

Efecto *in vitro* de fosfito de potasio sobre *Athelia rolfsii* y *Pythium aphanidermatum*

Moisés Gilberto Yáñez Juárez
Felipe Ayala Tafoya[§]
Leopoldo Partida Ruvalcaba
Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz
Tirzo Paúl Godoy Angulo
Raymundo Medina López

Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, AP. 25. CP. 80000. Culiacán, Sinaloa, México. (moisesyj@uas.edu.mx; parpolo@yaooh.com.mx; teresadejesus@yaooh.com.mx; tirzopaul@hotmail.com; raymedinalop@hotmail.com).

[§]Autor para correspondencia: tafoya@uas.edu.mx.

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto *in vitro* del fosfito de potasio sobre el crecimiento radial del micelio, la producción de biomasa y la producción de esclerocios de *Athelia rolfsii* y de oosporas de *Pythium aphanidermatum*. Dosis de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 mL L⁻¹ de fosfito de potasio y un testigo absoluto (sin el fosfito de potasio) fueron evaluados utilizando medio de cultivo PDA y agua destilada. El crecimiento radial de micelio disminuyó debido al fosfito de potasio, por lo que al final de la evaluación y comparándolo con el control, el crecimiento radial de *P. aphanidermatum* disminuyó de 16.9 a 53.2% y de 15 a 21.3% para *A. rolfsii*. A las 96 h después de la siembra la producción de biomasa por *P. aphanidermatum* y *A. rolfsii*, disminuyó de 16.9 a 53.2% y 58.3 a 63.4%, respectivamente. Después de 72 h de la siembra, no se observó la formación de oosporas de *P. aphanidermatum* sobre agua destilada con fosfito de potasio, lo que sí ocurrió en el control después de 24 h. A los 22 días después de la siembra, *A. rolfsii* produjo un promedio de 30.2 esclerocios, mientras que en PDA con fosfito de potasio no formó esclerocios. Esto indica que el fosfito de potasio es una sustancia eficaz para reducir el crecimiento del micelio, la producción de biomasa, e inhibe la formación de oosporas de *P. aphanidermatum* y de esclerocios de *A. rolfsii*.

Palabras clave: crecimiento de micelio, formación de esclerocios, formación de oosporas, producción de biomasa.

Recibido: agosto de 2018

Aceptado: septiembre de 2018

La principal estrategia utilizada contra hongos que parasitan plantas cultivadas es el control químico; sin embargo, el uso indiscriminado de fungicidas convencionales contribuye en la contaminación ambiental, afecta la salud pública y disminuye la biodiversidad en los agroecosistemas (Zavaleta-Mejía, 1999) además, los actuales mercados de transacción de alimentos demandan productos agrícolas inocuos para los consumidores y provenientes de procesos nobles con el ambiente. Así, surge el interés por alternativas diferentes al control químico, una de ellas es el empleo de sales con la finalidad de conservar la sanidad en las plantas (Homma *et al.*, 1981).

Al respecto, los fosfitos son sales derivadas del ácido fosforoso, aprovechados en la agricultura como fuentes de nutrición o como alternativa para el control de enfermedades en los cultivos (Deliopoulos *et al.*, 2010). Los fosfitos como alternativa para el control de organismos parásitos han sido estudiados ampliamente y su eficacia se ha probado contra oomycetes (Monsalve *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012; Akinsanmi y Dreth, 2013), hongos (Amiri y Bompeix, 2011; Costa *et al.*, 2014; Yáñez *et al.*, 2014), bacterias (Lobato *et al.*, 2011; Monchiero *et al.*, 2015) y nematodos fitoparásitos (Oka *et al.*, 2007; Quintero y Castaño, 2012).

Los mecanismos involucrados en los efectos profilácticos de los fosfitos son diversos y se incluye la estimulación de los mecanismos de defensa en las plantas (Pilbeam *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2013) y acción directa sobre los fitoparásitos al restringir el crecimiento y producción de esporas (Cerioni *et al.*, 2013); sin embargo, existe diferencia interespecífica (Hofgaard *et al.*, 2010) e intraespecífica (Wilkinson *et al.*, 2001) en la susceptibilidad al ion fosfito, por todo lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto *in vitro* de fosfito de potasio sobre el crecimiento radial del micelio, producción de biomasa, producción de esclerocios de *Athelia rolfsii* y de oosporas de *Pythium aphanidermatum*.

