



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**Instituto de Investigaciones Agropecuarias
y Forestales**

**Programa Institucional de Doctorado en Ciencias
Biológicas**

**“Especies de *Phytophthora* en plantas ornamentales
cultivadas en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y
Morelos”**

TESIS

Para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN:

Ciencias Agropecuarias, Forestales y Ambientales

PRESENTA

M.C. Alejandro Soto Plancarte

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía

CO-DIRECTOR: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Martha Elena Pedraza Santos

Dra. Yolanda Leticia Fernández Pavía

Dr. Luis López Pérez

Morelia, Michoacán. Noviembre de 2019

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía. Se agradece el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica, UMSNH. También se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) becario No. 254151.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias a la generosa colaboración de muchas personas y seres vivos a quienes expreso mis más sinceros agradecimientos.

*Extiendo mi más sincero agradecimiento a la Dra. Dra. **Sylvia Patricia Fernández Pavía** directora de la presente tesis, por su tiempo, sus sugerencias, valiosos y buenos consejos, por encaminarme en el camino de la ciencia y sobre todo por su apoyo, conocimientos, orientación y valiosas aportaciones para la terminación de la misma. Le agradezco por ayudarme en mi desarrollo humano.*

*Expreso mi más grande y sincera gratitud a **C. André Lévesque** y **Tara Rintoul** del departamento de Agriculture and Agri-Food Canada por su apoyo en este trabajo de tesis, su tiempo, aportaciones, por los conocimientos y experiencias compartidas.*

*Al **Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado**, por sus aportaciones, recomendaciones, conocimientos y sugerencias para la conclusión de este trabajo de tesis.*

A los integrantes del comité tutorial : Dra. Martha Elena Pedraza Santos, Dra. Yolanda Leticia Fernández Pavía, Dr. Luis López Pérez quienes con sus valiosas aportaciones, comentarios, correcciones, consejos, tiempo, apoyo y buenas sugerencias se perfecciono la calidad de este trabajo de tesis.

A mis seres queridos. A mis compañeros (as) del laboratorio A mis amigos por brindarme su amistad y apoyo. A mi amigo Isai Betancourt Resendes, por brindarme su amistad y compartir buenos y malos momentos conmigo, por su trabajo realizado, comentarios y ayuda.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), donde me forme profesionalmente, les doy mi mas sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

Dedico etsta tesis a todos los alumnos del Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), a quienes no se les reconoció o agradecio por sus descubrimientos, experimentos, trabajo ypreciado tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL	14
GENERAL ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
Enfermedades causadas por <i>Phytophthora</i>	19
Especies de <i>Phytophthora</i> detectadas en tejido vegetal en viveros	20
Especies de <i>Phytophthora</i> detectadas en suelo o sustrato de siembra	20
Especies de <i>Phytophthora</i> detectadas en viveros de México	21
Tipos de compatibilidad de especies de <i>Phytophthora</i> detectadas <i>in planta</i> en México	21
<i>Phytophythium</i>	22
CAPÍTULO I	23
DIVERSIDAD DE ESPECIES DE <i>Phytophthora</i> EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES EN EL CENTRO DE MÉXICO	23
RESUMEN	23
ABSTRACT	24
INTRODUCCIÓN	25
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Aislamiento	30

Determinación del tipo de compatibilidad y características de estructuras sexuales	32
Prueba de crecimiento a 35 °C	32
Patrones de crecimiento	33
Tasa de crecimiento	33
Pruebas de patogenicidad de los aislados de <i>Phytophthora</i> spp.	33
Inoculación de <i>P. capsici</i> en plantas de chile pimiento morrón	33
Inoculación de plantas de <i>Petunia</i> con <i>Phytophthora cactorum</i>	35
Inoculación de plantas de <i>Rhododendron</i> sp. con <i>P. cinnamomi</i>	36
Inoculación de plantas de <i>Sempervivum</i> sp. con <i>P. tropicalis</i>	37
Reaislamiento del patógeno	37
Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	38
RESULTADOS	41
Producción de esporangios	43
Caracterización morfológica de los aislados	44
Aislados de <i>Phytophthora capsici</i> que producen clamidosporas	50
Caracterización de esporangios	52
Tamaño	52
Tipos de compatibilidad (TC)	53
Tipos de compatibilidad de <i>Phytophthora</i> en un mismo vivero	56
Crecimiento a 35 °C	57
Patrón de crecimiento de la colonia	58
Tasa de crecimiento de la colonia	59
Pruebas de patogenicidad de aislados de <i>Phytophthora</i> spp.	60
Patogenicidad de <i>P. capsici</i> en chile pimiento morrón	60

Patogenicidad de <i>Phytophthora cactorum</i> en <i>Petunia</i> x híbrida sp.	61
Patogenicidad de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en <i>Rhododendron</i> sp.	62
Patogenicidad de <i>P. tropicalis</i> en <i>Sempervivum</i> sp.	62
Identificación molecular de especies de <i>Phytophthora</i>	63
Especies de <i>Phytophthora</i> detectadas por estación del año 2014 a 2016	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	73
LITERATURA CITADA	74
CUADROS	
Cuadro 1. Aislados obtenidos de tejido de las plantas de vivero con síntomas mediante dos protocolos/tratamientos	42
Cuadro 2. Aislados obtenidos de suelo o sustrato de siembra de plantas de vivero con síntomas, utilizando como tejido trampa hojas de azalea	43
Cuadro 3. Aislados de <i>Phytophthora</i> que produjeron esporangios con agua destilada estéril y con extracto de suelo no estéril	44
Cuadro 4. Morfología de aislados de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytophythium litorale</i> obtenidos de viveros en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos	45
Cuadro 5. Aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de tres especies de <i>Capsicum</i> que formaron clamidosporas en diferentes medios	50

Cuadro 6. Medias y rangos del tamaño (largo y ancho) de esporangios de aislados de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium litorale</i>	52
Cuadro 7. Tipos de compatibilidad, medias y rangos del tamaño (largo y ancho) de oosporas de los aislados de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium litorale</i> obtenidos de plantas ornamentales	54
Cuadro 8. Tipos de compatibilidad de <i>Phytophthora</i> detectados en un mismo vivero	57
Cuadro 9. Crecimiento de los aislados de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium litorale</i> a 35 °C	57
Cuadro 10. Forma de la colonia en medio PDA y AHM crecidas durante 8 días	58
Cuadro 11. Especies de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium</i> aisladas de plantas ornamentales con síntomas de marchitez	64
FIGURAS	
Figura 1. Plantas de chile pimiento morrón al momento de la inoculación con aislados de <i>P. capsici</i> obtenidos de <i>Capsicum annuum</i> de vivero	35
Figura 2. Plantas sanas de <i>Petunia</i> x híbrida sp. inoculadas con el aislado homotálico LEV6745 de <i>Phytophthora cactorum</i>	36
Figura 3. Plantas de <i>Rhododendron</i> sp. inoculadas con los aislados LEV6688, LEV6702, LEV6711, LEV6712, LEV6720 y LEV6725 de <i>P. cinnamomi</i>	36
Figura 4. Plantas de <i>Sempervivum</i> sp. inoculadas con el aislado LEV6743 de <i>Phytophthora tropicalis</i> de Cuautla, Morelos	37

Figura 5. Características morfológicas de diferentes especies de <i>Phytophthora</i> . A, G y M. Clamidosporas; N. Hinchamiento; B. Oospora aplerótica con anteridio anfígino; H. Oospora plerótica con anteridio paráfino; C y I. Hinchamientos; O. Hifas cenocíticas; D y E. Agregados de hifas; F. Esporangio no papilado; J. Esporangios en simpodio simple; K. Esporangio germinando dando origen a otro esporangio; P. Esporangio germinando formando hifas; L. Esporangio papilado; Q. Hinchamientos de hifas globosos. R. Hinchamientos de hifas de formas distorsionadas	48
Figura 6. Características morfológicas de <i>Phytophthora drechsleri</i> . A. Esporangios en racimo surgiendo de la misma hifa (simpodio simple cerrado), no papilados; B. Esporangios dimórficos ovoides a obpiriformes surgiendo de la misma hifa; C. Esporangio con la parte apical en forma de yunque; D. Esporangio con dos tubos germinativos; E. Esporangio; F. Hinchamiento en la base del esporangio; G. Esporangio dando origen a otro esporangio; H. Esporangio germinando; I. Proliferación interna	49
Figura 7. Estructuras de <i>Phytophthora capsici</i> en medio agua agar. A y B. Clamidosporas terminales LEV6738; C. Clamidospora, esporangio y zoosporas	51
Figura 8. Estructuras de <i>Phytophthora capsici</i> en medio agua agar. A. Agregados de hifas; B. Hifas enrolladas	51
Figura 9. Plantas con síntomas de marchitez infectadas por <i>Phytophthora</i> en un mismo vivero. A. <i>Catharanthus roseus</i> ; B. <i>Ruta graveolens</i> ; C. <i>Capsicum annuum</i>	56

Figura 10. Tasa de crecimiento (mm) de 15 aislados de <i>Phytophthora</i> en medio HMA durante 96 horas	59
Figura 11. Tasa de crecimiento (mm) de 14 aislados de <i>Phytophthora</i> en medio PDA durante 96 horas	59
Figura 12. Tasa de crecimiento (mm) de 15 aislados de <i>Phytophthora</i> en medio V8 durante 96 horas	60
Figura 13. Plantas de chile pimiento morrón con síntomas de marchitez tres días después de la inoculación con aislados de <i>P. capsici</i> obtenidos de <i>Capsicum annuum</i> de vivero. En el extremo derecho se muestran las plantas control sin inocular	61
Figura 14. Plantas de <i>Petunia</i> x híbrida sp. inoculadas con <i>Phytophthora cactorum</i> , con síntomas de marchitez	62
Figura 15. Síntomas de pudrición en plantas de <i>Sempervivum</i> sp. ocasionados por <i>Phytophthora tropicalis</i>	63
Figura 16. Proporción de especies de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium</i> detectadas en viveros de la Ciudad de Mexico, Michoacán y Morelos	65
Figura 17. Frecuencia de aislados de <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium litorale</i> obtenidos en las cuatro estaciones del año	66
CAPITULO II	77
TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE <i>Phytophthora capsici</i> , <i>P. drechsleri</i> Y <i>P. cinnamomi</i> COEXISTEN EN PLANTAS ORNAMENTALES DE VIVERO	77
RESUMEN	77
ABSTRACT	79

INTRODUCCIÓN	80
MATERIALES Y MÉTODOS	82
Aislamiento y caracterización morfológica	82
Tipos de compatibilidad e inoculaciones	83
Producción de oosporas <i>in planta</i>	83
Extracción de ADN	84
Amplificación de ADN	84
RESULTADOS	86
DISCUSIÓN	92
CONCLUSIONES	93
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	94
LITERATURA CITADA	95
FIGURAS	
Figura 1. Análisis filogenético de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana derivado de la concatenación de los genes ITS, β tubulina y CO1 de <i>Phytophthora capsici</i> y <i>P. drechsleri</i> con <i>Phytophthora cryptogea</i> como grupo externo. Se muestran los valores bootstrap y probabilidades posteriores del análisis de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana en porcentajes en los puntos de las ramas, respectivamente. La barra de escala indica 0.02 substituciones por sitio por rama	87
Figura 2. Plantas inoculadas. A. Primer día de la inoculación; B. Síntomas de marchitez, pérdida de turgencia, defoliación y necrosis en la base del tallo en plantas de <i>capsicum annuum</i> inoculadas con	89

ambos tipos de compatibilidad A1 y A2 de <i>P. capsici</i> en la misma planta	
Figura 3. Oospora de <i>Phytophthora capsici</i> formada <i>in planta</i> en tejido de raíz de <i>Capsicum annuum</i> coinoculados con aislados de tipo de compatibilidad A1 y A2	90
Figura 4. Síntomas de marchitez, pérdida de turgencia y necrosis a los 10 días después de la inoculación en plantas de <i>Petunia</i> x híbrida inoculadas con ambos tipos de compatibilidad A1 (PVM-140.1) y A2 (PVM-140.2) de <i>P. drechsleri</i> en la misma planta	90
Figura 5. Oospora de <i>Phytophthora drechsleri</i> formada <i>in planta</i> en tejido de raíz y tallo de <i>Petunia</i> x híbrida coinoculados con aislados de tipo de compatibilidad A1 y A2	91
CAPITULO III	97
FILOGENIA Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS COMPLEJOS <i>P. capsici</i> Y <i>P. cryptogea</i> EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES EN EL CENTRO DE MÉXICO	97
RESUMEN	97
ABSTRACT	99
INTRODUCCIÓN	101
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	104
HIPÓTESIS	104
OBJETIVO GENERAL	105
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	105
MATERIALES Y MÉTODOS	106

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	106
Análisis filogenéticos concatenados del complejo <i>Phytophthora cryptogea</i> y <i>P. capsici</i>	107
Redes de haplotipos	109
RESULTADOS	110
Árboles filogenéticos del complejo <i>Phytophthora cryptogea</i> y <i>P. capsici</i>	110
Relaciones filogenéticas de especies del complejo <i>P. cryptogea</i>	114
Relaciones filogenéticas del complejo <i>Phytophthora capsici</i>	115
Filogenia de aislados del complejo <i>Phytophthora capsici</i> que producen clamidosporas	116
Heterocigocis en aislados de <i>P. capsici</i>	118
Redes de haplotipos del complejo <i>P. capsici</i>	119
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	129
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	130
LITERATURA CITADA	131
FIGURAS	
Figura 1. Análisis filogenético multilocus de inferencia Bayesiana construido con secuencias concatenadas (ITS + CO1 + β -tubulina) de tres marcadores genéticos. Los números en los nodos representan las probabilidades posteriores en cada clado. El tamaño de las ramas y topología se muestran. Secuencias de los Ex-Type (tipo) de las especies de cada complejo fueron incluidas (clado 2a y clado 8a). Las secuencias tipo incluidas (Ex-Type) del	111

complejo de especies *P. cryptogea* (*Phytophthora cryptogea* CBS 113.19, CBS 114074, *P. erythroseptica* CBS 111343, *P. medicaginis* CBS 119902, *P. trifolii* CBS 117687 y *P. drechsleri* CBS292.35) fueron extraídas de q-bank (<http://www.q-bank.eu>) de ITS, β tubulina y CO1. Las secuencias tipo del complejo de especies *P. capsici* (*P. capsici* CBS 128.23 y RLW2002.MS8 (NCBI), *P. glovera* S_2 (NCBI), *P. tropicalis* CBS 434.91 y AB211 (NCBI)) también fueron obtenidas de q-bank para los mismos genes. Las secuencias tipo más las del presente estudio fueron concatenadas para los análisis filogenéticos multilocus. Los aislados obtenidos en este estudio del clado 8a se muestran en color azul y color verde. La unidad de escala de la barra indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio

Figura 2. Análisis filogenético multiloci de máxima verosimilitud 113
construido con secuencias concatenadas (ITS + CO1 + β -tubulina) de tres marcadores genéticos. Los números en los nodos representan el porcentaje de soporte de bootstrap en cada clado. El tamaño de las ramas y topología se muestran. Secuencias de los Ex-Type (tipo) de las especies de cada complejo fueron incluidas (clado 2a y clado 8a). Las secuencias tipo incluidas (Ex-Type) del complejo de especies *P. cryptogea* (*Phytophthora cryptogea* CBS 113.19, CBS 114074, *P. erythroseptica* CBS 111343, *P. medicaginis* CBS 119902, *P. trifolii* CBS 117687 y *P. drechsleri* CBS292.35) fueron obtenidas de q-bank (<http://www.q-bank.eu>) de ITS, β -tubulina y CO1. Las secuencias tipo del complejo de especies

P. capsici (*P. capsici* CBS 128.23 y RLW2002.MS8 (NCBI), *P. glovera* S_2 (NCBI), *P. tropicalis* CBS 434.91 y AB211 (NCBI)) también fueron obtenidas de q-bank para los mismos genes. Las secuencias tipo más las del presente estudio fueron concatenadas para los análisis filogenéticos multiloci. Los aislados obtenidos en este estudio del clado 8a se muestran en color azul y color verde. La unidad de escala de la barra indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio

Figura 3. Aislados de *Phytophthora* que producen clamidosporas. 117

Árbol filogenético con 1000 de bootstrap basado en la región ITS rDNA de especies de *Phytophthora* del clado 2b. Las especies de *Phytophthora* de este estudio se muestran en color rojo. *P. tropicalis*, *P. menzei*, y *P. siskiyouensis* en el sub-clado 2 son los grupos externos. Las marcadas en color blanco son especímenes de los Ex-types. La unidad de escala de la barra: Número de sustituciones de nucleotidos por sitio

Figura 4. Electroferogramas del gen nuclear β -tubulina que ilustra un sitio heterocigoto de *Phytophthora capsici* en la posición 287 118

Figura 5. Electroferogramas de la región ITS que ilustra un sitio heterocigoto de *P. capsici* en la posición 491 119

Figura 6. Red de haplotipos del complejo de especies *Phytophthora capsici* con la subunidad pequeña de la región ITS. Los puntos en las líneas azules indican posibles pasos mutacionales. Los círculos representan tipos de secuencia; los números dentro de los círculos son proporcionales al número de aislados; localidades de los 120

aislados: Te=Temixco, Mo=Morelia, Cv=Cuernavaca,
 Ta=Tarímbaro, Co=Cuemanco, Ct=Cuautla; nombre de las
 especies de *Phytophthora* ex-type: ca=*Phytophthora capsici*,
 me=*P. medicaginis*, tr=*P. tropicalis*, gl=*P. glovera*

Figura 7. Red de haplotipos del complejo de especies *Phytophthora* 121

capsici con el gen nuclear β -tubulina. Los puntos en las líneas
 azules indican posibles pasos mutacionales. Los círculos
 representan tipos de secuencia; los números dentro de los círculos

son proporcionales al número de aislados; localidades de los

aislados: Te=Temixco, Mo=Morelia, Cv=Cuernavaca,

Ta=Tarímbaro, Co=Cuemanco, Ct=Cuautla; nombre de las

especies de *Phytophthora* ex-type: ca=*Phytophthora capsici*,

me=*P. medicaginis*, tr=*P. tropicalis*, gl=*P. glovera*

Figura 8. Red de haplotipos del complejo de especies *Phytophthora* 122

capsici con el gen mitocondrial CO1. Los puntos en las líneas azules

indican posibles pasos mutacionales; Los círculos representan tipos

de secuencia; los números dentro de los círculos son proporcionales

al número de aislados; localidades de los aislados: Te=Temixco,

Mo=Morelia, Cv=Cuernavaca, Ta=Tarímbaro, Co=Cuemanco,

Ct=Cuautla; nombre de las especies de *Phytophthora* ex-type:

ca=*Phytophthora capsici*, me=*P. medicaginis*, tr=*P. tropicalis*, gl=*P.*

glovera

DISCUSIÓN GENERAL 134

CONCLUSIONES GENERALES 142

LITERATURA CITADA GENERAL 144

ANEXO	153
LOGROS ACADÉMICOS	161

RESUMEN GENERAL

El género *Phytophthora* es uno de los patógenos de plantas más destructivos en el mundo. Este género afecta un amplio rango de especies de plantas hospedantes con valor económico, tanto angiospermas como gimnospermas. Muchas especies de *Phytophthora* han sido reportadas como invasivas y su introducción primordialmente es a través de viveros. Algunas especies de *Phytophthora* son homotáticas, mientras que otras son heterotáticas y requieren la presencia de tipos de compatibilidad opuestos (A1 y A2) para formar oosporas. Las enfermedades causadas por *Phytophthora* son uno de los principales problemas en viveros de los cinco continentes. Este género afecta todas las etapas del ciclo de producción de plantas originando grandes pérdidas económicas. El objetivo de esta investigación fue detectar e identificar especies de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Se obtuvieron 50 aislados de *Phytophthora* y uno de *Phytopythium* en 29 viveros de plantas ornamentales analizados. Se llevó a cabo un análisis morfológico y molecular (ITS, β tubulina, y CO1) de los aislados. Se realizaron análisis filogenéticos y redes de haplotipos con las secuencias de ADN de los genes. Con base en las características morfológicas y moleculares los aislados fueron identificados como *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. pseudocryptogea* (syn. *kelmania*), *P. tropicalis*, y *Phytopythium litorale*. Los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de *P. capsici* y *P. drechsleri* se encontraron simultáneamente dentro de viveros. El mayor número de especies detectadas pertenecen al complejo *P. capsici* y *P. cryptogea*. Los datos filogenéticos y redes de haplotipos indican que *Phytophthora capsici* presenta variación intraespecífica y *P. tropicalis* es

monofilética. Los aislados de *P. drechsleri* forman un grupo monofilético con bajos niveles de diversidad intraespecífica, mientras que *P. cryptogea* presenta más diversidad formando diferentes grupos taxonómicos. Se detectó la presencia de varios haplotipos compartidos entre aislados de *Phytophthora capsici* en viveros de plantas ornamentales en México, lo cual tendrá repercusiones futuras, como la hibridación y diseminación de especies a diferentes regiones del país si no se realiza un manejo adecuado en los viveros.

