spp. *Acta Hortic.* 673(39):307-314.
- King, M.; Reeve, W.; Van der Hoek, M. B.; Williams, N.; McComb, J.; O'Brien, P. A. and Hardy, G.E. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Genet. Genomics.* 284(6):425-435.
- Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K. and Park, H. J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144(1):51-63.
- Kuck, K. H.; Leadbeater, A. and Gisi, U. 2011. FRAC mode of action classification and resistance risk of fungicides. *In: modern crop protection compounds.* Krämer, W.; Schirmer, U.; Jeschke, P. and Witschel, M. (Eds.). Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany. 539-558 pp.
- Lee, J. S.; Seo, S. T.; Wang, T. C.; Jang, H. I.; Pae, D. H. and Engle, L. M. 2004. Effect of potassium silicate amendments in hydroponic nutrient solution on the suppressing of *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*) in pepper. *Plant Pathol. J.* 20(4):277-282.
- Liang, Y. C.; Sun, W. C.; Si, J. and Römheld, V. 2005. Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathol.* 54(5):678-685.
- Lobato, M. C.; Olivieri, F. P.; Daleo, G. R. and Andreu, A. B., 2010. Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. *J. Plant Dis. Prot.* 117(3):102-109.
- López, G. D.; Yáñez, M. M. J. and Alanís, M. I. 2013. First report of *Peronospora sparsa* on *Rosa* spp. in Mexico. *J. Plant Pathol.* 95(4):73.
- Lovatt, C. J. and Mikkelsen, R. L. 2006. Phosphite fertilizers: What are they? can you use them? what can they do?. *Better crops with Plant Food.* 90(4):11-13.
- Ma, J. F. and Takahashi, E. 2002. Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan. Elsevier Science. Amsterdam, Holland. 294 p.
- Machinandiarena, M. F.; Lobato, M. C.; Feldman, M. L.; Daleo, G. R. and Andreu, A. B. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.* 169(14):1417-1424.

- Massoud, K.; Barchietto, T.; Le Rudulier, T.; Pallandre, L.; Didierlaurent, L.; Garmier, M.; Ambard, B. F.; Jean, M. S. and Saindrenan, P. 2012. Dissecting phosphite-induced priming in arabidopsis infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiol.* 159(1):286-298.
- Nge, K. L.; New, N.; Chandkrachang, S. and Stevens, W. F. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Sci.* 170(6):1185-1190.
- O’Herlihy, E. A.; Duffy, E. M. and Cassells, A. C. 2003. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. *Folia Geobotanica.* 38(2):201-207.
- Ohta, K.; Asao, T. and Hosoki, T. 2001. Effects of chitosan treatments on seedling growth, chitinase activity and flower quality in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. ‘Kairyuu Wakamurasaki’. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76(5):612-614.
- Quiroga, B. N. J. y Arbeláez, T. G. 2004. Evaluación de la eficacia de fungicidas aplicados al suelo y al follaje para el control de mildew veloso, ocasionado por *Peronospora sparsa* en un cultivo comercial de rosa. *Agron. Colomb.* 22(2):110-118.
- Ramos, G. M.; Ortega, C. S.; Hernández, L. A. N.; Alia, T. I.; Bosquez, M. E. and Bautista, B. S. 2009. Response of gladiolus (*Gladiolus* spp.) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. *Sci. Hortic.* 121(4):480-484.
- Ratnayake, R. M. R. N. K.; Daundasekera, W. A. M.; Ariyaratne, H. M. and Ganehenege, M. Y. U. 2016. Soil application of potassium silicate reduces the intensity of downy mildew in bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaves. *Ceylon J. Sci.* 45(1):23-31.
- Rebollar, A. A.; Silva, R. H. V. and Zelaya, M. L. X. 2008. Detection and management of downy mildew of blackberry caused by *Peronospora sparsa* in Michoacan, México. *Phytopathology.* 98:S131-S131.
- Rebollar, A. A.; Silva, R. H. V.; López, C. I.; Boyzo, M. J. and Ellis, M. A. 2012. Fungicide sprays programs to manage downy mildew (dryberry) of blackberry caused by *Peronospora sparsa*. *Crop Protection.* 42:49-55.
- Reezi, S.; Babalar, M. and Kalantari, S. 2009. Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of salts-tressed cut rose (*Rosa x hybrida* L.) ‘Hot Lady’. *Afr. J. Biotechnol.* 8(8):1502-1508.
- Rodrigues, F. A.; Jurick, W. M.; Datnoff, L. E.; Jones, J. B. and Rollins, J. A. 2005. Silicon-influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66(4):144-159.
- Salachna, P. and Zawadzinska, A. 2014. Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *J. Ecol. Eng.* 15(3):97-102.
- Sawas, D.; Giotis, D.; Chatzieustratiou, E.; Bakea, M. and Patakioutas, G. 2009. Silicon supply in soilless cultivations of zucchini alleviates stress induced by salinity and powdery mildew infections. *Environ. Exp. Bot.* 65(1):11-17.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx>.
- Silva, O. C.; Santos, H. A. A.; Dalla Pria, M. and May-De Mio, L. L. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Protection.* 30(6):598-604.
- Sundelin, T.; Collinge, D. B. and Lübeck, M. 2009. A cultivation independent, PCR-based protocol for the direct identification of plant pathogens in infected plant material. *Eur. J. Plant Pathol.* 123(4):473-476.
- Tambascio, C.; Covacevich, F.; Lobato, M. C.; de Lasa, C.; Caldiz, D.; Dosio, G. and Andreu, A. 2014. The application of K phosphites to seed tubers enhanced emergence, early growth and mycorrhizal colonization in potato (*Solanum tuberosum*). *Am. J. Plant Sci.* 5(1):132-137.

- Townsend, G. R. and Heuberger, J. W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis.* 27(17):340-343.
- Walter, M.; Harris, V. P.; Thomas, W.; Tate, G.; Waipara, N. W. and Langford, G. 2004. Agrochemicals suitable for downy mildew control in New Zealand boysenberry production. *Crop Protection.* 23(4) 327-333.
- Wanichpongpan, P.; Suriyachan, K. and Chandkrachang, S. 2000. Effects of chitosan on the growth of gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). *In: Chitin and chitosan in life science.* Uragami, T.; Kurita, K. and Fukamizo, T. (Eds.). Kodansha Scientific. Yamaguchi, Japan. 198-201 pp.
- Wojdyla, A. T. 2004. Chitosan (biochikol 020 PC) in the control of some ornamental foliage diseases. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 69(4):705-715.
- Xu, J.; Zhao, X.; Han, X. and Du, Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochem. Physiol.* 87(3):220-228.