Durante el periodo comprendido de octubre de 2016 a febrero de 2017 y mediante bioensayos establecidos en condiciones de laboratorio, con diseño experimental completamente al azar y diez repeticiones (una caja Petri por repetición), se evaluó el efecto *in vitro* de fosfito de potasio (FP) sobre el crecimiento radial (CR), producción de biomasa (PBM), producción de esclerocios en *Athelia rolfsii* y producción de oosporas en *Pythium aphanidermatum* (organismos obtenidos de la colección de hongos del laboratorio de hongos fitopatógenos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa). De manera individual se adicionaron diferentes dosis de FP: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 mL L⁻¹ (Fosfimax 40.05%, Adama) al medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Bioxon) después del proceso de esterilización.

Cada mezcla de PDA más FP se vació por separado en cajas Petri (20 mL por caja). Un cilindro (0.5 cm de diámetro) con crecimiento de cada organismo se depositó por separado al centro de las cajas Petri y se mantuvieron en condiciones de laboratorio (28 ±1.8 °C). El CR se determinó 36 horas después de la siembra (hds) para *P. aphanidermatum* y a las 72 hds para *A. rolfsii*. El efecto sobre la PBM se determinó haciendo crecer los organismos por 96 h, después de ese tiempo se separó del medio de cultivo, se depositó en papel filtro (Whatman, 1100) y se secó en estufa (80 °C) hasta obtener peso constante. El efecto sobre la producción de oosporas de *P. aphanidermatum* se determinó agregando los diferentes volúmenes de FP a agua destilada; cada dilución se vertió en cajas Petri, después se depositaron cuatro cilindros de PDA de 0.5 cm de diámetro con crecimiento del patógeno. Se realizaron observaciones al microscopio compuesto para determinar la formación de oosporas a 24, 48 y 72 h después de haber depositado el patógeno en las cajas.

El efecto sobre la producción de esclerocios de *A. rolfsii* se determinó haciendo crecer el organismo en PDA más FP y 22 días después de la siembra (dds) se contó la cantidad de esclerocios producidos. Cada ensayo se realizó en dos ocasiones y con los datos obtenidos de las variables estudiadas se hicieron análisis de varianza y comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y análisis de regresión lineal simple.

Ninguna de las concentraciones probadas de FP evitó el crecimiento de *P. aphanidermatum* y *A. rolfsii*; sin embargo, restringió de manera significativa ($p \leq 0.05$) el CR y la PBM de ambos organismos (Cuadro 1). La susceptibilidad de los microorganismos al ion fosfito fue reportada por Wong *et al.* (2009), quienes determinaron el efecto negativo del fosfito y el positivo del fosfato sobre el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*, cuando creció en medio de cultivo enriquecido con sales que contenían cada ion de manera individual.

Cuadro 1. Efecto de fosfito de potasio sobre el crecimiento radial de micelio y la producción de biomasa de *Pythium aphanidermatum* y *Athelia rolfsii*.

Tratamientos Fosfito de potasio (mL L ⁻¹)	Crecimiento radial de micelio (cm)		Producción de biomasa (mg)	
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Athelia rolfsii</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Athelia rolfsii</i>
0 (testigo)	8 a ¹	8 a	77 a	235 a
0.05	4.58 b	6.8 b	64 b	98 b
0.1	3.37 c	6.3 c	51 c	90 b
0.15	2.79 d	6.3 c	52 c	88 b
0.2	2.54 e	6.3 c	50 c	88 b
0.25	2.33 f	6.3 c	41 d	88 b
0.3	1.86 g	6.3 c	36 d	86 b

¹= medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$), según la prueba de Tukey. Cada cifra representa el promedio de diez repeticiones.

Con FP el CR de *P. aphanidermatum* (36 hds) fue inferior al observado en el medio de cultivo testigo, en 42.8, 57.9, 65.1, 68.3, 70.9 y 76.8% con 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 mL L⁻¹, respectivamente. La PBM se restringió significativamente ($p \leq 0.05$) por efecto del FP, de tal manera que en relación a la biomasa producida en el testigo (77 mg), ésta fue menor en 16.9, 33.8, 32.5, 25, 46.8 y 53.2% con las respectivas dosis anteriormente mencionadas. Además, no se observó formación de oosporas en presencia de FP (72 hds), en tanto que 24 hds se detectó abundante formación de oosporas en el testigo (sin FP).