Palabras clave: oomicetes, patógenos, híbridos, filogenia, coexistencia.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Phytophthora* is one of the most destructive plant pathogens in the world. This genus affects a wide range of host plants species of important economic value, angiosperms as well as gymnosperms. Many species of *Phytophthora*, have been reported as invasive and their introduction is primarily through nurseries. Some species of *Phytophthora* are homothallic, while others are heterothallic and require the presence of opposite mating types (A1 and A2) to form oospores. The diseases caused by *Phytophthora* are one of the main problems in nurseries of the five continents. This genus affects all plant production stages causing great economic losses. The aim of this research was to detect and identify *Phytophthora* species in nurseries of ornamental plants in Mexico city and the states of Michocan and Morelos. Fifty isolates of *Phytophthora* and one *Phytopythium* were obtained from 29 nurseries of ornamental plants analyzed. A morphological and molecular analysis of the (ITS region, β tubulin, and CO1) of the isolates was performed. Phylogenetic analysis and haplotype networks were performed with the DNA sequences of the genes. Based on the morphological and molecular characteristics, the isolates were identified as *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. pseudocryptogea* (syn. *Kelmania*), *P. tropicalis*, and *Phytopythium litorale*. Mating types A1 and A2 of *P. capsici* and *P. drechsleri* occur simultaneously within nurseries. The largest number of species detected belong to the *P. capsici* and *P. cryptogea* complex. Phylogenetic data and haplotype networks indicate that *Phytophthora capsici* presents intraspecific variation and *P. tropicalis* is monophyletic. The isolates of *P. drechsleri* form a monophyletic group with low levels of intraspecific diversity, while *P. cryptogea*

presents more diversity forming different taxonomic groups. The presence of several haplotypes shared among *Phytophthora capsici* isolates was detected in nurseries of ornamental plants in Mexico, which will have repercussions in the future, such as the hybridization and dissemination of species to different regions of the country if proper management is not carried out in the nurseries.

Key words: Oomycetes, pathogens, hybrids, phylogeny, coexistence.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora es un patógeno común causante de la muerte de un amplio rango de especies de plantas en México (Fernández-Pavía et al., 2013) y el mundo (Erwin y Ribeiro 1996). *Phytophthora*, el destructor de plantas (del griego “*phyton*”, planta y “*phthora*”, destrucción), es un oomicete patógeno hemibiotrófico de gran importancia en cultivos agrícolas, forestales, ecosistemas naturales, seminaturales, hortícolas y en viveros (Erwin y Ribeiro 1996, Hansen et al., 2012, Jung et al., 2016, Pérez-Sierra et al., 2012, Lamour 2013). Los oomicetes o mohos de agua son eucariontes clasificados dentro del reino Stramenipila, son organismos microscópicos filamentosos mas cercanamente relacionados con las algas café y las diatomeas. Los oomicetes se reproducen tanto de manera sexual como asexual y se alimentan absorbiendo los nutrientes del sustrato que colonizan de manera saprófita y principalmente patogénicamente. Estos organismos, se diferencian de los hongos verdaderos por su pared celular compuesta de celulosa y beta glucanos, sus hifas cenocíticas, micelio hialino y ciclo de vida diploide (Abad et al., 2019, Kamoun et al., 2015, Lamour 2013). Las especies de *Phytophthora* producen diferentes tipos de propágulos como son esporangios, zoosporas, clamidosporas y oosporas mediante los cuales se dispersan a cortas o grandes distancias por agua principalmente (de riego o lluvia), suelo, o por movimiento de material vegetal infectado, causando enfermedades importantes en viveros de plantas (Erwin y Ribeiro 1996, Kamoun et al., 2015, Jung et al., 2016). Algunas de las especies de este género causan importantes pérdidas económicas en un amplio rango de especies de plantas a nivel mundial entre ellas está *P. austrocedri*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. infestans*, *P. kernoviae*, *P. quercina* y *P. ramorum*

(Abad et al., 2019, Burgess et al., 2017, Kamoun et al., 2015, Lamour et al., 2012, Prospero y Cleary 2017, Roy y Grünwald 2014, Turner 2005). En la última década el número de especies de *Phytophthora* se ha incrementado considerablemente y nuevas especies han sido descubiertas debido a las investigaciones realizadas en ecosistemas no explorados previamente (Brazee et al. 2017, Hansen et al. 2012, Hong et al., 2012, Jung et al., 2017, Reeser et al., 2013, Yang et al. 2016, Yang et al. 2014). En 1996, el número de especies de *Phytophthora* descritas formalmente era de aproximadamente 58 (Erwin y Ribeiro 1996), actualmente el número de especies formalmente descritas asciende a 161 (Abad et al., 2019).

Enfermedades causadas por *Phytophthora*

Las especies de *Phytophthora* causan marchitez, pudrición de raíces, tallo, corona y cuello de la planta, tizón de la hoja y tallo, pudrición de semillas, plántulas, tubérculos y frutos, canchros y muerte regresiva, causando cuantiosas pérdidas económicas en algunas partes del mundo (Erwin y Ribeiro 1996). *Phytophthora* es uno de los patógenos de plantas más estudiados en la actualidad, por las enfermedades que ocasiona y el impacto económico que causa. Las enfermedades causadas por *Phytophthora* son uno de los principales problemas fitosanitarios en viveros a nivel mundial. La dispersión generalizada de especies de *Phytophthora* en viveros de plantas nativas demuestra los riesgos potenciales asociados con la plantación a partir de viveros infestados hacia áreas silvestres y jardines (Rooney-Latham et al., 2019).

Especies de *Phytophthora* detectadas en tejido vegetal en viveros

Los reportes de *Phytophthora* en tejido vegetal son los que predominan en la literatura científica. Desde 1980 más de 30 especies han sido reportadas en el mundo en viveros ornamentales. En Australia se han detectado *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri* y *P. nicotianae* (Hardy y Sivasithamparam 1988); en viveros de Estados Unidos de América (E.U.A) han sido detectadas *P. capsici*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae* y *P. tropicalis* (Lamour et al., 2003, Warfield et al., 2008, Olson y Benson 2011, Schwingle et al., 2007, Yakabe et al., 2009); en España *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. kelmmania*, *P. nicotianae* y *P. tropicalis* (Moralejo et al., 2009, Pérez-Sierra 2012); en Italia *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri* y *P. nicotianae* (Cacciola et al., 2008, Prigigallo et al., 2015); en Reino Unido *P. cactorum*, *P. cinnamomi* y *P. cryptogea*, (Denton et al., 2008); en República Checa *P. cactorum* y *P. cinnamomi* (Cerny et al., 2011), y en Sudáfrica *P. cryptogea* (McLeod y Coertze 2007).

Especies de *Phytophthora* detectadas en suelo o sustrato de siembra

Los estudios para detectar especies de *Phytophthora* en suelo o sustrato de siembra son escasos. Sin embargo, en España se han detectado *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae* y *P. plurivora* (Dart et al., 2007, Moralejo et al., 2009, Parke et al., 2014). Mientras que en E.U.A. se han detectado *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. drechsleri*, *P. heveae*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. ramorum* y *P. tropicalis* (Adams 2008, Hendrix et al., 1971, Dart et al., 2007, Graham et al., 1998, Dart et al., 2007, Blair et al., 2008, Zitko et al., 1991, Hong et al., 2006). En Francia también se detectaron en suelo *P. alni*

subsp. *alni*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. europea*, *P. gonapodyides*, *P. humicola*, *P. ilicis*, *P. megasperma*, *P. pseudosyringae*, *P. psychrophila*, *P. quercina* y *P. syringae* (loos et al., 2006). *P. cambivora* y *P. cinnamomi* en el Reino Unido (Brasier y Kirk 2004, loos et al., 2006), en Australia *P. cryptogea* y *P. inundata* (Liew et al., 1998, Stukely et al., 2007); y *P. uliginosa* en Alemania (Blair et al., 2008).

Especies de *Phytophthora* detectadas en viveros de México

Las especies de *Phytophthora* reportadas en viveros de producción en México son escasas. Entre los estudios que se han realizado en México sobre especies de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales se encuentra el de Díaz-Celaya (2011) quien reportó la presencia de *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae* y *P. tropicalis*. Se ha reportado también a *P. tropicalis* causando marchitez en *Cyclamen persicum* en Texcoco, Estado de Mexico (Leyva-Mir et al., 2016), *P. nicotianae* causando tizón en *Catharantus roseus* en Sinaloa (Álvarez-Rodríguez et al., 2013), *P. drechsleri* en *Gerbera jamesonii* (Romero-Cova y Solís-Aragón 1996) y en *Capsicum annuum* (Mills et al., 1991) y *P. cryptogea* en *Crhysanthemum* spp. (Romero-Cova y Solís-Aragon 1996).

Tipos de compatibilidad de especies de *Phytophthora* detectadas *in planta* en México

El aislamiento de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* ha sido reportado en una misma en planta de un cultivo de chile pimiento morrón en un campo agrícola de Chihuahua, México (Sánchez-Gurrola et al., 2019), pero no existe información de ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de la misma

especie de *Phytophthora in planta* en viveros. En México, uno de los patógenos de raíz más importantes es *P. capsici*, que es un patógeno altamente destructivo en plantas de Chile. La presencia de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* en el mismo vivero en diferentes hospedantes se ha detectado en estudios previos realizados en nuestro laboratorio en México (datos no publicados). Sin embargo, la presencia de ambos tipos de compatibilidad de estas especies en el mismo hospedante en viveros ornamentales no ha sido documentada.

Phytopythium

El género *Phytopythium* fue descrito recientemente (Bala et al., 2010). Este género anteriormente clasificado en el clado K de *Pythium* (Lévesque y De Cook, 2004) corresponde a *Phytopythium*. *Phytopythium* pertenece a la familia Pythiaceae, orden peronosporales. Este género presenta una morfología intermedia entre *Phytophthora* y *Pythium*. La diferencia radica en la presencia de anteridios lobados o cilíndricos, esporangios de globosos a ovoides y con proliferación interna como en *Phytophthora* y presentan papila, la descarga de las zoosporas es parecida a la de *Pythium*. Los análisis filogenéticos de inferencia Bayesiana y de máxima verosimilitud de la sub-unidad larga (LSU, por sus siglas en inglés) y sub-unidad pequeña (SSU) del ADN nuclear ribosomal, mitocondrial (CO1) y análisis estadísticos por pares soportan robustamente a *Phytopythium* como un género filogenético (De Cook et al., 2015).

CAPÍTULO I

DIVERSIDAD DE ESPECIES DE *Phytophthora* EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES EN EL CENTRO DE MÉXICO

RESUMEN

Las enfermedades causadas por *Phytophthora* son uno de los principales problemas en viveros de los cinco continentes. Este oomicete afecta todas las etapas del ciclo de producción de plantas y origina grandes pérdidas económicas. El objetivo de esta investigación fue detectar e identificar especies de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales en México. Ocho especies de *Phytophthora* y una de *Phytopythium* fueron obtenidas de viveros de plantas ornamentales en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. De los aislados obtenidos se realizó un análisis morfológico y molecular de la región ITS, β tubulina y CO1. Con base en las características morfológicas y moleculares los aislados fueron identificados como *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. pseudocryptogea* (syn. *kelmania*), *P. tropicalis*, y *Phytopythium litorale*. El número mayor de especies detectadas pertenecen al complejo *P. capsici* y *P. cryptogea*. La presencia de diversas especies de *Phytophthora* y una de *Phytopythium* detectadas en tres de las principales áreas productoras de plantas ornamentales en maceta en México, representa un serio problema fitosanitario ya que esto sugiere que estos patógenos se están dispersando a diferentes regiones del país.

ABSTRACT

The diseases caused by *Phytophthora* are one of the main problems in nurseries of the five continents. This oomycete affects all stages of the production cycle of plants and causes great economic losses. The objective of this research was to detect and identify *Phytophthora* species in nurseries of ornamental plants in Mexico. Eight *Phytophthora* species and one of *Phytophythium* were obtained in Mexico City, Michoacan and Morelos. A morphological and molecular analyses of the ITS region, β tubulin and CO1 were performed for the isolates obtained. Based on morphological and molecular characteristics, the isolates were identified as *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. pseudocryptogea* (syn. *kelmania*), *P. tropicalis*, and *Phytophythium litorale*. The highest number of species detected belong to the complex *P. capsici* and *P. cryptogea*. The presence of diverse *Phytophthora* species and one of *Phytophythium* detected in three of the main areas producing ornamental potted plants in Mexico, represents a serious phytosanitary problem since this suggests that these pathogens are dispersing to different regions of the country.

INTRODUCCIÓN

La producción de plantas ornamentales en vivero ha crecido considerablemente en las últimas décadas en México y en el mundo, ya que existen nuevas tecnologías para reproducir y propagar plantas, así como instalaciones a gran escala. La producción de plantas ornamentales en México aumentó un 25% entre marzo del 2016 y marzo de 2017 (<https://www.afmedios.com/2017/05/aumenta-25-produccion-plantas-ornamentales-hecho-mexico-2017-sagarpa/>). Según organizadores de la feria Ornamental, Plants and Flowers (OPF) México 2019, el valor de la producción de plantas y flores ornamentales fue de 16, 932 millones de pesos con 21, 742 hectáreas y 31,978 productores, siendo México el tercer país productor de plantas ornamentales a nivel mundial. El mercado en línea, el comercio, embalaje, las tecnologías de venta y los sistemas eficientes de transporte aumentan considerablemente el rango de plantas disponibles en el mercado (Drew et al., 2008). Sin embargo, esto favorece el comercio de plantas invasivas, introducción de patógenos exóticos y dispersión de especies de *Phytophthora* a lugares donde no estaban presentes (Erwin y Ribeiro, 1996, Jeffers et al., 2004). Las enfermedades causadas por *Phytophthora* aunque se han detectado en la producción de plantas de vivero desde hace muchos años siguen siendo un problema actual debido a la dificultad para manejarlas (Erwin y Ribeiro, 1996). El traslado de plantas entre instalaciones de producción permite la introducción del agente patógeno, asimismo el ambiente del vivero provee las condiciones adecuadas para el crecimiento y esporulación del oomicete. Los centros de origen y hábitats naturales de la mayoría de las especies de *Phytophthora* aún siguen siendo desconocidos (Moralejo et al., 2009). Estudios

genético-demográficos indican que algunas especies de *Phytophthora* probablemente fueron introducidas o pueden haber surgido a través de la hibridación o propagación mediante el comercio hortícola y el establecimiento de plantaciones (Werres et al., 2001, Cooke et al., 2005, Ivors et al., 2006, Brasier, 2007, 2008). La globalización favorece la hibridación y rápida evolución de especies de *Phytophthora*. La progenie de los híbridos puede ser igual o más virulenta que las especies parentales, lo que podría generar grandes riesgos en bioseguridad (Callaghan y Guest, 2015).

Algunos de los factores que favorecen la diseminación de este patógeno son el movimiento de plantas sintomáticas o asintomáticas dentro de un vivero o entre viveros (Bienapfl et al., 2014), así como el uso de suelo o sustrato de siembra con propágulos (Babadoost y Pavon, 2013). A nivel mundial se ha reportado que la forma más común de introducción de *Phytophthora* en viveros es a través de tejido vegetal infectado que permanece durante largos periodos de tiempo en el vivero y suelos reciclados pueden actuar como fuente continua de inóculo (Pérez-Sierra y Jung, 2013). Parke y Grünwald (2012), mencionan que el manejo de este patógeno en viveros de plantas es un desafío debido a que los viveros se caracterizan por tener heterocultivos. Los viveros propagan múltiples especies a partir de bulbos, portainjertos, semillas, tubérculos, esquejes y plantas obtenidas de cultivo de tejidos. Esta heterogeneidad en los viveros sugiere que distintas especies de *Phytophthora* pueden estar coexistiendo y podrían formarse híbridos o nuevas especies dentro de un vivero.

Las enfermedades causadas por *Phytophthora* son uno de los principales problemas en viveros de los cinco continentes. En México *Phytophthora* se ha reportado como un patógeno causante de la muerte de diversas especies de

plantas (Fernández-Pavía et al., 2013). Sin embargo, estos estudios son escasos. La Ciudad de México, Michoacán y Morelos están dentro de las cinco principales entidades productoras de plantas ornamentales en México (Mundo-Ocampo, 2006) y realizan venta de plantas a diferentes viveros del país, por lo cual es de suma importancia llevar a cabo muestreos directamente en estas zonas de producción ya que a partir de éstas *Phytophthora* puede diseminarse a diferentes áreas en el país donde no estaba presente.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 1) ¿Qué especies de *Phytophthora* están presentes en plantas ornamentales en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos?
- 2) ¿Cuáles especies de plantas ornamentales están siendo afectadas por *Phytophthora* en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos?
- 3) ¿En qué estación del año se detecta *Phytophthora* con mayor frecuencia en plantas ornamentales en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos?
- 4) ¿Qué especies de *Phytophthora* están coexistiendo en viveros de plantas ornamentales?
- 5) ¿Cuáles son las fuentes de inóculo de especies de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos?

HIPÓTESIS

- 1) Diferentes especies de *Phytophthora* se encuentran coexistiendo en un mismo vivero de plantas ornamentales.
- 2) El tejido vegetal, suelo o sustrato de siembra son fuentes de inóculo de especies de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la coexistencia y fuentes de inóculo de especies de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar y aislar especies de *Phytophthora* a partir de tejido vegetal enfermo, suelo o sustrato de siembra en viveros de plantas ornamentales, en las diferentes estaciones del año.
2. Identificar morfológicamente las especies de *Phytophthora* obtenidas de viveros.
3. Identificar molecularmente las especies de *Phytophthora* con los genes ITS, β tubulina y CO1.
4. Determinar que especies de *Phytophthora* están coexistiendo dentro de un vivero de plantas ornamentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento

Los aislados de *Phytophthora* se obtuvieron a partir de tejido vegetal con síntomas y de suelo de la rizosfera de plantas enfermas, procedentes de 115 viveros de producción y comercialización en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Las colectas se llevaron a cabo durante las cuatro estaciones del año. Los aislamientos se realizaron en medio harina de maíz o V8 selectivo NARPH [natamicina (0.02 g L⁻¹) ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), pentacloronitrobenceno (PCNB) (0.10 g L⁻¹), e himexazol (0.075 g L⁻¹). Para obtener los aislados de *Phytophthora*, el tejido se lavó con agua de la llave, se cortó en pequeñas secciones de 5 a 10 mm² aproximadamente a partir del borde de la lesión necrosada y de tejido sano. En un primer protocolo, los cortes de tejido se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, se secaron con toallas estériles de papel absorbente y se sembraron directamente en el medio harina de maíz o V8 selectivo NARPH. En el segundo protocolo, los cortes de tejido enjuagados con agua destilada estéril se trataron con solución de cloro comercial (i. a. hipoclorito de sodio, 0.6%) a 10% durante 30 seg, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. En ambos casos los tejidos se sembraron e incubaron a una temperatura de 25 °C hasta observar el crecimiento de las colonias.

Para aislar *Phytophthora* directamente de suelo o sustrato de siembra y suelo de la rizosfera de plantas con marchitez se usaron hojas de *Rhododendron* como cebos (tejidos trampa). Seis hojas completas de *Rhododendron* fueron colocadas sobre suelo inundado (10 g de suelo o sustrato de siembra y 20 mL de agua destilada estéril) y se incubaron por 48 h a 25 °C. El peciolo de la hoja

de azalea se cortó y se desinfectó en cloro comercial a 10% (0.6% hipoclorito de sodio) durante 30 seg, se enjuagó con agua destilada estéril, se secó con toallas de papel estériles y se transfirió a medio selectivo V8 (NARPH) e incubó a 25 °C. Las colonias se examinaron bajo el microscopio y se seleccionaron aquellas semejantes a *Phytophthora*, estas colonias se transfirieron a medio agar harina de maíz para obtener cultivos puros de los aislados por el método de punta de hifa. Para realizar la caracterización morfológica se indujo la formación de esporangios incubando bloques de agar V8 con micelio en agua destilada estéril o extracto de suelo no estéril, a 25 °C bajo luz fluorescente continua durante tres a cinco días. Las características morfológicas de las esporas sexuales y asexuales se compararon con las reportadas en la clave tabular de *Phytophthora* (Martin et al., 2012) y la clave lúcida http://idtools.org:8080/key_server/player.jsp?keyId=48. Las estructuras que se analizaron fueron: esporangios (con papila, semipapilado o no papilado), caducidad del esporangio (caduco, no caduco y algunas veces caduco), longitud del pedicelo (presencia: corto, mediano, largo, o ausencia), presencia o ausencia de proliferación interna del esporangio, forma o ramificación del esporangióforo (simpodio cerrado, simpodio simple, no ramificado, simpodio compuesto, irregularmente ramificado, umbelado), presencia (en ocasiones la forma) o ausencia de clamidosporas, formación de hinchamientos en las hifas (forma, en ocasiones los forma, no forma). Con respecto a las estructuras sexuales se determinó si el anteridio era anfígino, parágino o ambos estaban presentes, presencia o ausencia de ornamentación de la pared del oogonio, oospora plerótica, aplerótica o ligeramente aplerótica y la estrategia reproductiva

homotática o heterotática. Se midió el largo y ancho de los esporangios de cada aislado, obteniéndose rangos y valores medios.