A las 72 hds, el FP originó decremento significativo ($p \leq 0.05$) en el CR de *A. rolfsii*. La disminución fluctuó entre 15 y 21.3%, en comparación con el CR del hongo en medio de cultivo sin FP. La PBM resultó significativamente restringida ($p \leq 0.05$) con FP, de tal manera que en relación a la biomasa producida en el testigo (235 mg), ésta fue menor en 98, 61.7, 62.6, 62.6 y 63.4% con los respectivos 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 mL L⁻¹ de FP. Además, con FP en el medio de cultivo no se observó formación de esclerocios maduros (22 dds); sin embargo, en el medio de cultivo PDA sin FP, *A. rolfsii* formó 30.2 esclerocios en promedio.

Los resultados obtenidos en esta investigación, en relación a la susceptibilidad interespecífica a FP, son semejantes a los descritos previamente por Hofgaard *et al.* (2010), quienes reportaron restricción de 60, 80 y 90% en el CR del micelio de *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* y *Microdochium majus*, respectivamente. Asimismo, con los reportados por Lobato *et al.* (2010), ya que ellos reportaron que el grado de restricción del CR, como consecuencia del ion fosfito, lo determinó el organismo ensayado y la cantidad de fosfito agregado al medio de cultivo.

El análisis de regresión lineal simple entre las variables FP, CR y PBM en las dos especies de hongos indicó una relación negativa (Figura 1), de tal manera que las progresivas disminuciones del CR y PBM de *P. aphanidermatum* se explican en los respectivos 54.3 y 43.2% debido al efecto que ocasionaron los incrementos de las dosis de FP (Figura 1A y 1C). Mientras que para *A. rolfsii* se explican en 75.2 y 90.2%, respectivamente (Figura 1B y 1D). Estos resultados coinciden con Smillie *et al.* (1989), quienes determinaron que *P. cinnamomi*, *P. palmivora* y *P. nicotiana* son susceptibles a FP, explicando además que conforme se incrementó la concentración de fosfito en el medio de cultivo, disminuyó el peso de la biomasa producida por las tres especies de *Phytophthora*.

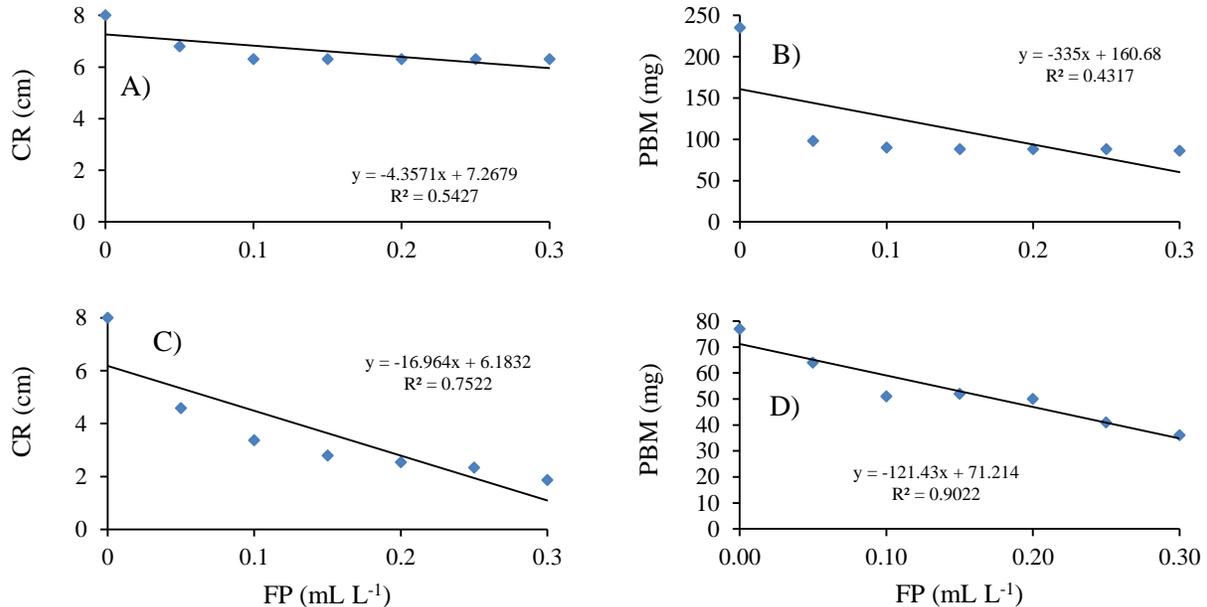


Figura 1. Asociación entre crecimiento radial de micelio (CR) y producción de biomasa (PBM) de *Pythium aphanidermatum* (A-B) o *Athelia rolfsii* (C-D) y concentración de fosfito de potasio (FP).

No obstante, que el crecimiento de *P. aphanidermatum* no fue inhibido por completo a las 24 hrs, 0.05 mL L⁻¹ de FP fueron suficientes para inhibir la formación de oosporas, en tanto que en el testigo se observó abundante formación de esas estructuras de reproducción. Estos resultados concuerdan con los reportados por Davis y Grant (1996) en cuanto a la producción de esporas en *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*; asimismo, con los publicados en relación a *Mycosphaerella fijiensis* (Mogollón y Castaño, 2012), *Peronospora sparsa* (Hukkanen *et al.*, 2008), *Phytophthora plurivora* (Dalio *et al.*, 2014) y *P. cinnamomi* (Wong *et al.*, 2009). En la especie *P. plurivora*, Dalio *et al.* (2014) también registraron disminución significativa del CR del micelio y la producción de zoosporas cuando se le cultivó en medio de cultivo PDA enriquecido con el ion fosfito.

El FP también originó resultados de restricción en el CR, PBM y evitó la formación de esclerocios en *A. rolfsii*, los cuales también concuerdan con los reportados en *Sclerotium cepivorum* por Ortega *et al.* (2011), quienes agregaron bicarbonato de potasio en el medio de cultivo PDA y observaron que con 50 mM disminuyó significativamente el crecimiento del micelio y se evitó la formación de esclerocios.

De acuerdo con King *et al.* (2010), el FP agregado al medio de cultivo inhibe la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas que constituyen la pared y el citoesqueleto de las células de *P. cinnamomi*, razón por la que la formación de micelio y estructuras reproductivas en los microorganismos se ven disminuidas cuando se hacen crecer en medios de cultivo mezclados con dicha sal.

Conclusiones

El fosfito de potasio fue eficaz para disminuir el crecimiento radial del micelio y la producción de biomasa en los organismos fitopatógenos, e impedir la producción de oosporas en *Pythium aphanidermatum* y de esclerocios de *Athelia rolfsii*.

Literatura citada

- Akinsanmi, O. A. and Drenth, A. 2013. Phosphite and metalaxyl redujevenate macadamia trees in decline caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Crop Protection*. 53(2):29-36.
- Amiri, A. and Bompeix, G. 2011. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. *Crop Protection*. 30(2):222-227.
- Cerioni, L.; Rapisarda, V. A.; Doctor, J.; Fikkert, S.; Ruiz, T.; Fassel, R. and Smilanick, J. L. 2013. Use of phosphite salts in laboratory and semicommercial tests to control citrus postharvest decay. *Plant Dis*. 97(2):201-212.
- Costa, B. H. G.; Resende, M. L. V. De; Ribeiro, P. M.; Mathioni, S. M.; Padua, M. S. and Da Silva, M. B. J. 2014. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by products of coffee and citrus industries. *J. Phytopathol*. 162(10):635-642.
- Dalio, R. J.; Fleischmann, F.; Humez, M. and Osswald, W. 2014. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. *PloS ONE*. 9(1):e87860.
- Davis, A. J. and Grant, G. R. 1996. The effect of phosphonate on the sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Australasian Plant Pathol*. 25(1):31-35.
- Deliopoulos, T.; Kettlewell, P. S. and Hare, M. C. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection*. 29(10):1059-1075.
- Hofgaard, I. S.; Ergon, A.; Henriksen, B. and Tronsmo, A. M. 2010. The effect of potential resistance inducers on development of *Microdochium majus* and *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Eur. J. Plant Pathol*. 128(2):269-281.
- Homma, Y.; Arimoto, T. and Misato, T. 1981. Effect of sodium bicarbonate on each growth stage of cucumber powdery mildew fungus (*Spharotheca fuliginea*) in its life cycle. *J. Pesticide Sci*. 6(2):201-209.
- Hukkanen, A.; Kostamo, K.; Kärenlampi, S. and Kokko, H. 2008. Impact of agrochemicals on *Peronospora sparsa* and phenolic profiles in three *Rubus arcticus* cultivars. *J. Agric. Food Chem*. 56(3):1008-1016.