Determinación del tipo de compatibilidad y características de estructuras sexuales

Los tipos de compatibilidad de los aislados de *Phytophthora* se determinaron cruzándolos con cepas de tipo de compatibilidad conocido de *P. capsici* (A1 y A2) y *P. cinnamomi* (A1 y A2) en agar V8 a 25 °C por 20 días en oscuridad. Si el aislado en la cruce con A1 formó oosporas se le designó el tipo de compatibilidad A2 y viceversa. Los aislados que no produjeron oosporas en medio V8 se cruzaron en medio agar ejote (colocando 6 mL en cajas de 60 X 15, de medio preparado con: 339 g Gerber de ejote, Nestle®, 15 g agar y 646 mL de agua destilada). Se utilizaron 6 mL de medio agar ejote por caja para evitar creciera abundante micelio algodonoso y se pudieran observar claramente las oosporas.

Prueba de crecimiento a 35 °C

El crecimiento a 35 °C fue otra prueba que se realizó para facilitar la identificación de especies de *Phytophthora*. Para llevar a cabo esta prueba se transfirieron discos de medio de harina de maíz agar (AHM) con micelio de 6 mm de diámetro, de los aislados obtenidos de tejido vegetal y suelo (se utilizaron cultivos de cuatro a cinco días), y se sembraron en medio agar V8 para determinar su crecimiento a 35 °C. Las cajas se colocaron en incubadora (Barnstead Labline modelo Max 4000) a temperatura constante de 35 °C por 24 h.

Patrones de crecimiento

Otra característica que se utilizó para diferenciar los aislados de *Phytophthora* fue observando los patrones de crecimiento en medio PDA y AHM (Erwin y Ribeiro, 1996). Para determinar estos patrones se sembró un disco de 6 mm de medio AHM con micelio de cada aislado en cajas Petri de 100 x 15 mm en medio de cultivo PDA y HMA. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C y se revisaron ocho días después de la siembra para determinar el patrón de crecimiento basándonos en los descritos por Erwin y Ribeiro (1996).

Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento es otra característica que varía entre especies de *Phytophthora*, aunque no es un carácter taxonómico, puede contribuir en la diferenciación de éstas. Se seleccionaron 52 aislados de *Phytophthora* para determinar su tasa de crecimiento. Se sembró un disco de 6 mm de diámetro de medio AHM con micelio en el centro de cajas Petri de 100 x 15 mm con medio PDA, HMA y V8 y se incubaron en oscuridad a 25 °C. Se realizó una curva de crecimiento midiendo diariamente el diámetro en centímetros del micelio hasta que este cubrió la totalidad de la caja. La tasa de crecimiento micelial de cada aislado se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Guigón-López y colaboradores (2010), con la fórmula: Tasa de Crecimiento (mm/día) = (Crecimiento Final – Crecimiento Inicial) /Tiempo de Incubación.

Pruebas de patogenicidad de los aislados de *Phytophthora* spp.

Inoculación de *P. capsici* en plantas de chile pimiento morrón

El experimento se llevó a cabo en plantas de chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.). Las semillas se desinfectaron con etanol a 70% durante 30 seg, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril, el exceso de agua se retiró con toallas de papel. Las semillas se germinaron en semilleros de 162 orificios con un volumen de 10 mL cada uno. Se utilizó como sustrato Peat moss humedecido, el cual se esterilizó por 1 h dos veces. Los semilleros se mantuvieron durante 10 días en una cámara húmeda bajo condiciones de laboratorio para favorecer la germinación. Para conservar la humedad del sustrato, el semillero se colocó en el interior de una charola de plástico con agua, y esta se cubrió con una bolsa de plástico. Cinco semanas después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a charolas de 6 compartimentos para su desarrollo (plantas donadas por C. Sánchez-Gurrola).

Inoculación. Se seleccionaron cuatro aislados (LEV6692, LEV6695, LEV6708 y LEV6709) obtenidos de plantas de chile (*Capsicum annuum*). La producción de esporangios y zoosporas se realizó siguiendo el procedimiento de Ristaino (1990) con modificaciones. El inóculo se obtuvo creciendo cada aislado en medio V8 agar durante cinco días. La producción de esporangios se realizó cortando bloques de medio más micelio de los aislados, posteriormente se les agregó agua destilada estéril y se mantuvieron bajo luz blanca directa a 25 °C hasta que se observó esporulación. La liberación de zoosporas se indujo incubando los aislados a 4 °C durante 30 min. El conteo de zoosporas se realizó en una cámara de Neubauer, y se preparó una suspensión de 10,000 zoosporas/mL. Plantas de chile de 102 días desde su germinación, se inocularon en la base del tallo cerca de la raíz con 1 mL de la suspensión con un total de 10,000 zoosporas por planta.

Se inocularon seis plantas por aislado. Las plantas control se inocularon con 1 mL de agua destilada estéril. Previo a la inoculación, el sustrato de las plantas se saturó de agua para favorecer el establecimiento del patógeno (*P. capsici*). Las plantas inoculadas se distribuyeron al azar colocándose en charolas de plástico sin drenaje, estas se llenaron de agua destilada estéril a una altura aproximada de 4 cm (Figura 1). Esta condición se mantuvo durante 24 h para asegurar el establecimiento del patógeno, después se regaron cada 3 días. Las plantas fueron monitoreadas diariamente hasta la observación de síntomas.

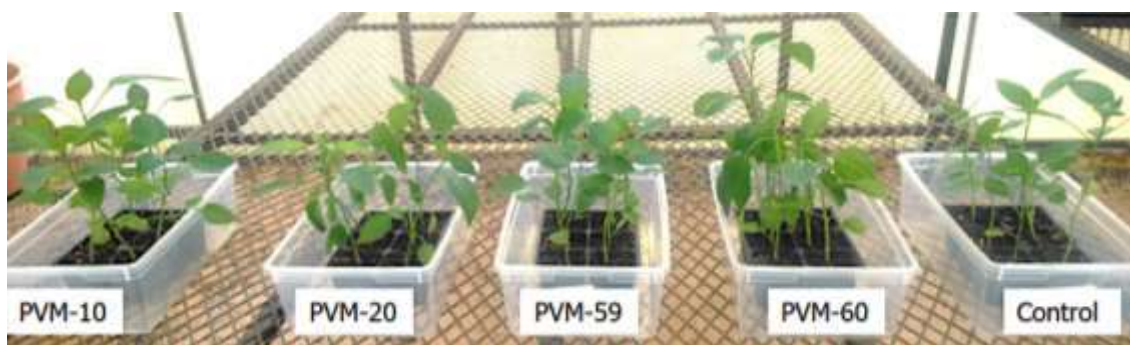


Figura 1. Plantas de chile pimiento morrón al momento de la inoculación con aislados de *P. capsici* obtenidos de *Capsicum annuum* de vivero.

Inoculación de plantas de *Petunia* con *Phytophthora cactorum*

El aislado homotático LEV6745 obtenido de una planta de *Petunia* x híbrida sp. se inoculó en tres plantas de *Petunia*, en la base del tallo cerca de la raíz, para determinar si era patogénico (Figura 2). La producción de inóculo se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, con una modificación, para la producción de esporangios se utilizó extracto de suelo no estéril.



Figura 2. Plantas sanas de *Petunia* x híbrida sp. inoculadas con el aislado homotático LEV6745 de *P. cactorum*.

Inoculación de plantas de *Rhododendron* sp. con *Phytophthora cinnamomi*

Las plantas de *Rhododendron* sp. fueron inoculadas en la base del tallo cerca de la raíz con los aislados heterotáticos LEV6688, LEV6702, LEV6711, LEV6712, LEV6720 y LEV6725 de *P. cinnamomi* obtenidos de diferentes plantas de *Rhododendron* sp. (Figura 3). La producción de inóculo y la inoculación se realizó como se mencionó anteriormente.



Figura 3. Plantas de *Rhododendron* sp. inoculadas con los aislados LEV6688, LEV6702, LEV6711, LEV6712, LEV6720 y LEV6725 de *P. cinnamomi*.

Inoculación de plantas de *Sempervivum* sp. con *Phytophthora tropicalis*

Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en plantas de *Sempervivum* bajo condiciones controladas (25 °C). La inoculación se realizó haciendo una herida con un bisturí estéril en dos puntos opuestos en la base del tallo y sobre esta se colocó un disco de agar V8 con micelio y esporangios. Se inocularon tres plantas y en las plantas control únicamente se hicieron heridas con un bisturí estéril (Figura 4).



Figura 4. Plantas de *Sempervivum* sp. inoculadas con el aislado LEV6743 de *P. tropicalis* de Cuautla, Morelos.

Reaislamiento del patógeno

Para cumplir con los postulados de Koch, a partir de las plantas que presentaron necrosis en el tallo y marchitez se realizaron aislamientos del tejido vegetal enfermo en medio selectivo agar V8. Dos días después del aislamiento se tomó un bloque de 0.5 cm² de medio con micelio característico de *P. capsici* y se transfirió a medio agar harina de maíz, y de la colonia que se desarrolló se transfirió un bloque a medio agar agua al 1.5%. Dos días después se tomó una

punta de hifa utilizando el microscopio estereoscópico y se sembró en medio agar harina de maíz, una vez que se desarrolló la colonia se tomó un disco de 6 mm y se colocó en medio Luria Bertani para descartar que hubiera contaminación por bacterias. Posteriormente, se caracterizaron morfológicamente los aislados en medio V8. El cultivo puro creció durante 5 días en agar harina de maíz, y se obtuvieron discos con micelio de 6 mm de diámetro y se colocaron 5 discos en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. A los tubos se les agregó 1 mL de agua destilada estéril y se almacenaron a 15 °C en la colección de *Phytophthora* del Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico se obtuvo cultivando los aislados a 21 ± 1 °C por 15 a 20 días en medio líquido V8 clarificado al 2% siguiendo el protocolo de Möller et al. (1992) con modificaciones en el rompimiento del tejido, previamente descrito por Robideau et al. (2011). En el paso final, la pastilla de ADN se resuspendió en 0.1X TE buffer con 50 µg/mL de RNasa A y se incubó a 65 °C por 10 min. La región ITS (internal transcribed spacer) se amplificó empleando los oligonucleótidos UN-up18S42 (Bakkeren et al., 2000), UN-lo28S1220 (Bala et al., 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 e ITS4 (Lévesque y de Cock, 2004). Las secuencias parciales del gen mitocondrial CO1 (cytochrome c oxidase subunit 1) fueron amplificadas con OomCox1Levup y Fm85mod modificados por Martin y Tooley (2003), y Oom-Btub-up415 y Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau et al., 2007) de la región del gen β tubulina para los aislados del complejo de especies *P. capsici* y *P. cryptogea*.

El volumen de la reacción de PCR para los tres genes (ITS, CO1 y β tubulina) fue de 10 μ L, con concentraciones finales de 1 x Titanium Taq buffer (con 3.5 mM de MgCl₂), 0.1mM de dNTPs, 0.08 μ M de cada oligonucleótido, 0.5 x Titanium Taq polimerasa y de 1 a 10 ng/ μ L de ADN. Se agregó agua S-HPLC hasta obtener un volumen de 10 μ L.

La amplificación de la región ITS SSU/LSU con los oligonucleótidos Oom-up18S67 y UN-lo28S1220 se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: 95 °C durante 3 min seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 45 s, 72 °C por 2 min, y finalmente 72 °C por 8 min de extensión. Para los oligonucleótidos UN-up18S42 y UN-lo28S22 o ITS4 las condiciones fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 68 °C durante 45 s, 72 °C por 1'30", y 72 °C por 10 min de extensión final.

Las condiciones para la amplificación de CO1 fueron las descritas por Robideau et al., (2011). Las condiciones para β tubulina para los aislados de *P. capsici* y *P. tropicalis* fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C por 1 min, y finalmente 72 °C por 8 min de extensión. Mientras que para el complejo *P. cryptogea* (*P. cryptogea*, *P. drechsleri* y *P. pseudocryptogea*) se realizó un PCR "touch-down" bajo las condiciones descritas por Blair et al., (2008), disminuyendo la temperatura de 68 a 58 °C.

Se utilizó un analizador genético Applied Biosciences Prism® 3130xl para generar las secuencias de ADN a partir de las reacciones de amplificación de secuenciación. Las secuencias se ensamblaron, editaron, generaron secuencias consenso y alinearon con secuencias publicadas en la base de datos del GenBank (NCBI. National Center for Biotechnology Information

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante análisis Blast con el programa Geneious (Geneious v. 8.1, www.geneious.com) para determinar los porcentajes de identidad e identificar la especie de *Phytophthora*. Las secuencias se subieron a la base de datos del banco de genes (GenBank). Los números de acceso están en proceso de obtenerse.

RESULTADOS

En los 115 viveros de plantas ornamentales muestreados en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos durante los años 2014, 2015 y 2016 se colectaron 219 muestras en total, de plantas y suelo o sustrato de siembra. Se obtuvieron aislados de *Phytophthora* de tejido enfermo mediante los dos protocolos utilizados. Con el primer protocolo de siembra directa de tejido (con tejido únicamente enjuagado con agua destilada estéril, sin cloro y secado con papel estéril) sobre medio selectivo, se observaron 53 colonias. Con el segundo protocolo donde el tejido adicionalmente se desinfectó con cloro, fueron 60 (Cuadro 1). Además, se registraron 93 colonias de suelo o sustrato de la planta usando como cebo hojas de *Rhododendron* sp. (Cuadro 2) en 33 aislados sembrados. También se obtuvo un aislado de suelo de monte usando como cebo hojas de *Rhododendron* sp. El aislado LEV6689 se obtuvo desinfectando el tejido en etanol al 70% durante 30 seg y sembró sin enjuagar. En algunos casos se obtuvieron aislados de *Phytophthora* de una planta y de suelo o sustrato de siembra con los dos protocolos.

Cuadro 1. Aislados obtenidos de tejido de las plantas de vivero con síntomas mediante dos protocolos/tratamientos.

No. aislado colección Canadá	No. aislado colección México	Tratamiento siembra directa	Tratamiento con cloro
LEV6691	PVM-7	1/3*	0/3
LEV6692	PVM-10	5/6	6/6
LEV6694	PVM-17	2/6	3/6
LEV6695	PVM-20	1/6	3/6
LEV6700	PVM-32	4/6	4/6
LEV6702	PVM-36	1/6	1/6
LEV6710	PVM-75	5/6	4/6
LEV6711	PVM-83	0/6	1/6
LEV6713	PVM-102	0/6	2/6
LEV6714	PVM-103	5/6	5/6
LEV6715	PVM-104	6/6	6/6
LEV6719	PVM-108	2/6	3/6
LEV6720	PVM-111	0/6	0/6
LEV6723	PVM-117	2/6	4/6
LEV6724	PVM-121	1/6	0/6
LEV6740	PVM-163	6/6	6/6
LEV6744	PVM-193	6/6	6/6
LEV6745	PVM-207	6/6	6/6

*El numerador representa el número de colonias de *Phytophthora* y el denominador el número de secciones de tejido sembrados en el medio. La primera columna muestra los códigos asignados a los aislados en Canadá (LEV=Lévesque, y el número de colección del aislado). La segunda columna muestra los códigos (P=*Phytophthora*, V=Viveros, M=México más el número de colección del aislado) asignados a los aislados en México en el laboratorio de patología vegetal, IIAF, UMSNH.

Cuadro 2. Aislados obtenidos de suelo o sustrato de siembra de plantas de vivero con síntomas, utilizando como tejido trampa hojas de azalea.

No. Aislado colección Canadá	No. aislado colección México	Tratamiento cebos en suelo o sustrato de siembra
LEV6696	PVM-24	+
LEV6697	PVM-25	+
LEV6708	PVM-59	+
LEV6710	PVM-75	+
LEV6711	PVM-83	4/6*
LEV6712	PVM-85	1/6
LEV6713	PVM-102	2/6
LEV6714	PVM-103	0/6
LEV6718	PVM-107	4/6
LEV6719	PVM-108	5/6
LEV6720	PVM-111	2/6
LEV6723	PVM-117	0/6
LEV6724	PVM-121	6/6
LEV6725	PVM-129	+
LEV6726	PVM-134	+
LEV6727	PVM-135	+
LEV6728	PVM-136	+
LEV6729	PVM-137	+
LEV6730	PVM-138	+
LEV6733	PVM-152	6/6
LEV6734	PVM-153	4/6
LEV6735	PVM-154	6/6
LEV6736	PVM-158	5/6
LEV6737	PVM-159	4/6
LEV6738	PVM-161	6/6
LEV6739	PVM-162	6/6
LEV6740	PVM-163	0/6
LEV6741	PVM-164	3/6
LEV6742	PVM-165	6/6
LEV6743	PVM-167	4/6
LEV6744	PVM-193	3/6
LEV6745	PVM-207	0/6
LEV6746	PVM-215	6/6

±= Se aisló *Phytophthora* pero no se contó el número de peciols colonizados, se considera como 1 aislado; *El numerador representa el número de colonias de *Phytophthora* y el denominador el número de peciols de tejido sembrados en el medio

Producción de esporangios

Los aislados de *Phytophthora* que produjeron esporangios fueron 27 con agua destilada estéril y 33 con extracto de suelo no estéril. Quince aislados produjeron esporangios con ambos tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aislados de *Phytophthora* que produjeron esporangios con agua destilada estéril y con extracto de suelo no estéril.

No. aislado colección Canadá	No. aislado colección México	Agua destilada estéril	Extracto de suelo no estéril
LEV6688	PVM-1	-	+
LEV6689	PVM-2	+	ND
LEV6690	PVM-3	+	ND
LEV6691	PVM-7	-	+
LEV6692	PVM-10	+	-
LEV6694	PVM-17	-	+
LEV6695	PVM-20	+	-
LEV6696	PVM-24	+	-
LEV6697	PVM-25	+	-
LEV6700	PVM-32	-	+
LEV6702	PVM-36	-	+
LEV6708	PVM-59	+	-
LEV6709	PVM-60	+	-
LEV6710	PVM-75	-	+
LEV6711	PVM-83	-	+
LEV6712	PVM-85	-	+
LEV6713	PVM-102	+	+
LEV6714	PVM-103	-	+
LEV6715	PVM-104	+	-
LEV6718	PVM-107	-	+
LEV6719	PVM-108	-	+
LEV6720	PVM-111	-	+
LEV6723	PVM-117	+	+
LEV6724	PVM-121	-	+
LEV6725	PVM-129	-	+
LEV6726	PVM-134	-	+
LEV6727	PVM-135	+	+
LEV6728	PVM-136	+	+
LEV6729	PVM-137	+	+
LEV6730	PVM-138	+	+
LEV6733	PVM-152	+	-
LEV6734	PVM-153	+	+
LEV6735	PVM-154	+	+
LEV6736	PVM-158	+	+
LEV6737	PVM-159	+	+
LEV6738	PVM-161	+	+
LEV6739	PVM-162	+	+
LEV6740	PVM-163	+	+
LEV6741	PVM-164	+	+
LEV6742	PVM-165	+	+
LEV6743	PVM-167	+	-
LEV6744	PVM-193	-	+
LEV6745	PVM-207	-	+
LEV6746	PVM-215	-	+
LEV6747	PVM-219	+	-

ND= No Determinado; += Si produjeron esporangios; -= No produjeron esporangios.

Caracterización morfológica de los aislados

En 27 de los viveros muestreados se obtuvieron 46 aislados de *Phytophthora* y uno de *Phytophythium*. Además, de varios aislados de *Pythium*, estos últimos se descartaron. Las características morfológicas de los aislados se muestran en el cuadro 4. El aislado LEV6746 se caracterizó en medio agar ejote, al cual se le agregó extracto de suelo no estéril para inducir la producción de

esporangios debido a que en medio V8 formó pocos esporangios. En la figura 5 se muestran algunas estructuras observadas de diferentes especies de *Phytophthora*.

Cuadro 4. Morfología de aislados de *Phytophthora* y *Phytophythium litorale* obtenidos de viveros en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos.

No. aislado colección Canadá	No. aislado colección México	Hospedante	Características
LEV6688	PVM-1	<i>Rhododendron</i> sp.	Esporangios no papilados, simpodio simple, ovoide, obpiriforme, clamidosporas terminales e intercalares, hinchamientos en las hifas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6689	PVM-2	<i>Cyclamen persicum</i>	Esporangios papilados con pedicelo no caduco, obpiriforme clavado, clamidosporas terminales, hinchamientos en las hifas, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6690	PVM-3	<i>Catharantus roseus</i>	Esporangios papilados algunos con pedicelo lateral, ovoide-obpiriforme, micelio muy ramificado con hinchamientos, anteridio anfigino, oospora aplerótica algunas colapsadas, heterotálico.
LEV6691	PVM-7	<i>Gerbera</i> sp.	Esporangios no papilados, ovoides, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6692	PVM-10	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados ovoides ovados, algunos en forma de riñón y otros casi redondos, pedicelo caduco, simpodio simple, hinchamientos en las hifas, agregados de hifas, micelio toruloso, clamidosporas intercalares, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6694	PVM-17	<i>Solenostemon</i> sp.	Esporangios no papilados con pedicelo largo, ovoides, proliferación interna, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6695	PVM-20	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados con pedicelo largo ovoides a subsféricos, algunos bipapilados, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6696	PVM-24	Suelo de monte	Esporangios no papilados, con hinchamiento en el pedicelo, persistente, simpodio simple, periforme a obpiriforme, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6697	PVM-25	<i>Euphorbia pulcherrima</i> Var. <i>Fredoom red</i>	Abundantes esporangios no papilados obpiriformes, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6700	PVM-32	<i>Bellis perennis</i>	Esporangios no papilados con pedicelo no caduco, ovoide a obpiriforme clavado, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6702	PVM-36	<i>Rhododendron</i> sp.	Esporangios no papilados, ovoides, obpiriformes, clamidosporas terminales, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.

LEV6708	PVM-59	<i>Capsicum annuum</i> (suelo)	Esporangios papilados con pedicelo largo caduco, limoniformes a ovoides, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6709	PVM-60	<i>Capsicum annuum</i> (tallo)	Esporangios papilados con pedicelo largo, limoniforme a ovoide, simpodio simple, hinchamientos en las hifas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6710	PVM-75	<i>Senecio cruentus</i>	Esporangios no papilados, dimórficos ovoides a obpiriformes y en forma de bolo, algunos esporangios en racimos surgiendo de la misma hifa los pedicelos, con 3 a 5 esporangios en forma de bolo como formando una flor, simpodio simple y cerrado, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6711	PVM-83	<i>Rhododendron sp.</i> (suelo)	Esporangios no papilados, ovoides-ovados, clamidosporas terminales, hinchamiento intercalar en la base del esporangióforo, hinchamiento en la hifa, micelio toruloso, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6712	PVM-85	<i>Rhododendron sp.</i> (suelo)	Esporangios no papilados, ovoides, simpodio simple, clamidosporas terminales, micelio toruloso, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6713	PVM-102	<i>Catharanthus roseus</i>	Esporangios papilados con pedicelo no caduco, algunos con pedicelo lateral, ovoides a subesféricos, obpiriformes, clamidosporas terminales, micelio toruloso, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6714	PVM-103	<i>Catharanthus roseus</i>	Esporangios papilados con pedicelo no caduco, subesféricos, globosos, ovoides, clamidosporas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6715	PVM-104	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados y algunos bipapilados con pedicelo caduco largo, ovoides, obpiriformes, simpodio simple, se observó un hinchamiento en la base del esporangio, agrupamiento de hifas, micelio toruloso, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6718	PVM-107	<i>Mandevilla sp.</i>	Esporangios no papilados con pedicelo no caduco, ovoides, simpodio simple, clamidosporas terminales, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6719	PVM-108	<i>Mandevilla sp.</i>	Esporangios no papilados, ovoides, simpodio simple, clamidosporas, hinchamientos intercalares en el esporangióforo, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6720	PVM-111	<i>Rhododendron sp.</i>	Esporangios no papilados, elipsoides, subesféricos a ovoides, clamidosporas terminales e intercalares, hinchamientos, micelio toruloso, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6721	PVM-115.1	<i>Rhododendron sp.</i>	Esporangio papilado, ovoides, limoniformes y distorcionados, simpodio simple, clamidosporas intercalares y terminales e hinchamientos en las hifas, heterotálico, anteridio anfigino, oospora plerótica.
LEV6722	PVM-115.2	<i>Rhododendron sp.</i>	Micelio toruloso, esporangio no papilado, ovoides, simpodio simple, clamidosporas terminales e hinchamientos, heterotálico, anteridio anfigino, oospora plerótica.
LEV6723	PVM-117	<i>Catharanthus roseus</i>	Esporangios papilados con pedicelo no caduco, algunos pedicelos por un costado del esporangio, ovoides-obpiriformes, simpodio simple, un hinchamiento intercalar, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6724	PVM-121	<i>Senecio cruentus</i>	Esporangios no papilados, ovoides, simpodio simple, abundantes hinchamientos en las hifas, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6725	PVM-129	<i>Rhododendron sp.</i>	Esporangios no papilados, ovoides, clamidosporas terminales, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.

LEV6726	PVM-134	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> poblano	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, ovoides, obpiriformes y distorsionados, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6727	PVM-135	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, ovoides, obpiriformes, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6728	PVM-136	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, ovoides, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6729	PVM-137	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, obpiriformes, ovoides a subesféricos, simpodio simple, agregados de hifas, clamidosporas terminales, enrollamientos de hifas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6730	PVM-138	<i>Cineraria marítima</i>	Esporangios no papilados, simpodio simple, ovoides, ovados, periformes, un hinchamiento intercalar en la base del esporangio, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6733	PVM-152	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados algunos bipapilados con pedicelo caduco largo, elipsoides, obpiriformes, ovoides, formas distorsionadas, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6734	PVM-153	<i>Ruta graveolens</i>	Esporangios papilados, algunos bipapilados con pedicelo caduco largo, obpiriformes, ovoides, limoniformes, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6735	PVM-154	<i>Catharanthus roseus</i>	Esporangios papilados, algunos con pedicelo lateral, ovoides, obpiriformes, simpodio simple, clamidosporas intercalares y terminales, hinchamientos intercalares, anteridio anfigino, oospora ligeramente aplerótica, heterotálico.
LEV6736	PVM-158	<i>Cineraria marítima</i>	Esporangios no papilados, ovoide-obpiriforme, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6737	PVM-159	<i>Pentas lanceolata</i>	Esporangios no papilados, ovoide-ovado, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6738	PVM-161	<i>Capsicum chinense</i>	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, ovoides, obpiriformes, obturbinados, globosos, formas distorsionadas, simpodio simple, agregados de hifas, abundantes clamidosporas terminales, anteridio anfigino, oospora aplerótica, heterotálico.
LEV6739	PVM-162	<i>Capsicum chinense</i>	Esporangios papilados, algunos bipapilados con pedicelo caduco largo, obpiriformes, ovoides, globosos, elipsoides, limoniformes, formas distorsionadas, simpodio simple, abundantes clamidosporas terminales, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6740	PVM-163	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, obpiriformes, ovoides, limoniformes, formas distorsionadas, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6741	PVM-164	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados, algunos bipapilados con pedicelo caduco largo, ovoides, obpiriformes, limoniformes, formas distorsionadas, simpodio simple, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6742	PVM-165	<i>Capsicum annuum</i>	Esporangios papilados, algunos bipapilados con pedicelo caduco mediano, ovoides, simpodio simple, clamidosporas intercalares y terminales, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6743	PVM-167	<i>Sempervivum</i> sp.	Esporangios papilados con pedicelo caduco largo, limoniformes, ovoides, simpodio simple, clamidosporas terminales e intercalares, agregados de hifas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.
LEV6744	PVM-193	<i>Senecio cruentus</i>	Esporangios no papilados con pedicelo no caduco, ovoides, simpodio simple, hinchamientos en las hifas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotálico.

LEV6745	PVM-207	<i>Petunia</i> x híbrida sp.	Esporangios papilados con pedicelo caduco corto, ovoides, simpodio simple, oogonio de pared lisa, anteridio parágino, oospora plerótica, homotático.
LEV6746	PVM-215	<i>Senecio cruentus</i>	Esporangios no papilados con pedicelo no caduco, ovoide, esporangióforo no ramificado, hinchamientos en las hifas, agrupados, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotático.
LEV6747	PVM-219	<i>Capsicum pubescens</i>	Esporangios papilados, algunos bipapilados con pedicelo caduco largo, ovoides, obovoides, simpodio simple, escasos hinchamientos intercalares, clamidosporas terminales globosas, hifas enrolladas, anteridio anfigino, oospora plerótica, heterotático.

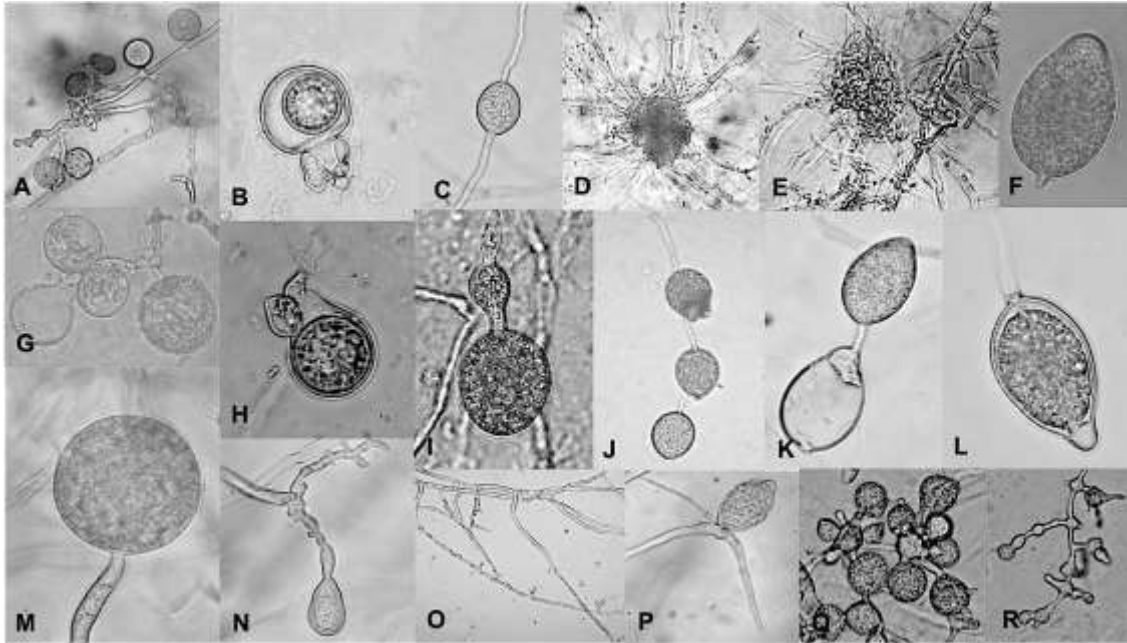


Figura 5. Características morfológicas de diferentes especies de *Phytophthora*. **A, G y M.** Clamidosporas; **N.** Hinchamiento; **B.** Oospora aplerótica con anteridio anfigino; **H.** Oospora plerótica con anteridio parágino; **C y I.** Hinchamientos; **O.** Hifas cenocíticas; **D y E.** Agregados de hifas; **F.** Esporangio no papilado; **J.** Esporangios en simpodio simple; **K.** Esporangio germinando dando origen a otro esporangio; **P.** Esporangio germinando; **L.** Esporangio papilado; **Q.** Hinchamientos de hifas globosos; **R.** Hinchamientos de hifas de formas distorsionadas.

El aislado LEV6710 de *P. drechsleri* obtenido de *Senecio cruentus* de la Ciudad de México mostró características atípicas de la especie. Las estructuras se formaron agregando extracto de suelo no estéril (Figura 6).

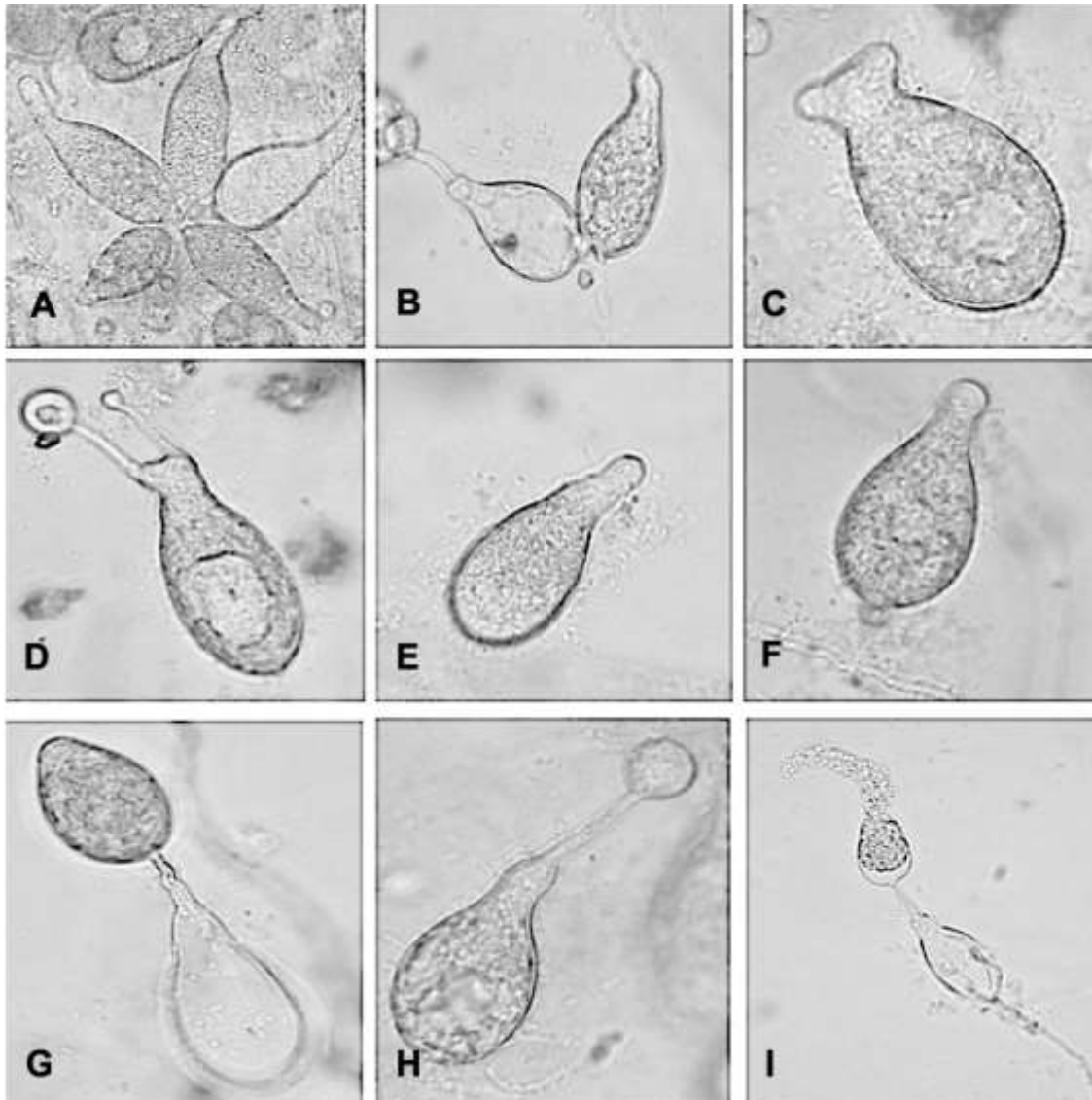


Figura 6. Características morfológicas de *P. drechsleri*. **A.** Esporangios en racimo surgiendo de la misma hifa (simpodio simple cerrado), no papilados; **B.** Esporangios dimórficos ovoides a obpiriformes surgiendo de la misma hifa; **C.** Esporangio con la parte apical en forma de yunque; **D.** Esporangio con dos tubos germinativos; **E.** Esporangio; **F.** Hinchamiento en la base del esporangio; **G.** Esporangio dando origen a otro esporangio; **H.** Esporangio germinando; **I.** Proliferación interna.

Aislados de *Phytophthora capsici* que producen clamidosporas

La caracterización morfológica y molecular de las especies de *Phytophthora* obtenidas concuerdan en la mayoría de los aislados. Sin embargo, existe discrepancia con lo que se reporta en la clave lúcida de *Phytophthora* para *P. capsici* y lo observado para algunos aislados de este estudio ya que menciona que no presenta clamidosporas (Martin et al., 2012). En los aislados de *Capsicum annum* (LEV6692 Temixco, LEV6716 Cuernavaca, LEV6717 Cuernavaca, LEV6729 Cuernavaca y LEV6742 Cuautla), *Capsicum chinense* (LEV6738 Cuautla y LEV6739 Cuautla), y *Capsicum pubescens* (LEV6747 Morelia) de *P. capsici* se observaron clamidosporas (Figura 7) en diferentes medios de cultivo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Aislados de *P. capsici* obtenidos de tres especies de *Capsicum* que formaron clamidosporas en diferentes medios.

No. aislado colección Canadá	No. aislado colección México	Medio HMA	Medio V8	Medio AA	TC
LEV6692	PVM-10	Clamidosporas terminales e intercalares	Clamidosporas intercalares	Clamidosporas intercalares	A2
LEV6716	PVM-105.1		Clamidosporas terminales	Clamidosporas	A1
LEV6717	PVM-105.2		Clamidosporas	Clamidosporas	A2
LEV6729	PVM-137	Clamidosporas	Clamidosporas escasas terminales	Clamidosporas Escasas	A1
LEV6738	PVM-161		Clamidosporas terminales	Clamidosporas abundantes	A1
LEV6739	PVM-162	Clamidosporas terminales abundantes			A1
LEV6742	PVM-165		Clamidosporas terminales e intercalares		A2
LEV6747	PVM-219	Clamidosporas terminales	Clamidosporas terminales		A2

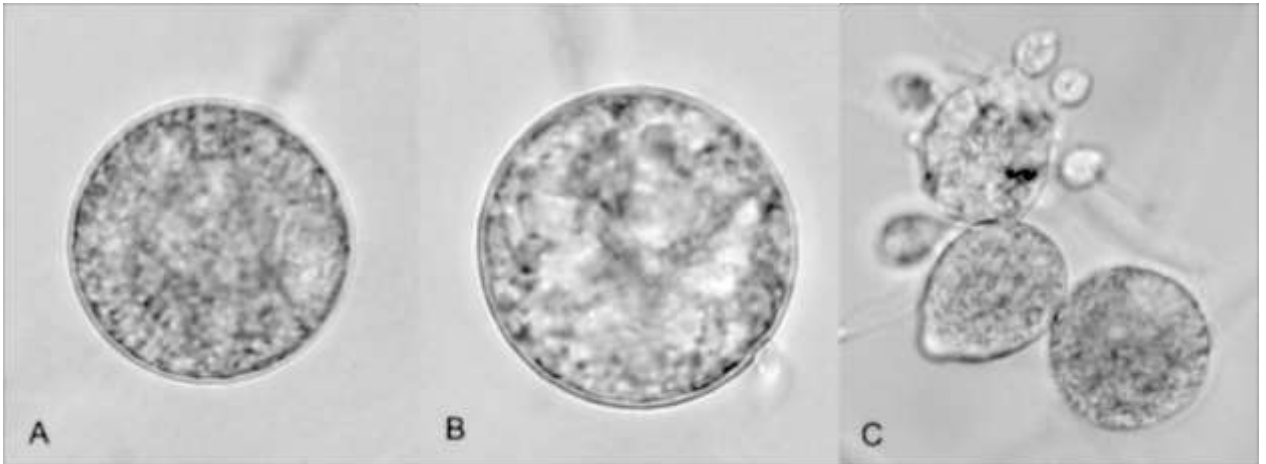


Figura 7. Estructuras de *P. capsici* en medio agua agar. **A y B.** Clamidosporas terminales LEV6738; **C.** Clamidospora, esporangio y zoosporas.

El aislado LEV6715 produjo agregados de hifas, una característica atípica de *P. capsici*. Otra característica atípica de *P. capsici* (LEV6747) aislada de *Capsicum pubescens* fue la presencia de enrollamientos de hifas en medio agua agar (Figura 8).

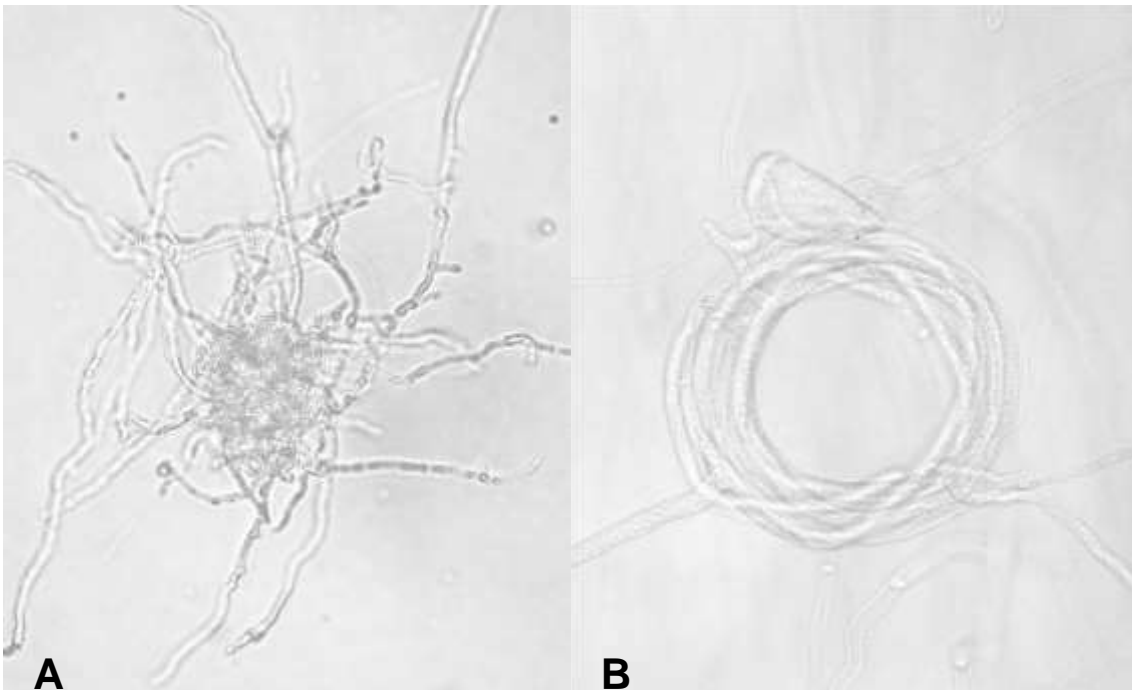


Figura 8. Estructuras de *P. capsici* en medio agua agar. **A.** Agregados de hifas; **B.** Hifas enrolladas.