- King, M.; Reeve, W.; Van der Hoek, M. B.; Williams, N.; McComb, J.; O'Brien, P. A. and Hardy, G. E. S. J. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Gen. Genomics*. 284(6):425-435.
- Lim, S.; Borza, T.; Peters, R. D.; Coffin, R. H.; Al-Mughrabi, K. I.; Pinto, D. M. and Wang-Pruski, G. 2013. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. *J. Proteomics*. 93(1):207-223.
- Lobato, M. C.; Machinandierena, M. F.; Tambascio, C.; Dosio, G. A. A.; Caldiz, D. O.; Dalio, G. R.; Andreu, A. B. and Olivieri, F. P. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 130(2):155-163.
- 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. Protec.* 117(3):102-109.
- Mogollón, A. M. y Castaño, J. 2012. Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano Dominico-Hartón (*Musa balbisina* AAB) contra *Mycosphaerella* spp. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 35(137):463-471.
- Monchiero, M.; Lodovica, M. G.; Pugliese, M.; Spadaro, D. and Garibaldi, A. 2015. Efficacy of different chemical and biological products in the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit. *Australasian Plant Pathol.* 44(1):13-23.
- Monsalve, V.; Viteri, R. S. E.; Rubio, C. N. J. and Tovar, D. F. 2012. Efectos del fosfito de potasio en combinación con el fungicida metalaxyl+mancozeb en el control de mildew velloso (*Peronospora destructor* Berk) en cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). *Rev. Fac. Nacional Agron.* 65(1):6317-6325.
- Oka, Y.; Tkachi, N. and Mor, M. 2007. Phosphite inhibits development of the nematodes *Heterodera avenae* and *Meloidogyne marylandi* in cereals. *Phytopathology*. 97(4):396-404.
- Ortega, A. B. L.; Alarcón, A. and Ferrera, C. R. 2011. Effect of potassium bicarbonate on fungal growth and sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and its interaction with *Trichoderma*. *Rev. Mex. Micol.* 33(1):53-61.
- Pilbeam, R. A.; Howard, K.; Shearer, B. L. and Hardy, G. E. S. J. 2011. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees*. N25(6):1121-1131.
- Pinto, K. M.; Do Nascimento, C.; Gomes, E. C.; Da Silva, H. F. and Miranda, J. 2012. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. *Eur. J. Plant Pathol.* 134(4):745-754.
- Quintero, V. C. y Castaño, Z. J. 2012. Evaluación de inductores de resistencia para el manejo de nematodos fitoparásitos en plántulas de plátano. *Rev. Academia Colomb. Cienc. Exactas Físicas Natur.* 36(141):575-586.
- Smillie, R.; Grant, B. R. and Guest, D. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology*. 79(9):921-926.
- Wilkinson, C. J.; Holmes, J. M.; Tynan, K. M.; Colquhoun, I. J.; McComb, J. A.; Hardy, G. E. S. J. and Dell, B. 2001. Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. *Australasian Plant Pathol.* 30(4):343-351.
- Wong, M. A.; McComb, J. A.; Hardy, G. E. S. J. and O'Brien, P. A. 2009. Phosphite induces expression of a putative proteophosphoglycan gene in *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathol.* 38(3):235-241.

- Yáñez, J. M. G.; Ayala, T. F.; Partida, R. L.; Velázquez, A. T.; Godoy, A. T. P. y Días, V. T. 2014. Efecto de bicarbonatos en el control de cenicilla (*Oidium* sp.) en pepino (*Cucumis sativus* L.). Rev. Mex. Cienc. Agríc. 5(6):991-1000.
- Zavaleta-Mejía, E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra Latinoam. 17(3):201-207.