Caracterización de esporangios

Tamaño

Las medias del tamaño de los esporangios de largo por ancho variaron en aislados dentro de la misma especie de *Phytophthora*. Los rangos de los aislados de *P. cactorum* fueron: largo (40-55) x ancho (32.5-40), *P. capsici* (19.5-82.5) x (20-52.5), *P. cinnamomi* (27.5-80) x (17.5-62.5), *P. cryptogea* (40-65) x (25-40), *P. drechleri* (35-65) x (20-42.5), *P. nicotianae* (30-72.5) x (22.5-47.5), *P. pseudocryptogea* (37.5-57.5) x (27.5-37.5), *P. tropicalis* (35-55) x (20-35) y *Phytophthium litorale* (37.5-62.5) x (25-37.5) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medias y rangos del tamaño (largo y ancho) de esporangios de aislados de *Phytophthora* y *Phytophthium litorale*.

Código	Media Longitud (μm)	Longitud intervalo (μm)	Media Ancho (μm)	Ancho intervalo (μm)
PVM-1	59.3	42.5-75	42.5	32.5-62.5
PVM-2	45.1	35-55	29.75	16.25-37.5
PVM-3	42	30-52.5	30.7	25-37.5
PVM-7	48.8	42.5-57.5	34.15	30-40
PVM-10	46.65	40-52.5	29.7	20-36.25
PVM-17	46.95	37.5-57.5	31.8	27.5-37.5
PVM-20	47.7	37.5-62.5	35.8	30-47.5
PVM-24	55.3	46.25-65	31.8	25-37.5
PVM-25	47.35	40-60	30.2	25-37.5
PVM-32	46.65	40-55	30.35	25-37.5
PVM-36	56.85	32.5-80	36.5	27.5-45
PVM-54	45.25	37.5-50	28.55	22.5-32.5
PVM-55	46.9	40-60	27.55	22.5-32.5
PVM-59	65.6	57.5-77.5	31.15	25-37.5
PVM-60	60.95	52.5-70	30.3	25-35
PVM-75	42	35-40	26.8	20-32.5
PVM-83	41	32.5-55	29	22.5-40
PVM-85	52.15	40-65	34.9	27.5-42.5
PVM-102	52.8	45-60	41.1	32.5-47.5
PVM-103	50.9	42.5-57.5	39.3	32.5-47.5
PVM-104	55.75	35-72.5	34.15	22.5-42.5
PVM-107	54.6	35-70	37.85	17.5-50
PVM-115.1	62.05	50-72.5	32.4	25-37.5

PVM-115.2	48.5	37.5-62.5	34.6	25-47.5
PVM-108	49.05	40-70	36.4	30-47.5
PVM-111	50.95	40-65	36.65	27.5-47.5
PVM-117	46.5	40-53.75	34.4	27.5-42.5
PVM-121	48.7	37.5-62.5	31.3	25-37.5
PVM-129	37.45	27.5-52.5	28.9	20-42.5
PVM-134	51.95	42.5-70	34.3	27.5-47.5
PVM-135	43.8	22.5-57.5	28.85	22.5-42.5
PVM-136	44.6	37.5-62.5	29.65	25-37.5
PVM-137	61.3	42.5-82.5	43.15	27.5-52.5
PVM-138	42.25	35-55	31.9	27.5-37.5
PVM-152	51.35	37.5-65	32.6	25-47.5
PVM-153	57	37.5-75	34	27.5-42.5
PVM-154	50.6	35-72.5	34.9	22.5-42.5
PVM-158	49.55	40-60	32.45	25-42.5
PVM-159	43.25	37.5-47.5	32.25	25-37.5
PVM-161	53	30-70	40.05	27.5-52.5
PVM-162	54.6	40-80	36.1	30-42.5
PVM-163	53.8	40-72.5	32	23.75-42.5
PVM-164	23.86	19.5-28.5	30.25	25-42.5
PVM-165	50.6	40-60	32.85	25-37.5
PVM-167	42.4	35-55	25.7	20-35
PVM-193	46.7	42.5-52.5	35.7	32.5-40
PVM-207	46.3	40-55	36.5	32.5-40
PVM-215	48.7	40-65	30.2	27.5-35
PVM-219	55.6	45-62.5	37.8	27.5-45

Tipos de compatibilidad (TC)

Se detectaron aislados con TC A1, A2 y homotáticos. El TC A1 se presentó con mayor frecuencia (25 aislados) con respecto al TC A2 (22) y se detectaron aislados homotáticos, uno con anteridio anfígino y el otro parágino (Cuadro 7). Por otro lado, se detectaron casos de incompatibilidad de algunos aislados cruzados con cepas de *P. cinnamomi* por lo que alternativamente se cruzaron con una cepa de *P. capsici*. Dos aislados cruzados con ambos tipos de compatibilidad de *P. cinnamomi* y *P. capsici* no produjeron oosporas en V8, por lo que estos se cruzaron en medio agar ejote en donde si produjeron oosporas. Los aislados LEV6721 (*P. capsici*) y LEV6722 (*P. cinnamomi*) se cruzaron y

prudujeron oosporas únicamente en el medio agar-ajote a los 18 días. Con las cruza realizadas se determinó en los aislados el tipo de anteridio y de oospora y se midió el tamaño de estas últimas.

Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* están presentes en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos, así como en forma homotática en la Ciudad de México. Se detectó el tipo de compatibilidad A2 de *P. cinnamomi* en Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Mientras que el A1 de *P. drechsleri* está presente en viveros de Morelos (Cuernavaca y Cuautla) afectando *Cineraria maritima*, en Cuernavaca en suelo y en *Euphorbia pulcherrima*. El el A1 y A2 en *Petunia* x híbrida en la localidad de Xochimilco, Ciudad de México. Ambos tipos de compatibilidad de *P. cryptogea* están presentes en Cuernavaca, Morelos, A1 en *Bellis perennis* y A2 en *Senecio cruentus*. El A1 y A2 de *P. nicotianae* fueron detectados en *Catharanthus roseus* en Cuernavaca. Únicamente fue detectado el A1 de *P. pseudocryptogea* en *Pentas lanceolata* en Cuautla y en *Solenostemon* sp. en Cuernavaca.

Cuadro 7. Tipos de compatibilidad, medias y rangos del tamaño (largo y ancho) de oosporas de los aislados de *Phytophthora* y *Phytopythium litorale* obtenidos de plantas ornamentales.

Código	TC	Media Longitud (µm)	Longitud intervalo (µm)	Media Ancho (µm)	Ancho intervalo (µm)
PVM-1	A2	35.4	32.5-40	36.75	32.5-42.5
PVM-2	A1	30.7	27.5-35	31.65	27.5-37.5
PVM-3	A2	28.55	22.5-35	29.45	25-37.5
PVM-7	A2	33.7	22.5-45	34.8	25-40
PVM-10	A2	29	25-35	29.8	25-35
PVM-17	A1	30.9	25-35	32.25	27.5-37.5
PVM-20	A1	30.25	25-36.25	32	26.25-37.5
PVM-24	A1	29.9	25-37.5	32.15	27.5-38.75
PVM-25	A1	26.95	22.5-32.5	28.4	22.5-35

PVM-32	A1	30.75	22.5-40	32.5	22.5-42.5
PVM-36	A2	35.4	30-42.5	35.5	30-45
PVM-54	A1	32.55	27.5-37.5	33.7	30-37.5
PVM-55	A1	32.2	27.5-37.5	33.6	30-37.5
PVM-59	H*	32.2	25-37.5	32.5	25-37.5
PVM-60	A1	33.7	27.5-40	34.5	30-40
PVM-75.1	A1	26.95	22.5-32.5	29.6	25-35
PVM-83	A2	38.55	32.5-42.5	39.2	32.5-43.75
PVM-85	A2	37.25	32.5-42.5	37.25	32.5-42.5
PVM-102	A2	28.2	22.5-32.5	29.55	25-35
PVM-103	A2	29	27.5-32.5	30.7	27.5-35
PVM-104	A1	26.85	22.5-32.5	29.15	25-35
PVM-107	A2	37.9	32.5-42.5	38.75	33.75-42.5
PVM-108	A2	37.35	32.5-42.5	37.6	32.5-42.5
PVM-111	A2	36.75	32.5-42.5	37.7	32.5-42.5
PVM-115.1	A1	30.6	27.5-35	32.9	28.75-37.5
PVM-115.2	A2	36.45	32.5-42.5	36.85	32.5-42.5
PVM-117	A1	29.1	25-35	32	27.5-40
PVM-121	A1	31.75	28.75-35	33.45	30-37.5
PVM-129	A2	37.05	32.5-45	37.5	32.5-45
PVM-134	A1	25	22.5-37.5	32.85	25-40
PVM-135	A1	26.8	22.5-32.5	26.8	22.5-32.5
PVM-136	A1	25.75	22.5-28.75	27.85	25-32.5
PVM-137	A1	30.9	22.5-40	32.5	25-42.5
PVM-138	A1	29.7	25-35	32.45	23.75-37.5
PVM-152	A2	26.2	22.5-35	27.65	22.5-35
PVM-153	A2	27.4	22.5-30	28.6	25-32.5
PVM-154	A2	27.55	22.5-30	28.7	23.75-32.5
PVM-158	A1	28.35	25-32.5	30.55	25-35
PVM-159	A1	31.75	27.5-35	33.15	28.75-40
PVM-161	A1	25.7	22.5-30	26.85	22.5-30
PVM-162	A1	26	22.5-35	26.6	22.5-35
PVM-163	A1	25.3	22.5-27.5	27.35	25-32.5
PVM-164	A2	29	25-32.5	30.2	25-37.5
PVM-165	A2	27.55	23.75-32.5	28.9	25-35
PVM-167	A1	22.85	20-25	23.95	20-27.5
PVM-193	A2	32.3	25-37.5	34.6	27.5-40
PVM-207	H	26.9	22.5-30	27.1	22.5-30
PVM-215	A2	32.7	25-35	34.45	25-37.5
PVM-219	A2	32.2	25-40	34.5	27.5-42.5

TC=Tipo de Compatibilidad de especies heterotáticas; *H=Homotático.

Tipos de compatibilidad de *Phytophthora* en un mismo vivero

Se detectó en un mismo vivero a *P. capsici* en plantas de *Capsicum annuum* (A2, LEV6733) y de *Ruta graveolens* (A2, LEV6734), y la especie *P. nicotianae* en *Catharanthus roseus* (A2, LEV6735) en el municipio de Cuautla, Morelos durante la estación de verano (Figura 9).



Figura 9. Plantas con síntomas de marchitez infectadas por *Phytophthora* en un mismo vivero. **A.** *Catharanthus roseus*; **B.** *Ruta graveolens*; **C.** *Capsicum annuum*.

Se encontraron ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) en cuatro viveros diferentes en distintas localidades. En algunos casos el tipo de compatibilidad complementario se detectó en plantas hospedantes diferentes.

Se detectó en un mismo vivero en el municipio de Cuautla a *P. capsici* en *C. chinense* (A1, LEV6738, LEV6739) y *C. annuum* (A1, LEV6740 y A2, LEV6741, LEV6742). En Cuernavaca a *P. cinnamomi* (A2, LEV6720, LEV6722) y *P. capsici* (A1, LEV6721) en *Rhododendron* y, en un vivero diferente de la misma localidad

a *P. nicotianae* (A2, LEV6713, LEV6714) en *Catharanthus roseus* y *P. capsici* (A1, LEV6715, LEV6716) y (A2, LEV6717) en *C. annuum*. También se detectó a *P. drechsleri* (A1, LEV6731) y (A2, LEV6732) en *Petunia* x híbrida en Xochimilco (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tipos de compatibilidad de *Phytophthora* detectados en el mismo vivero.

Código	No. vivero	Especie de <i>Phytophthora</i>	Tipo de compatibilidad	Planta hospedante	Localidad
LEV6713	45	<i>Phytophthora nicotianae</i>	A2	<i>Catharanthus roseus</i>	Cuernavaca
LEV6714	45	<i>Phytophthora nicotianae</i>	A2	<i>Catharanthus roseus</i>	Cuernavaca
LEV6715	45	<i>Phytophthora capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuernavaca
LEV6716	45	<i>Phytophthora capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuernavaca
LEV6717	45	<i>Phytophthora capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Cuernavaca
LEV6720	47	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i>	Cuernavaca
LEV6721	47	<i>Phytophthora capsici</i>	A1	<i>Rhododendron</i>	Cuernavaca
LEV6722	47	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i>	Cuernavaca
LEV6731	60	<i>Phytophthora drechsleri</i>	A1	<i>Petunia</i> x híbrida	Xochimilco
LEV6732	60	<i>Phytophthora drechsleri</i>	A2	<i>Petunia</i> x híbrida	Xochimilco
LEV6738	70	<i>Phytophthora capsici</i>	A1	<i>Capsicum chinense</i>	Cuautla
LEV6739	70	<i>Phytophthora capsici</i>	A1	<i>Capsicum chinense</i>	Cuautla
LEV6740	70	<i>Phytophthora capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuautla
LEV6741	70	<i>Phytophthora capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Cuautla
LEV6742	70	<i>Phytophthora capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Cuautla

Crecimiento a 35 °C

El crecimiento de los aislados a 35 °C en medio V8 agar varió, 33 aislados crecieron a esta temperatura, 14 no crecieron (Cuadro 9).

Cuadro 9. Crecimiento de los aislados de *Phytophthora* y *Phytophythium litorale* a 35 °C.

Código	Respuesta	Código	Respuesta	Código	Respuesta
PVM-1	-	PVM-83	+	PVM-137	+
PVM-2	+	PVM-85	-	PVM-138	+
PVM-3	-	PVM-102	+	PVM-152	-
PVM-7	-	PVM-103	+	PVM-153	+

PVM-10	+	PVM-104	+	PVM-154	+
PVM-17	+	PVM-107	-	PVM-158	+
PVM-20	+	PVM-108	-	PVM-159	+
PVM-24	+	PVM-111	-	PVM-161	+
PVM-25	+	PVM-115.1	+	PVM-162	+
PVM-32	+	PVM-115.2	-	PVM-163	+
PVM-36	-	PVM-117	+	PVM-164	+
PVM-54	+	PVM-121	+	PVM-165	+
PVM-55	+	PVM-129	+	PVM-167	-
PVM-59	+	PVM-134	ND	PVM-193	-
PVM-60	+	PVM-135	+	PVM-207	-
PVM-75	+	PVM-136	+	PVM-215	-

*ND=No Determinado; +=Creció; -=No creció.

Patrón de crecimiento de la colonia

En este estudio las cepas se crecieron en medio agar papa dextrosa (PDA) y agar harina de maíz (AHM) para determinar el patrón de crecimiento de la colonia. En medio AHM el patrón ligeramente estrellada se presentó con mayor frecuencia (43.75%), mientras que en PDA el que se observó con mayor frecuencia (31.25%) fue el de ligeramente algodonosa (Cuadro 10).

Cuadro 10. Forma de la colonia en medio PDA y AHM crecidas durante 8 días.

Código	PDA	AHM
PVM-1	Estolonifera	Algodonosa
PVM-2	Rosácea	Petaloide
PVM-3	Estolonifera	Estolonifera
PVM-7	Ligeramente estrellada	Ligeramente estrellada
PVM-10	Ligeramente algodonosa	Ligeramente algodonosa
PVM-17	Ligeramente algodonosa	Ligeramente estrellada
PVM-20	Estrellada	Ligeramente estrellada
PVM-24	Ligeramente estrellada	Ligeramente algodonosa
PVM-25	Ligeramente petaloide	Ligeramente estrellada
PVM-32	Algodonosa	Algodonosa
PVM-36	Ligeramente algodonosa	Ligeramente algodonosa
PVM-54	Estrellada	Ligeramente estrellada
PVM-55	Petaloide	Ligeramente estrellada
PVM-59	Ligeramente algodonosa	Algodonosa a indefinido
PVM-60	Estrellada	Estrellada
PVM-75	Ligeramente algodonosa	Ligeramente estrellada

Tasa de crecimiento de la colonia

La tasa de crecimiento micelial indica la velocidad con que un aislado es capaz de colonizar un medio de cultivo. Se seleccionaron 15 aislados (Figuras 10 a 12). Los aislados crecieron mayormente en medio V8, medianamente en medio HMA y menormente en medio PDA.

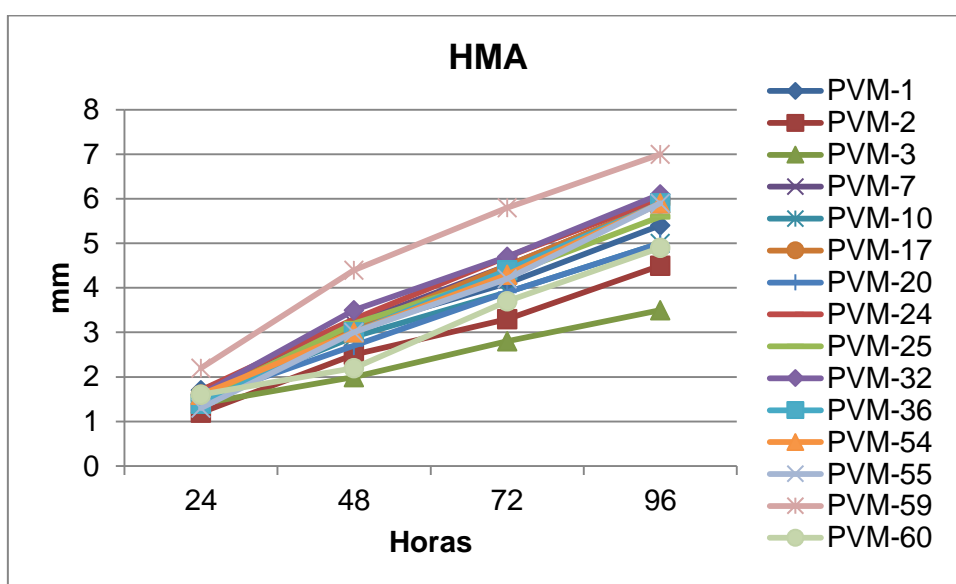


Figura 10. Tasa de crecimiento (mm) de 15 aislados de *Phytophthora* en medio HMA durante 96 horas.

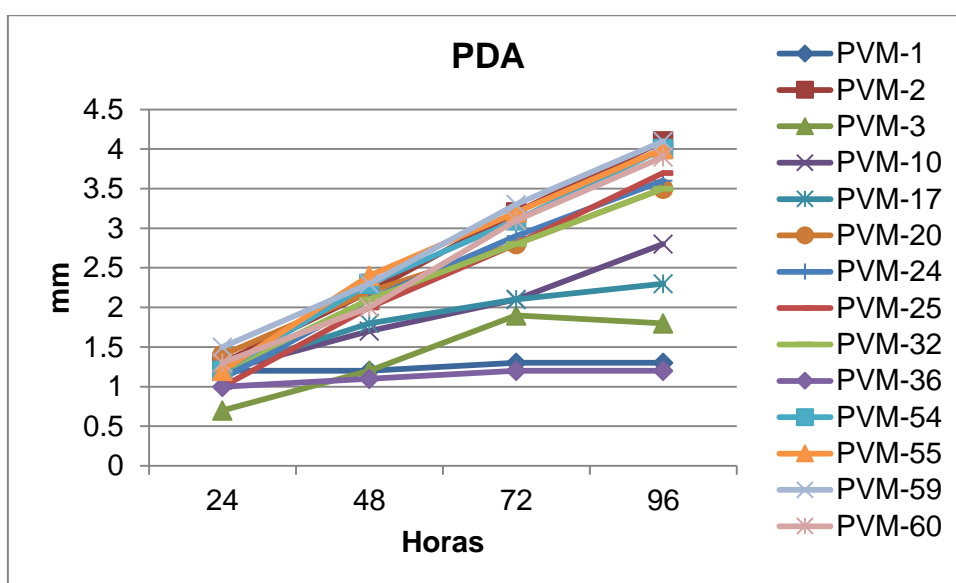


Figura 11. Tasa de crecimiento (mm) de 14 aislados de *Phytophthora* en medio PDA durante 96 horas.

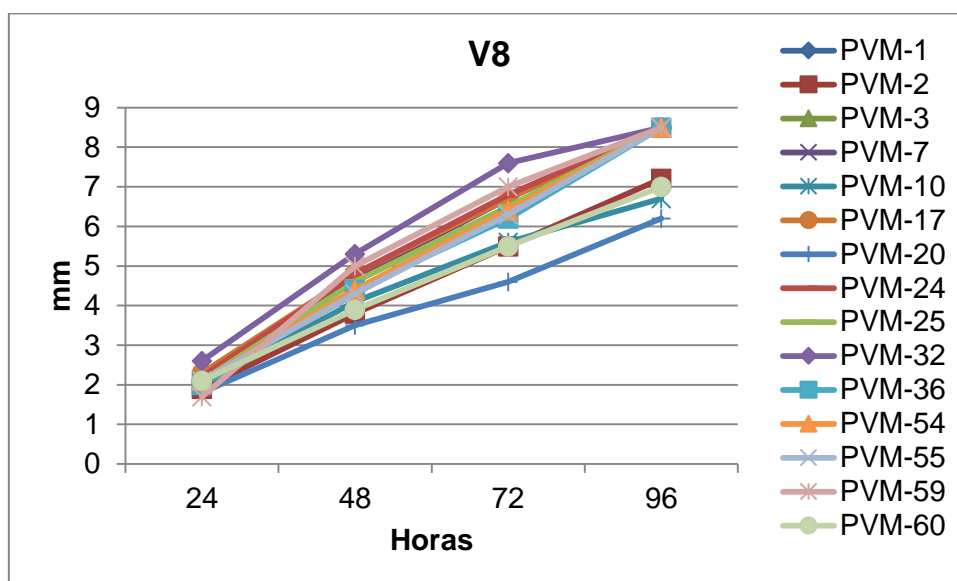


Figura 12. Tasa de crecimiento (mm) de 15 aislados de *Phytophthora* en medio V8 durante 96 horas.

Pruebas de patogenicidad de aislados de *Phytophthora* spp.

Patogenicidad de *P. capsici* en chile pimienta morrón

Las plantas inoculadas con los aislados de *P. capsici* LEV6692 (PVM-10), LEV6695 (PVM-20), LEV6708 (PVM-59) y LEV6709 (PVM-60) obtenidos de plantas de vivero mostraron síntomas de necrosis en la base del tallo así como marchitez, tres días después de la inoculación. Seis días después de la inoculación se observaron clorosis y defoliación de las hojas basales, lo cual fue avanzando a la parte superior hasta causar la muerte de la planta, confirmándose la patogenicidad de los aislados. Las plantas control no mostraron síntomas (Figura 13). Se reaislaron los aislados y caracterizaron morfológicamente para compararlos con los inoculados.



Figura 13. Plantas de chile pimiento morrón con síntomas de marchitez tres días después de la inoculación con aislados de *P. capsici* obtenidos de *Capsicum annuum* de vivero. En el extremo derecho se muestran las plantas control sin inocular.

Patogenicidad de *Phytophthora cactorum* en *Petunia* x híbrida sp.

El aislado de *P. cactorum* (LEV6745) fue patogénico en las plantas de *Petunia* x híbrida sp. inoculadas. Los primeros síntomas que presentaron las plantas fue pérdida de turgencia en el tallo y amarillamiento en las hojas, posteriormente necrosis en el tallo la cual fue ascendiendo hasta que causó marchitamiento y finalmente la muerte de la planta (Figura 14).



Figura 14. Plantas de *Petunia* x híbrida sp. inoculadas con *Phytophthora cactorum*, con síntomas de marchitez.

Patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* en *Rhododendron* sp.

Las plantas inoculadas de dicha especie vegetal con los aislados LEV6688, LEV6702, LEV6711, LEV6712, LEV6720 y LEV6725 obtenidos de diferentes plantas de *Rhododendron* sp. no presentaron síntomas.

Patogenicidad de *Phytophthora tropicalis* en *Sempervivum* sp.

Las plantas inoculadas con el aislado LEV6743 de *P. tropicalis* obtenido de una planta de *Sempervivum* sp. presentaron síntomas de clorosis, marchitamiento y pudrición de hojas, seguido de una lesión necrótica en el tallo 23 días post-inoculación (Figura 15). Finalmente las hojas se tornaron de amarillas a cafés y se observó una pudrición suave. Los síntomas fueron similares a aquellos observados en las plantas de vivero. No se observaron síntomas en las plantas control. *P. tropicalis* fue reaislada del tejido de tallo

sintomático infectado e identificada morfológicamente, completándose los postulados de Koch.



Figura 15. Síntomas de pudrición en plantas de *Sempervivum* sp. ocasionados por *P. tropicalis*.

Identificación molecular de especies de *Phytophthora*

Diferentes especies del género *Phytophthora* fueron identificadas molecularmente con dos y tres genes (Cuadro 11). Con base en las características moleculares y morfológicas 46 aislados fueron identificados como *Phytophthora* y uno como *Phytophythium litorale*. Los aislados fueron identificados como *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. pseudocryptogea* y *P. tropicalis*. En el aislado de *Cyclamen persicum* no se logró determinar la especie. Los aislados LEV6698, LEV6699,

LEV6701, LEV6703, LEV6704, LEV6705, LEV6706, LEV6707 obtenidos por Díaz-Celaya (2011) también se identificaron molecularmente en Canadá.

Cuadro 11. Especies de *Phytophthora* y *Phytophythium* aisladas de plantas ornamentales con síntomas de marchitez.

No. aislado Colección Canadá	No. aislado Colección México	Especies	TC	Hospedante o sustrato	Localidad
LEV6688	PVM-1	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i> sp.	Morelia
LEV6689	PVM-2	<i>P.</i> sp.	A1	<i>Cyclamen persicum</i>	Morelia
LEV6690	PVM-3	<i>P. nicotianae</i>	A2	<i>Catharanthus roseus</i>	Morelia
LEV6691	PVM-7	<i>P. cryptogea</i>	A2	<i>Gerbera</i> sp.	Xochimilco
LEV6692	PVM-10	<i>P. capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Temixco
LEV6694	PVM-17	<i>P. pseudocryptogea</i>	A1	<i>Solenostemon</i> sp.	Cuernavaca
LEV6695	PVM-20	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuernavaca
LEV6696	PVM-24	<i>P. drechsleri</i>	A1	Suelo	Cuernavaca
LEV6697	PVM-25	<i>P. drechsleri</i>	A1	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Cuernavaca
LEV6700	PVM-32	<i>P. cryptogea</i>	A1	<i>Bellis perennis</i>	Cuernavaca
LEV6702	PVM-36	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i> sp.	Cuatla
LEV6708	PVM-59	<i>P. capsici</i>	Homotático	Suelo de <i>Capsicum annuum</i>	Cuemanco
LEV6709	PVM-60	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i> de tallo	Cuemanco
LEV6710	PVM-75	<i>P. drechsleri</i>	A1	<i>Senecio cruentus</i>	Cuemanco
LEV6711	PVM-83	<i>P. cinnamomi</i>	A2	Suelo de <i>Rhododendron</i> sp.	Cuernavaca
LEV6712	PVM-85	<i>P. cinnamomi</i>	A2	Suelo de <i>Rhododendron</i> sp.	Cuernavaca
LEV6713	PVM-102	<i>P. nicotianae</i>	A2	<i>Catharanthus roseus</i>	Cuernavaca
LEV6714	PVM-103	<i>P. nicotianae</i>	A2	<i>Catharanthus roseus</i>	Cuernavaca
LEV6715	PVM-104	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuernavaca
LEV6718	PVM-107	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Mandevilla</i> sp.	Cuernavaca
LEV6719	PVM-108	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Mandevilla</i> sp.	Cuernavaca
LEV6720	PVM-111	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i> sp.	Cuernavaca
LEV6721	PVM-115.1	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Rhododendron</i> sp.	Cuernavaca
LEV6722	PVM-115.2	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i> sp.	Cuernavaca
LEV6723	PVM-117	<i>P. nicotianae</i>	A1	<i>Catharanthus roseus</i>	Cuernavaca
LEV6724	PVM-121	<i>Phytophythium litorale</i>	A1	<i>Senecio cruentus</i>	Cuemanco
LEV6725	PVM-129	<i>P. cinnamomi</i>	A2	<i>Rhododendron</i> sp.	Cuemanco
LEV6726	PVM-134	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuemanco
LEV6727	PVM-135	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuemanco
LEV6728	PVM-136	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuemanco
LEV6729	PVM-137	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuemanco
LEV6730	PVM-138	<i>P. drechsleri</i>	A1	<i>Cineraria maritima</i>	Cuemanco
LEV6733	PVM-152	<i>P. capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Cuatla
LEV6734	PVM-153	<i>P. capsici</i>	A2	<i>Ruta graveolens</i>	Cuatla
LEV6735	PVM-154	<i>P. nicotianae</i>	A2	<i>Catharanthus roseus</i>	Cuatla
LEV6736	PVM-158	<i>P. drechsleri</i>	A1	<i>Cineraria maritima</i>	Cuatla
LEV6737	PVM-159	<i>P. pseudocryptogea</i>	A1	<i>Pentas lanceolata</i>	Cuatla
LEV6738	PVM-161	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum chinense</i>	Cuatla
LEV6739	PVM-162	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum chinense</i>	Cuatla
LEV6740	PVM-163	<i>P. capsici</i>	A1	<i>Capsicum annuum</i>	Cuatla
LEV6741	PVM-164	<i>P. capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Cuatla
LEV6742	PVM-165	<i>P. capsici</i>	A2	<i>Capsicum annuum</i>	Cuatla
LEV6743	PVM-167	<i>P. tropicalis</i>	A1	<i>Sempervivum</i> sp.	Cuatla
LEV6744	PVM-193	<i>P. cryptogea</i>	A2	<i>Senecio cruentus</i>	Cuernavaca
LEV6745	PVM-207	<i>P. cactorum</i>	Homotático	<i>Petunia</i> x híbrida sp.	Cuemanco
LEV6746	PVM-215	<i>P. cryptogea</i>	A2	<i>Senecio cruentus</i>	Cuemanco
LEV6747	PVM-219	<i>P. capsici</i>	A2	<i>Capsicum pubescens</i>	Morelia

TC = Tipo de compatibilidad. El ADN y micelio de los aislados están en la colección de C. Andre Lévesque en el departamento de Agriculture and Agri-Food Canada con los codigos mostrados en la primer columna.

Las especies detectadas con mayor frecuencia en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos fueron *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. cryptogea*, *P. pseudocryptogea* en orden de mayor a menor frecuencia y se detectó solo un aislado de las siguientes especies: *P. tropicalis*, *Phytophythium litorale*, *P. cactorum* y *Phytophthora*. sp. (Figura 16).



Figura 16. Proporción de especies de *Phytophthora* y *Phytopythium* detectadas en viveros de la Ciudad de Mexico, Michoacán y Morelos.

Especies de *Phytophthora* detectadas por estación del año 2014 a 2016

En la estación de invierno fueron detectadas *P. cactorum* (1), *P. cryptogea* (2) y *P. drechsleri* (1); durante primavera se detectaron *P. capsici* (2), *P. cinnamomi* (6) y *P. nicotianae* (3); en verano se encontraron las especies *P. capsici* (16), *P. cinnamomi* (2), *P. cryptogea* (2), *P. drechsleri* (4), *P. nicotianae* (2), *P. pseudocryptogea* (2), *Phytophthotra* sp. (1), *P. tropicalis* (1) y *Phytopythium litorale* (1), en esta estación se detectaron el mayor número de

especies de *Phytophthora*; en otoño se detectó *P. cinnamomi* (1). Las frecuencias de las especies de *Phytophthora* y *Phytopythium litorale* en las estaciones del año se muestran en la figura 17.

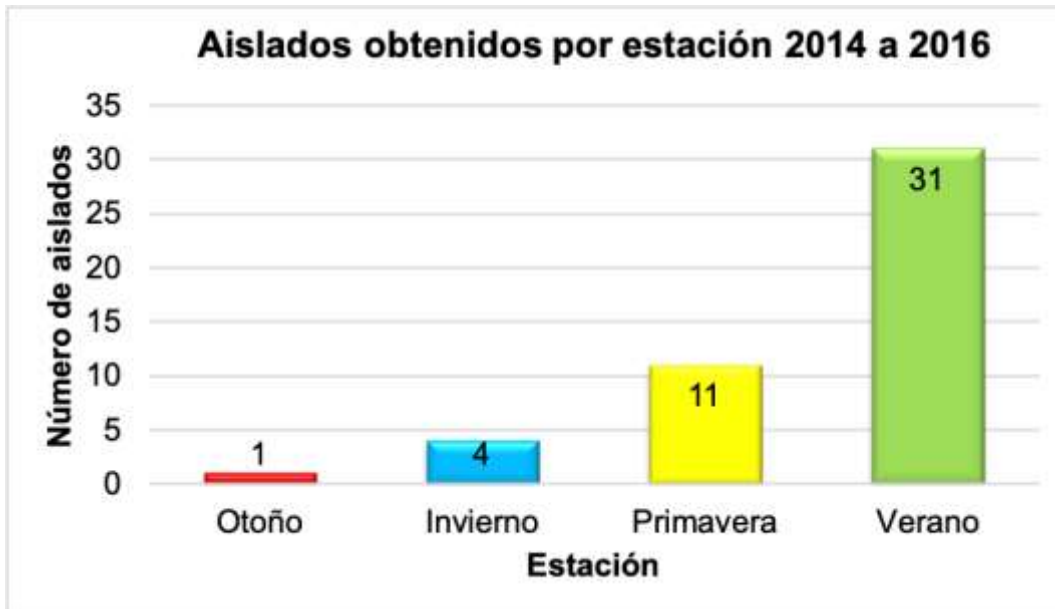


Figura 17. Frecuencia de aislados de *Phytophthora* y *Phytopythium litorale* obtenidos en las cuatro estaciones del año.

DISCUSIÓN

Los protocolos que se utilizan para aislar *Phytophthora* son de suma importancia ya que se debe considerar a la especie para elegir el procedimiento apropiado (Erwin y Ribeiro, 1996). El aislamiento de *Phytophthora* puede dificultarse cuando se utiliza solamente un procedimiento, los resultados en este trabajo demuestran que es necesario probar varios protocolos para aislar *Phytophthora*. Por ejemplo, el aislado LEV6720 de *P. cinnamomi* solo se aisló cuando se usaron hojas de azalea como tejido trampa (cebo), mientras que el aislado LEV6724 de *Phytopythium litorale* solo se aisló mediante siembra directa y con tejidos trampa pero no con el tratamiento con cloro. El aislado LEV6714 de *P. nicotianae* se aisló con siembra directa y cloro pero no con cebos (hojas de azalea). Estos resultados contribuyen para efectuar futuras investigaciones, ya que el aislamiento de *Phytophthora* sigue siendo complicado para algunos investigadores en América Latina (S. Fernández-Pavía, comunicación personal). Las especies detectadas en viveros de plantas ornamentales en México han sido reportadas en otros países. En este estudio se detectó por primera vez en México a *P. drechsleri* en *Cineraria marítima*; *P. cryptogea* en *Gerbera* sp., *Senecio cruentus* y *Bellis perennis*; *P. cactorum* en *Petunia* x híbrida; *P. capsici* en *Ruta graveolens* y *Capsicum pubescens*; *P. cinnamomi* en *Mandevilla* sp. y *Rhododendron* sp.; *P. pseudocriptogea* en *Pentas lanceolata* y *Solenostemon* sp., y *P. tropicalis* en *Sempervivum* sp. y *Phytopythium litorale* en *Senecio cruentus*. Las especies de *Phytophthora* detectadas en plantas de *Arctotis*, *Cineraria marítima*, *Pentas lanceolata*, *Ruta graveolens*, *Sempervivum* sp. y *Solenostemon* sp. son nuevos hospedantes de *Phytophthora* no reportados previamente a nivel mundial. Aunque ya existe un reporte de *P. capsici* en *Capsicum pubescens* en el estado de México (Vallejo-Gutiérrez et al., 2018), la

secuencia que alinearon con *P. capsici*_LT1534 version 11 con número de acceso PcapLT1534_SC064 de la base datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) presentó una identidad muy baja (83%). Nuestro aislado (LEV6747) fue identificado con la región ITS, β tubulina y CO1. La region ITS se alineó a la secuencia tipo CPHST_BL_33G con número de acceso MG865467 de *P. capsici* con 99.9% de identidad, 99.9% de sitios idénticos y 100% de cobertura con un fragmento de 746pb.

Estos resultados indican que los viveros en México están infestados por diversas especies de *Phytophthora* y si no se realiza un manejo adecuado este problema se irá incrementando, ya que son Estados que comercializan plantas a diferentes regiones del país y fuera del país.

La especie detectada con mayor frecuencia en los viveros muestreados fue *P. capsici*, de plantas principalmente de *Capsicum annuum*, de acuerdo con Martin et al. (2012) una de las características que la distingue a esta especie es la ausencia de clamidosporas. Aragaki y Uchida (2001), diferencian morfológicamente a *P. capsici* de *P. tropicalis* entre otros caracteres, por la ausencia de clamidosporas. Sin embargo, los aislados de *P. capsici* LEV6692, LEV6716, LEV6729, LEV6738 y LEV6742 presentaron clamidosporas, K. Lamour (comunicación personal) experto en esta especie, también ha detectado aislados de *P. capsici* con clamidosporas. Las clamidosporas son estructuras de resistencia que permiten al patógeno sobrevivir en condiciones adversas. Estas pueden estar jugando un papel muy importante en la evolución, dispersión y colonización del patógeno a lugares donde no estaba presente y adaptarse a nuevos ambientes. Algunos aislados de *P. capsici* que presentaron clamidosporas son tipo de compatibilidad A1 y otros A2. Esto indica que la

reproducción sexual podría estar ocurriendo y se estaría generando mayor diversidad genética dentro de la misma la especie o interespecífica. Deben realizarse más estudios para resolver el complejo de especies *P. capsici* y para entender más sobre su biología.

El movimiento de plantas entre viveros, la proximidad de tipos de compatibilidad y la diversidad genotípica sugieren que está ocurriendo la reproducción sexual. La presencia de ambos tipos de compatibilidad de la misma especie de *Phytophthora* o diferentes especies en la misma o diferente especie de planta hospedante dentro del mismo vivero hace suponer que pueden estar ocurriendo procesos de hibridación, lo que podría llevar al surgimiento de nuevas especies. La presencia de diversas especies de *Phytophthora* con tipos de compatibilidad diferentes detectada en este estudio sugiere que podrían surgir híbridos y nuevas especies en los viveros comerciales. Existe un reporte previo de la presencia de ambos tipos de compatibilidad en plantas de vinca en viveros de Sinaloa, México (Álvarez-Rodríguez et al., 2016). La hibridación podría estar jugando un papel evolutivo importante en la transferencia de material genético dentro de este género (Stukenbroock 2016, Bertier et al., 2013), como ocurre entre *P. cactorum* x *P. hedraiandra* (Man in 't Veld et al., 2007), *P. nicotianae* x *P. cactorum* (Bonants et al., 2000). Asimismo se ha demostrado entre diferentes especies de *Phytophthora* y plantas hospedantes, tal es el caso de las cruzas entre *P. capsici* aislado de calabaza y *P. tropicalis* de *Rhododendron* que hibridizan (Donahoo y Lamour, 2008). La hibridación entre especies podría estar incrementándose a medida que se intensifica el comercio de plantas infectadas, lo que representa un riesgo potencial en sistemas de producción agrícola, parques, bosques y jardines.

Con base en las diferentes colectas realizadas en los viveros de plantas ornamentales durante las cuatro estaciones del año (invierno, primavera, verano y otoño), se detectó variación del número de especies obtenidos en cada estación. De 47 aislados caracterizados molecularmente, uno fue obtenido durante la estación de otoño, cuatro en invierno, 11 en primavera y 31 en verano. Nuestros datos concuerdan con lo mencionado por Erwin y Ribeiro (1996), quienes mencionan que el patógeno se presenta con mayor frecuencia en el verano por las condiciones climatológicas que prevalecen en esta estación como la humedad alta, consecuencia de las lluvias abundantes, lo cual favorece su reproducción y diseminación. Esto indica que en esta época del año deben extremarse precauciones en los viveros, como evitar la reutilización de suelo de plantas que se mueren, así como macetas y agua de riego, entre otras.

Aunado a la diversidad de especies detectadas en viveros, la forma de la colonia también varió entre aislados de una misma especie, este es un carácter utilizado para caracterizarlos, ya que cuando se obtienen patrones de crecimiento distintivos entre las cepas (Erwin y Ribeiro, 1996), esto sugiere que existe variabilidad genética intraespecífica. Rodríguez-Moreno et al. (2004) utilizan este parámetro como indicador de la patogenicidad de los aislados. Aunque en el presente estudio no se correlacionó la forma de la colonia con alguna característica en particular, se puede inferir a partir de los patrones de crecimiento observado, que existe variabilidad genética.

Los viveros de México se caracterizan por tener heterocultivos en plantas y material vegetal, haciéndolos extremadamente complejos para el manejo de enfermedades causadas por *Phytophthora*. Las plantas generalmente se trasplantan varias veces a diferentes objetos de propagación a partir de semillas,

plántulas y esquejes que pueden traer consigo *Phytophthora*, y se trasladan del lugar de propagación a invernaderos de producción. Las especies de *Phytophthora* representan un riesgo potencial en jardines de México debido a la falta de regulación en la distribución de plantas. Las malas prácticas de manejo realizadas por los productores en los viveros de México deben mejorarse para evitar la diseminación del patógeno hacia áreas donde no estaba presente, como parques, jardines, bosques, viveros y campos de cultivo o áreas reforestadas. *Phytophthora* infecta un amplio rango de especies de plantas, lo que sugiere que otros géneros de las familias de las plantas que se detectaron infectadas podrían estar también siendo afectadas. Esto puede causar grandes pérdidas económicas, y la alteración de ecosistemas ya que puede causar la muerte de las plantas afectadas. Las rutas comerciales de entrada de las especies de *Phytophthora* detectadas en México aún se desconocen, así como el centro de origen de muchas de estas. El comercio global es considerado como una de las principales vías entre el ecosistema invadido y el hábitat original (Moralejo et al., 2009).

Uno de los objetivos más importantes es prevenir la introducción de *Phytophthora* en los viveros a través de material vegetal infectado. Es necesaria una reevaluación de las estrategias actuales de manejo en México para mejorarlas, particularmente mediante el uso de enfoques que tomen en cuenta los puntos críticos de control en viveros donde el riesgo de propagación de este importante patógeno de plantas puede ser mitigado; para lo cual la capacitación del personal que labora en los viveros es de suma importancia.

CONCLUSIONES

1. El uso de diferentes procedimientos de aislamiento de *Phytophthora* incrementa las posibilidades de lograr una exitosa obtención del patógeno.
2. Esta investigación provee una idea general de la problemática y situación actual causada por especies de *Phytophthora* en los viveros de plantas ornamentales de la región centro de México.
3. La presencia de *Phytophthora* tanto en tejido enfermo como en el sustrato en viveros que producen plantas ornamentales podría a futuro causar grandes pérdidas económicas a los productores si no utilizan medidas de manejo fitosanitarias adecuadas.
4. Esta investigación nos da un panorama preliminar del rango de hospedantes que tienen las especies de *Phytophthora* detectadas en viveros de la región centro de México.
5. El medio agar ejote es útil y de bajo costo, por lo que representa una alternativa para inducir la formación de oosporas de aislados de *Phytophthora* que no las forman en medios convencionales de V8 y harina de maíz agar.
6. La presencia de los tipos de compatibilidad A1 y A2 de la misma o diferentes especies de *Phytophthora* detectados en un mismo vivero en la misma o diferente planta hospedante en este estudio sugiere que la recombinación genética esté ocurriendo, con la posible formación de híbridos y el surgimiento de nuevas especies en los viveros comerciales.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

1. El impacto económico que causan las especies de *Phytophthora* en viveros, campos de cultivo y bosques se desconoce en México, por lo que se requiere determinarlo.
2. Se necesitan realizar muestreos en viveros de todo México para detectar las especies de *Phytophthora* presentes en viveros de plantas ornamentales.
3. Se requiere continuar con este tipo de investigaciones para identificar la formación de posibles híbridos, nuevas especies de *Phytophthora*, su papel ecológico y virulencia en viveros de plantas ornamentales de México.
4. Los productores en los viveros deben realizar prácticas de prevención y manejo para evitar la diseminación de *Phytophthora*.
5. La capacitación del personal de trabajo y dueños de viveros sobre mejores prácticas de manejo por parte de personal especializado es necesaria para prevenir la diseminación de *Phytophthora*.

LITERATURA CITADA

- Álvarez-Rodríguez B, Carillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Santos-Cervantes ME. Characterization of *Phytophthora nicotianae* causing vinca blight in urban areas and ornamental nurseries in Culiacan, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 2016; 34:242-257.
- Aragaki M, Uchida JY. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia.* 2001; 93:137-145.
- Babadoost M, Pavon C. Survival of oospores of *Phytophthora capsici* in soil. *Plant Dis.* 2013; 97:1478-1483.
- Bakkeren G, Kronstad JW, Lévesque CA. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia.* 2000; 92:510-521.
- Bala K, Robideau GP, Désaulniers N, de Cock AWAM, Lévesque CA. Taxonomy DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia.* 2010; 25:22-31.
- Bertier L, Leus L, D'hondt L, De Cock AWAM, Höfte M. Host adaptation and speciation through hybridization and polyploidy in *Phytophthora*. *PLoS ONE.* 2013; 8:1-15
- Bienapfl JC, Balci Y. Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's nursery trade. *Plant Dis.* 2014; 98:134-144.
- Bilodeau GJ, Lévesque CA, De Cock AWAM, Duchaine C, Brière S, Uribe P, Martin FN, Hamelin R.C. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. *Phytopathology.* 2007; 97:632-642.
- Bonants PJM, Hagenaar-de Weerd M, Man in 't Veld WA, Baayen RP. Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology.* 2000; 90:867-874.
- Cacciola SO, Pane A, Martini P, Agosteo GE, Raudino F, Magnano di San Lio G. Recovery of *Phytophthora* species from potted ornamentals in commercial nurseries in Italy. *J. Plant Pathol.* 2008; 90:S2.185.
- Callaghan S, Guest D. Globalisation, the founder effect, hybrid *Phytophthora* species and rapid evolution: new headaches for biosecurity. *Australas. Plant Pathol.* 2015; 44:255-262.
- Černý K, Tomšovský M, Mrázková M, Strnadová V. The present state of knowledge on *Phytophthora* spp. diversity in forest and ornamental woody plants in the Czech Republic. *New Zeal J For Sci.* 2011; 41:(Supplement). S75-S82.
- Denton G, Denton J, Waghorn I, Henricot B. *Phytophthora* diversity in UK gardens. *J. Plant Pathol.* 2008; 90:S2. 186.

- Drew J, Anderson N, Andow D. Conundrums of a complex vector for invasive species control: a detailed examination of the horticultural industry. *Biological Invasions*. 2010; 12:2837-2851.
- Donahoo RS, Lamour KH. Interspecific hybridization and apomixis between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycologia*. 2008; 100:911-920.
- Erwin DC, Ribeiro OK (Ed.). *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, 1996.
- Fernández-Pavía SP, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G. *Phytophthora* in México. En: Lamour K. (Ed.). *Phytophthora a global perspective*. Cambridge, MA: CAB International, 2013:166-177.
- Hardy GE, Sivasithamparam K. *Phytophthora* spp. Associated with container-grown plants in nurseries in Western Australia. *Plant Dis*. 1988; 72:432-437.
- Jeffers SN, Schnabel G, Smith JP. First report of resistance to mefenoxam in *Phytophthora cactorum* in the United States and elsewhere. *Plant Dis*. 2004; 88:576-576.
- Lévesque CA, de Cock AWAM. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res*. 2004; 108:1363-1383.
- Lamour KH, Daughtrey ML, Benson DM, Hwang J, Hausbeck MK. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Dis*. 2003; 87:854-858.
- Linderman RG, Zeitoun F. *Phytophthora cinnamomi* causing root rot and wilt of nursery-grown native western azalea and salal. *Plant Dis. Rep*. 1977; 61:1045-1048.
- Man in 't Veld WA, De Cock AWAM, Summerbell RC. Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. *Eur. J. Plant Pathol*. 2007; 117:25-33.
- Martin FN, Tooley PW. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*. 2003; 95:269-284.
- McLeod A, Coertze S. First report of *Phytophthora cryptogea* on *Osteospermum* spp. in South Africa. *Plant Dis*. 2007; 91:322.
- Moralejo E, Pérez-Sierra A, Álvarez LA, Belbahri L, Lefort F, Descals E. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathol*. 2009; 58:100-110.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi,

- fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:6115-6116.
- Mundo-Ocampo J. 2006. *El vivero ornamental*. 1st ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 461 pp.
- Olson HA, Benson DM. Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. *Plant Dis.* 2011; 95:1013-1020.
- Parke JL, Grünwald NJ. A systems Approach for management of pests and pathogens of nursery crops. *Plant Dis.* 2012; 96:1236-1244.
- Pérez-Sierra A, Jung T. 2013. *Phytophthora* in woody ornamental nurseries. En: Lamour K. (Ed.). *Phytophthora a global perspective*. Cambridge, MA: CAB International, 2013:166-177.
- Pérez-Sierra A, Mora-Sala B, León M, García-Jiménez J, Abad-Campos P. Enfermedades causadas por *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales *Bol. San. Veg. Plagas.* 2012; 38:143-156.
- Prigigallo MI, Mosca S, Cacciola SO, Cooke DEL, Schena L. Molecular analysis of *Phytophthora* diversity in nursery-grown ornamental and fruit plants. *Plant Pathol.* 2015; 64:1308-1319.
- Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJ, Ristaino JB, Lévesque CA. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour.* 2011; 11:1002–1011.
- Schwingle BW, Smith JA, Blanchette RA. *Phytophthora* species associated with diseased woody ornamentals in Minnesota nurseries. *Plant Dis.* 2007; 91:97-102.
- Vallejo-Gutiérrez AJ, Mejía-Carranza J, García Velasco R, Ramírez-Gerardo MG. Response of *Capsicum pubescens* genotypes to damage caused by the fungal wilt complex. *Rev. Mex. Fitopatol.* 2018; 37: 50-70.
- Warfield CY, Hwang J, Benson DM. *Phytophthora* blight and dieback in North Carolina nurseries during a 2003 survey. *Plant Dis.* 2008; 92:474-481.
- Yakabe LE, Blomquist CL, Thomas SL, MacDonald JD. Identification and frequency of *Phytophthora* species associated with foliar diseases in California ornamental nurseries. *Plant Dis.* 2009; 93:883-890.

CAPITULO II

TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE *Phytophthora capsici*, *P. drechsleri* Y *P. cinnamomi* COEXISTEN EN PLANTAS ORNAMENTALES DE VIVERO

Soto-Plancarte A, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, López-Pérez L, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, Álvarez-Vargas JE. 2018. *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-5

Parte de este capítulo fue aceptado y publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología.

RESUMEN

La presencia de ambos tipos de compatibilidad de especies de *Phytophthora* en la misma maceta no ha sido reportada en hospedantes de viveros comerciales en México. Se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible que ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de *Phytophthora* esten coexistiendo en una misma planta hospedante?. El objetivo de esta investigación fue determinar si ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de especies de *Phytophthora* pueden estar presentes en el mismo hospedante, y si las oosporas se forman *in planta* bajo condiciones controladas de invernadero. Se obtuvieron aislados de *Phytophthora* de viveros comerciales de la Ciudad de México y el estado de Morelos durante 2015. Se detectaron los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* y *P. drechsleri* en plantas marchitas de *Capsicum annuum* (tallo) y *Petunia* x híbrida (rizosfera), en Cuernavaca y Xochimilco, respectivamente. Asimismo, *P. capsici* A1 y *P. cinnamomi* A2 fueron detectados en plantas de *Rhododendron* sp. en Cuernavaca, Morelos. Los

aislados de *Phytophthora* de *Capsicum annuum* y *Petunia* x híbrida coinoculados *in planta* formaron oosporas bajo condiciones de invernadero en sus respectivos hospedantes. Se reaisló a *Phytophthora* a partir de las plantas inoculadas, e identificó con herramientas morfológicas y moleculares. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* y *P. drechsleri*, así como *P. capsici* y *P. cinnamomi* se encuentran coexistiendo en plantas de vivero, esto sugiere que la recombinación sexual y variación genética están ocurriendo. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de estas especies de *Phytophthora* se reportan por primera vez en viveros de plantas ornamentales en México.

ABSTRACT

The presence of both mating types of *Phytophthora* species in the same pot has not been reported in hosts of commercial nurseries in Mexico. The following research question was raised: Is it possible that both mating types (A1 and A2) of *Phytophthora* are coexisting in the same host plant?. The aim of this investigation was to determine if both mating types (A1 and A2) of *Phytophthora* species may be present in the same host, and if oospores are formed *in planta* under controlled greenhouse conditions. Isolates of *Phytophthora* were collected in commercial nurseries of Mexico City and Morelos state during 2015. Mating types A1 and A2 of *P. capsici* and *P. drechsleri* were detected on wilted plants of *Capsicum annuum* (stem) and *Petunia* x hybrid (rhizosphere) in Cuernavaca and Xochimilco, respectively. Also, *P. capsici* A1 and *P. cinnamomi* A2 were detected in *Rhododendron* sp. plants in Cuernavaca, Morelos. *Phytophthora* isolates from *Capsicum annuum* and *Petunia* x hybrid coinoculated *in planta* formed oospores in their respective host under greenhouse conditions. *Phytophthora* was reisolated from inoculated plants, and identified with morphological and molecular tools. Mating types A1 and A2 of *P. capsici* and *P. drechsleri*, as well as *P. capsici* y *P. cinnamomi* occur simultaneously within nursery plants, this suggests that sexual recombination and genetic variation are occurring. Mating types A1 and A2 of these *Phytophthora* species are reported for the first time in ornamental plants in Mexican nurseries.

INTRODUCCIÓN

Las plantas ornamentales *Petunia* x híbrida y *Rhododendron* y plantas de chile para jardines de casa son producidas en viveros del estado de Morelos y la Ciudad de México, dos de las localidades más importantes que cultivan plantas ornamentales para macetas en México (Mundo-Ocampo, 2006). Sin embargo, la producción está limitada por enfermedades de las raíces causadas por varias especies de *Phytophthora*. *P. capsici* es un patógeno altamente destructivo con un rango de hospederos de más de 50 especies de plantas, incluidas solanáceas, cucurbitáceas, fabáceas y ornamentales en todo el mundo (Lamour et al., 2012, Fernández-Pavía et al., 2013); por otro lado, se ha reportado que *P. drechsleri* afecta a más de 25 especies de plantas hortícolas y ornamentales (Lamour et al., 2012, Fernández-Pavía et al., 2013, Olson et al., 2011, Truong et al., 2012); por otra parte, *P. cinnamomi* es una de las especies patógenas de plantas más destructivas. Infecta alrededor de 5000 especies de plantas en el mundo (Hardham y Blackman, 2018). En México, dos de los patógenos de raíz más importantes son *P. capsici* y *P. cinnamomi*. Estas especies de *Phytophthora* son heterotálicas y requieren la presencia de tipos de compatibilidad opuestos (A1 y A2) para la formación de oosporas. La presencia de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici*, *P. drechsleri* y *P. cinnamomi* en el mismo vivero en diferentes hospedantes se ha detectado en estudios previos realizados en el laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH en México (Díaz-Celaya, 2011). Sin embargo, la presencia de ambos tipos de compatibilidad de estas especies en el mismo hospedante en viveros ornamentales no ha sido documentada. Se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible que ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de *Phytophthora* esten coexistiendo en una misma planta hospedante?. Se planteó la siguiente hipótesis: Los tipos de

compatibilidad (A1 y A2) de *Phytophthora* coexisten en una misma planta hospedante y forman oosporas. El objetivo de esta investigación fue determinar si ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de especies de *Phytophthora* pueden estar presentes en el mismo hospedante, y si las oosporas se forman *in planta* bajo condiciones controladas de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización morfológica

Los aislados de *Phytophthora* se obtuvieron de plantas de viveros comerciales de *Capsicum annuum*, *Petunia* x híbrida y *Rhododendron* sp. con síntomas de marchitez en el estado de Morelos y Ciudad de México, México, durante el 2015. Tejido de la planta de *Capsicum annuum* y *Rhododendron* sp., suelo de la rizosfera de *Petunia* x híbrida de plantas enfermas con síntomas de marchitamiento y pudrición de raíz se analizaron para el aislamiento del patógeno. Los tejidos de la planta se enjuagaron con agua de la llave, se cortaron pequeños fragmentos de tejido enfermo, se colocaron en medio NARPH-V8 (Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50% de natamicina, 50% de lactosa)], ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), PCNB (0.10 g L⁻¹) e himexazol (0.075 g L⁻¹) e incubados a 25 °C en la oscuridad. Las muestras de suelo de la rizosfera fueron utilizadas en un bioensayo con hojas de *Rhododendron* sp. como cebo. Seis hojas de *Rhododendron* sp. desinfectadas se colocaron sobre suelo inundado (10 g de suelo: 20 mL de agua estéril) y se incubaron durante 48 h a 25 °C, posteriormente se cortó el peciolo necrosado, se desinfectó con una solución de cloro comercial a 10% (0.6% de hipoclorito de sodio) durante 30 seg, se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces, se secaron con toallas de papel estériles, se transfirieron a medio NARPH-V8 e incubaron como antes se mencionó. Los aislados de *Phytophthora* se identificaron preliminarmente mediante observaciones bajo el microscopio óptico y se transfirieron a medio de agar harina de maíz (CMA, 17 g L⁻¹) para obtener cultivos puros por el método de punta de hifa. Se produjeron esporangios y caracterizaron morfológicamente incubando bloques de agar V8 más micelio en agua destilada estéril y/o extracto

de suelo no estéril a 25 °C bajo luz fluorescente continua durante tres a cinco días.

Tipos de compatibilidad e inoculaciones

El tipo de compatibilidad de los aislados de *Phytophthora* se determinó cruzándolos con cepas de tipo de compatibilidad A1 y A2 ya conocidos de *P. capsici* y *P. cinnamomi* en agar V8 a 25 °C en la oscuridad y se examinaron después de 20 días. Posterior a la determinación del tipo de compatibilidad se cruzaron los aislados de *Phytophthora capsici* (A1 y A2), *P. drechsleri* (A1 y A2) y *P. capsici* A1 con *P. cinnamomi* A2, obtenidos de Chile, petunia y azalea respectivamente.

Producción de oosporas *in planta*

Las cruces de tipos de compatibilidad opuestos *in planta* se llevó a cabo mediante la inoculación de aislados de *Phytophthora* en plantas sanas de *Capsicum annuum*, *Petunia* x híbrida y *Rhododendron* sp. El inóculo consistió en bloques de agar V8 con micelio y esporangios. Se colocó un bloque de un aislado A2 de *Phytophthora* en la base del tallo, mientras que un segundo bloque de un aislado de *Phytophthora* A1 se colocó a tres centímetros del primer bloque. Las plantas control se inocularon con bloques de agar V8 sin el patógeno. Las plantas se colocaron en charolas de plástico las cuales se inundaron durante 24 h para favorecer el desarrollo de la enfermedad. La formación de oosporas *in planta* se confirmó observando bajo un microscopio óptico a 40x muestras de tejido necrótico del tallo. Los tejidos se lavaron cuidadosamente en agua con jabón, se enjuagaron con agua destilada estéril, se clarificaron en etanol al 96% hirviendo durante 40 seg en el microondas, se enfriaron durante 30 min y se repitió el paso

de clarificación con etanol durante 40 seg. Posteriormente, el tejido se montó en un portaobjetos de vidrio.

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se obtuvo cultivando los aislados en V8 líquido clarificado al 2% a 21 °C durante 15 a 20 días, y se siguió el protocolo de Möller et al., (1992) con las modificaciones descritas previamente por Robideau et al., (2011). En el paso final, la pastilla de ADN se resuspendió en TE 0.1X que contenía 50 µg/mL de RNasa A e incubó a 65 °C durante 10 minutos.

Amplificación de ADN

La región ITS (espaciador transcrito interno) del ADN ribosomal se amplificó empleando los oligonucleótidos UN-up18S42 (Bakkeren et al., 2000), UN-lo28S1220 (Bala et al., 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 e ITS4 (Lévesque y De Cock, 2004). Las secuencias parciales del gen mitocondrial CO1 (subunidad 1 de la citocromo c oxidasa) se amplificaron con los oligonucleótidos OomCoxILevup y Fm85mod (Martin y Tooley, 2003), y el nuclear β tubulina con los oligonucleótidos Oom-Btub-up415 y Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau et al., 2007).

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando las siguientes condiciones: todas las reacciones tuvieron un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min y una etapa de extensión final a 72 °C durante 8 a 10 min. La región ITS se amplificó con los oligonucleótidos Oom-up18S67 y UN-lo28S1220 se realizó con 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 45 s y 72 °C durante 2 min. La misma región se amplificó con los oligonucleótidos UN-up18S42 e ITS4

se utilizaron 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 68 °C durante 45 s y 72 °C durante 1.5 min.

Las condiciones de amplificación para CO1 fueron las mismas que las descritas por Robideau et al., (2011). La amplificación del gen β tubulina para aislados de *P. capsici* fue de 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min. Para los aislados de *P. drechsleri* se realizó una PCR touch-down siguiendo el protocolo descrito por Blair et al., (2008), disminuyendo la temperatura de 68 a 58 °C.

Se utilizó un analizador genético Applied Biosciences Prism® 3130xl para generar las secuencias de ADN a partir de las reacciones de secuenciación de amplificación. Las secuencias fueron ensambladas y editadas para obtener secuencias consenso, alineadas con secuencias publicadas (Phytophthora Q-bank, <http://www.q-bank.eu/fungi/DefaultInfo.aspx?Page=Phytophthora%20Methodologies>), y analizadas utilizando el programa Blast con el software Geneious v. 8.1, (www.geneious.com) para determinar los porcentajes de identidad. Las secuencias se subieron al NCBI GenBank.

Un análisis filogenético multi-loci de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana se construyó con secuencias tipo para confirmar la identidad de los aislados en el portal de ciencia CIPRESS v. 3.3 (Miller et al., 2010).

RESULTADOS

La identificación de los aislados mediante caracterización morfológica y molecular y análisis filogenéticos se logró satisfactoriamente. Los análisis filogenéticos concatenados de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana corroboraron la identidad de los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* al agruparse con secuencias tipo de *Phytophthora* (Figura 1). Todos los aislados tuvieron un 99% de similitud con secuencias disponibles en la base de datos de Phytophthora – Q-bank

(<http://www.q-bank.eu/bioloMICSSequences.aspx?file=Bacteria&file=FUNGI&file=Arthropods&file=Nematodes&file=Phytopl&file=Plants&file=Virus&file=Sequence&wsize=20>). *Phytophthora capsici* LEV6716 (A1) and LEV6717 (A2) and *Phytophthora drechsleri* LEV6731 (A1) and LEV6731 (A2).

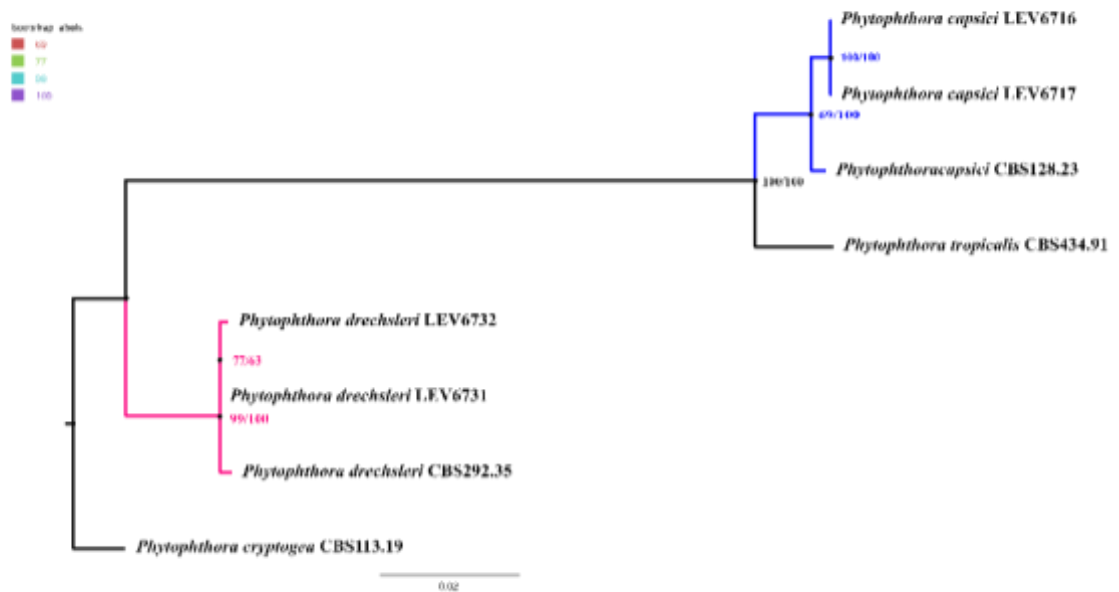


Figura 1. Análisis filogenético de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana derivado de la concatenación de los genes ITS, β tubulina y CO1 de *P. capsici* y *P. drechsleri* con *P. cryptogea* como grupo externo. Se muestran los valores bootstrap y probabilidades posteriores del análisis de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana en porcentajes en los puntos de las ramas, respectivamente. La barra de escala indica 0.02 sustituciones por sitio por rama.

Se obtuvieron aislados de *Phytophthora* con tipos de compatibilidad A1 y A2 del suelo de la rizosfera de una planta de *Petunia* x híbrida que correspondieron a *P. drechsleri*. Los de tejido de tallo de una planta de *C. annuum* pertenecieron a *P. capsici*. Un aislado de *P. capsici* con tipo de compatibilidad A1 y uno de *P. cinnamomi* A2 fueron obtenidos de *Rhododendron* sp. del tallo de la planta. Los aislados se encuentran en la colección del laboratorio de Patología Vegetal del IIAF de la UMSNH. También, fueron depositados en la colección de cultivos del

departamento de Agricultura y Agroalimentación de Canadá Agriculture and (Agriculture and Agri-Food Canada), Ottawa, Canadá.

Las plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con aislados de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* mostraron clorosis, defoliación, marchitez y necrosis en el tallo cinco días después de la inoculación (Figura 2). Las plantas de *Petunia* x híbrida inoculadas con tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. drechsleri* mostraron síntomas de marchitez 10 días después de la inoculación (Figura 4). Los aislados se reaislaron a partir de las lesiones de las plantas y se identificaron morfológicamente con lo cual se completaron los postulados de Koch. Las plantas de *Rhododendron* sp. no mostraron síntomas de enfermedad. Las plantas control se mantuvieron sanas. Se observaron abundantes oosporas en la epidermis de los tallos de plantas inoculadas de *C. annuum* y *Petunia* x híbrida (Figuras 3 y 5), siete y 10 días después de la inoculación, respectivamente.



Figura 2. Plantas inoculadas. **A.** Primer día de la inoculación; **B.** Síntomas de marchitez, pérdida de turgencia, defoliación y necrosis en la base del tallo en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con ambos tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* en la misma planta.



Figura 3. Oospora de *P. capsici* formada *in planta* en tejido de raíz de *Capsicum annuum* coinoculados con aislados de tipo de compatibilidad A1 y A2.



Figura 4. Síntomas de marchitez, pérdida de turgencia y necrosis 10 días después de la inoculación en plantas de *Petunia* x híbrida inoculadas con ambos tipos de compatibilidad A1 (PVM-140.1) y A2 (PVM-140.2) de *P. drechsleri* en la misma planta.

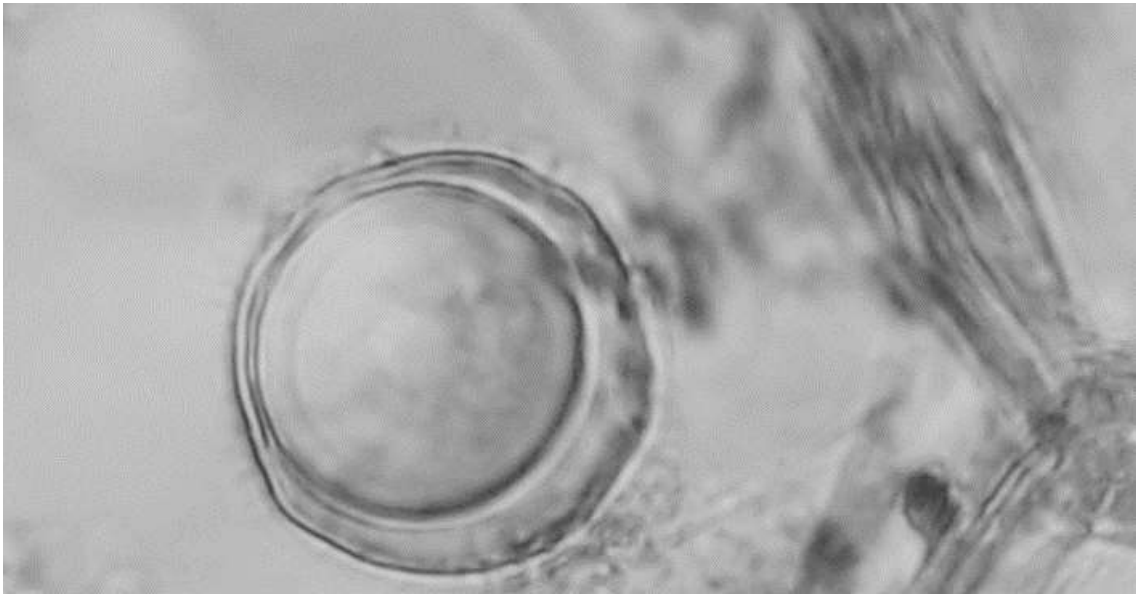


Figura 5. Oospora de *P. drechsleri* formada *in planta* en tejido de raíz y tallo de *Petunia* x híbrida coinoculados con aislados de tipo de compatibilidad A1 y A2.

DISCUSIÓN

La presencia de ambos tipos de compatibilidad en aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri*, así como el A1 de *P. capsici* y A2 de *P. cinnamomi* en la misma planta y suelo de rizosfera, indica que la reproducción sexual y variación genética están ocurriendo en las plantas de vivero. La formación de oosporas podría servir como inóculo primario (Lehtinen y Hannukkala, 2004), ya que la reutilización de suelo y macetas infestadas se produce en la mayoría de viveros visitados en México, lo que contribuye a la presencia anual de *Phytophthora* en las plantas de vivero. Las oosporas pueden ser estructuras resistentes a largo plazo en viveros, lo que permite una nueva colonización del hospedante y pueden introducir nuevos genotipos recombinantes de *Phytophthora* en áreas donde no se encontraban. Debido a que los viveros comerciales muestreados distribuyen plantas a muchos estados de la República Mexicana y algunos al extranjero, la diseminación de estos patógenos en nuevas áreas agrícolas y forestales y zonas urbanas es altamente probable. Un factor de riesgo adicional es el amplio rango de hospedantes de *P. capsici* y *P. drechsleri*, y aun mayor de *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro, 1996, Lamour et al., 2012). Adicionalmente, aislados con resistencia a fungicidas pueden desarrollarse y la enfermedad que ocasionen será más difícil de manejar. Los productores deben mejorar las prácticas de manejo recomendadas por Parke y Grünwald (2012), de acuerdo con sus recursos económicos, para reducir las pérdidas. Este es el primer reporte de los tipos de apareamiento A1 y A2 en un mismo hospedante, de *P. capsici* (en *Capsicum annum*), *P. drechsleri* (en *Petunia* x híbrida) y *P. capsici* y *P. cinnamomi* (en *Rhododendron* sp.) detectados en plantas comerciales de vivero en México.

CONCLUSIONES

1. Este trabajo mostró que ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* ocupan el mismo nicho en ambientes de vivero.
2. La presencia de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* en *Capsicum annuum* y *Petunia* x híbrida respectivamente, así como *P. capsici* (A1) y *P. cinnamomi* (A2) en *Rhododendron* sp. ocupando el mismo nicho en ambientes de vivero sugiere que se pueden desarrollar híbridos de oomicetes en plantas de viveros de México.
3. Este estudio sugiere que eventos de alopoliploidía entre *P. capsici* (A1) y *P. cinnamomi* (A2) y/o entre otras especies de *Phytophthora* podría estar ocurriendo en viveros.
4. Esta investigación sugiere que la formación de oosporas está ocurriendo en viveros, lo cual tiene grandes implicaciones biológicas y de bioseguridad en viveros de México.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

1. Futuros trabajos se requieren para identificar la formación de posibles híbridos, de nuevas especies de *Phytophthora* y su papel ecológico y virulencia en viveros de plantas ornamentales de México.
2. Es necesario implementar medidas apropiadas de manejo fitosanitario en los viveros para reducir riesgos de dispersión de especies de *Phytophthora*.

LITERATURA CITADA

- Bala K., Robideau G.P., De'saulniers N., De Cock A.W.A.M. and Lévesque C.A. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 25:22-31.
- Bakkeren G., Kronstad, J.W. and Lévesque C.A. 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* 92:510-521.
- Bilodeau G.J., Lévesque C.A., De Cock A.W.A.M., Duchaine C., Brière S., Uribe P., Martin F.N., and Hamelin R.C. 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. *Phytopathology* 97:632-642.
- Blair J.E., Coffey, M.D., Park, S.Y., Geiser, D.M. and Kang, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45:266-277.
- Fernández-Pavía S.P., Díaz-Celaya M. and Rodríguez-Alvarado G. 2013. *Phytophthora* in Mexico. Pp:215-221. *In: Lamour K (eds.). Phytophthora: A global perspective.* CABI Press. Boston, MA., USA. 244p.
- Hardham A.R. and Blackman L.M. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 19: 260-285.
- Lamour K.H., Stam R., Jupe J. and Huitema E. 2012. The oomycete broad host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337.
- Lehtinen A. and Hannukkala A. 2004. Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agricultural and Food Science* 13:399-410.
- Martin F.N. and Tooley P.W., 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95:269-284.
- Miller M.A., Pfeiffer W. and Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.
- Möller E.M., Bahnweg G., Sandermann H. and Geiger H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20:6115-6116.
- Mundo-Ocampo J. 2006. El vivero ornamental. First Edition. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 461 p.

- Olson H. A., Carbone I. and Benson D. M. 2011. Phylogenetic history of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* isolates from floriculture crops in North Carolina greenhouses. *Phytopathology* 101:1373-1384.
- Parke J.L. and Grünwald N.J. 2012. A systems approach for management of pests and pathogens of nursery crops. *Plant Disease* 96:1236-1244.
- Robideau G.P., De Cock A.W., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala, K., Chitty D.W., Désaulniers N., Eggertson Q.A., Gachon C.M.M., Hu C.H., Küpper F.C., Rintoul T.L., Sarhan E., Verstappen E.C.P., Zhang Y., Bonants P.J., Ristaino J.B. and Lévesque C.A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11:1002-1011.
- Truong, N.V., Burgess, L. and Liew, E. 2012. Cross-infectivity and genetic variation of *Phytophthora* isolates from chilli and black pepper in Vietnam. *Australasian Plant Pathology* 41:439-447.

CAPITULO III

FILOGENIA Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS COMPLEJOS *Phytophthora capsici* Y *Phytophthora cryptogea* EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES EN EL CENTRO DE MÉXICO

RESUMEN

Los datos moleculares con secuencias de ADN han sido una herramienta útil para resolver las relaciones filogenéticas entre grupos de especies. El objetivo de este estudio fue investigar las relaciones filogenéticas y diferenciación genética de aislados de viveros de los complejos de especies de *Phytophthora capsici* y *P. cryptogea* provenientes de diferentes hospedantes, distribución geográfica y tipo de compatibilidad. Se obtuvieron 43 aislados de los complejos *P. cryptogea* y *P. capsici* de plantas de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos durante el 2014, 2015 y 2016. Se realizó un análisis multilocus de Máxima Verosimilitud y Bayesiano incluyendo la región ITS del ADN ribosomal, el gen nuclear β -tubulina y el gen mitocondrial CO1, adicionalmente secuencias de los Ex-Type de las especies de cada complejo fueron incluidas. Las corridas fueron por 20 millones de generaciones. La combinación de datos de secuencias de la región ITS, β -tubulina y CO1 generaron un conjunto de datos de 2,407 pares de bases. Los análisis filogenéticos y toco genéticos en *P. capsici* y *P. tropicalis* soportan a las distintas especies, como lo han reportado en otros estudios. La filogenia con la región ITS de los aislados que producen clamidosporas del complejo *P. capsici* indicó la presencia de tres filo especies, *P. capsici*, *Phytophthora*_aff_glovera y *Phytophthora* sp._nov. Se detectaron varios haplotipos compartidos dentro de

aislados de *P. capsici*, lo cual podría tener repercusiones en estudios futuros, como estimar, si hay hibridación y diseminación de especies a diferentes regiones del país si no se realiza un manejo adecuado en los viveros. Los dos análisis multilocus (Máxima Verosimilitud y Bayesiano) mostraron que el complejo *P. cryptogea* comprende diferentes clados taxonómicos en los viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Los aislados de *P. drechsleri* forman un grupo monofilético con bajos niveles de diversidad intraespecífica, mientras *P. cryptogea* es parafilético con mayor diversidad. Las filogenias de este estudio de los subclados 2b y 8a muestran varios linajes filogenéticos que justifican una investigación más amplia de delimitación de especies, coalescencia y filogenómica.

ABSTRACT

The molecular data with DNA sequences has been a useful tool for solving phylogenetic relationships between groups of species. The objective of this study was to investigate the phylogenetic relationships and genetic differentiation of nursery isolates of the *Phytophthora capsici* and *P. cryptogea* species complexes from different hosts, geographic distribution and mating type. Forty three isolates of the *P. cryptogea* and *P. capsici* complexes from nursery plants of Mexico City, Michoacán and Morelos were obtained during 2014, 2015 and 2016. A multilocus analysis of Maximum Likelihood and Bayesian was performed including the ITS region of the rDNA, the nuclear gene β -tubulin and the mitochondrial gene CO1, additionally sequences of the Ex-Type species of each complex were included. The runs were for 20 million generations. The combination of sequence data from the ITS region, β -tubulin and CO1 generated a data set of 2407 base pairs. *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* phylogenetic and toconetic analysis support different species, as they have been reported in other studies. Phylogenetic analysis using the ITS region of the isolates that produce chlamydospores of the *P. capsici* complex indicated the presence of three phylopecies, *P. capsici*, *P._aff_glovera* and *P. sp._nov.* Several shared haplotypes within *P. capsici* isolates were detected, which could have repercussions in future studies, such as estimating, if there is hybridization and dissemination of species to different regions of the country if proper management is not carried out in nurseries. The two multilocus analysis (Maximum Likelihood and Bayesian) showed that the *P. cryptogea* complex comprises different taxonomic groups in the nurseries of Mexico City, Michoacan and Morelos. *P. drechsleri* isolates form a monophyletic group with low levels of intraspecific

diversity, while *P. cryptogea* is paraphyletic with greater diversity. The phylogenies of this study of subclades 2b and 8a show several phylogenetic lineages that justify further research of species delimitation, coalescence and phylogenomics.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora capsici es un oomicete patógeno de plantas transmitido por suelo infestado. Este microorganismo presenta distribución mundial e infecta un amplio rango de hospedantes causando considerables pérdidas en cultivos de las familias Solanaceae, Cucurbitaceae y Fabaceae (Lamour et al., 2012, Gevens et al., 2008, Quesada-Ocampo y Hausbeck 2010). *Phytophthora capsici* es un microorganismo diploide, heterotálico (Erwin y Ribeiro 1996) (ocasionalmente homotálico) y se reproduce sexualmente cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se cruzan para producir oosporas (Lamour y Hausbeck 2001). Ambos tipos de compatibilidad están presentes en México, así como aislados homotálicos. La diversidad de poblaciones de *P. capsici* se ha analizado principalmente de campos de chile de la región norte y centro de México (Castro-Rocha et al., 2016). Sin embargo, se tiene poca información sobre su estructura genética poblacional en viveros de plantas ornamentales en México. El análisis de la estructura poblacional y distribución de diversidad genética de este patógeno es necesaria para entender la composición genética de los aislados obtenidos de diversos hospedantes procedentes de viveros de plantas ornamentales en la región centro de México.

La clasificación taxonómica precisa de los aislados se requiere cuando algunos de estos tienen características que difieren de las que presentan los aislados tipo, como es la presencia de clamidosporas en *P. capsici*.

En la clave lúcida de IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types por Abad et al. (2019), no mencionan la formación de clamidosporas en esta especie. Sin embargo, si se han observado en algunos aislados de *P. capsici* (Kurt Lamour, comunicación personal).

Por otro lado, las especies de *Phytophthora* de un filogrupo agrupadas en el clado 8a son conocidas por su impacto en la producción de cultivos de plantas de invernadero y ornamentales, siendo *P. cryptogea* y *P. drechsleri* de las más importantes. *Phytophthora cryptogea* afecta aproximadamente 141 géneros en 49 familias de plantas y *P. drechsleri* 113 géneros en 40 familias (Olson et al., 2011, Cline et al., 2008). *Phytophthora cryptogea* fue descrita inicialmente por Pethybridge y Lafferty en 1919 causando pudrición en jitomate en Irlanda y *P. drechsleri* posteriormente se describió causando pudrición de la papa en EUA (Pethybridge y Lafferty 1919, Tucker 1931). Las especies dentro del complejo *P. cryptogea* comparten características morfológicas por lo cual se traslapan y esto hace difícil su descripción taxonómica (Erwin y Ribeiro 1996).

Las secuencias de ADN son herramientas útiles para la identificación de aislados de *Phytophthora* cuando las características morfológicas y biológicas son muy similares, así como para resolver las relaciones filogenéticas de los taxa (Kang et al., 2010). Los análisis filogenéticos multilocus actualmente son posibles y su costo es accesible en países latinoamericanos. Estos análisis pueden ser utilizados como parte de la tarea de describir y delimitar la diversidad orgánica (Rintoul et al., 2012).

Una especie filogenética hace referencia un grupo monofilético determinado por una combinación de caracteres compartidos (Sinapomorfías) (Mishler et al., 2000). Los datos genéticos empleados para determinar una especie filogenética son representados por secuencias de aminoácidos o nucleótidos. El reconocimiento de especies filogenéticas de concordancia genealógica operacional utiliza genealogías multigénicas para determinar la topología filogenética a través de la concordancia de ramas que apoyan la presencia de

especies separadas y ramas en conflicto que indican el flujo de genes (Taylor et al., 2000). Cuando la identificación de especies dentro de un género se dificulta por características morfológicas no descritas y comportamiento reproductivo variable, el reconocimiento de especies filogenéticas de concordancia genealógica operacional tiene la capacidad de analizar las relaciones taxonómicas con una resolución más alta que otras técnicas de reconocimiento de especies (Moralejo et al., 2008, Taylor et al., 2000).

El complejo de especies *P. capsici* y *P. cryptogea* son grupos no resueltos y su diseminación en los viveros del centro de México es alto. Es necesario entender las relaciones filogenéticas del complejo y conocer la diversidad genética de los complejos *P. capsici* y *P. cryptogea* en viveros de plantas ornamentales de la región centro de México y evaluar la independencia de linajes evolutivos de las poblaciones. Así como delimitar la variación genética entre individuos del complejo *P. capsici*.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferenciación genética dentro de los complejos de especies *Phytophthora capsici* y *Phytophthora cryptogea* en aislados de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos?

HIPÓTESIS

Los aislados del complejo *Phytophthora cryptogea* de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos son filogenéticamente distintos.

Los aislados de *Phytophthora capsici* de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos presentan flujo génico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las relaciones filogenéticas y diferenciación genética de aislados de viveros de los complejos de especies *P. capsici* y *P. cryptogea* provenientes de diferentes hospedantes, distribución geográfica y tipo de compatibilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar filogenéticamente mediante un análisis multilocus con la regiones ITS, β -tubulina y CO1, los aislados de *Phytophthora* del complejo *P. capsici* y *P. cryptogea* obtenidos de viveros.
- 2) Dilucidar la variación genética intra-específica dentro del complejo *P. capsici* en la región ITS, β -tubulina y CO1.
- 3) Determinar la identidad de los aislados mediante un análisis multilocus con la región ITS, β -tubulina y CO1 con secuencias tipo de los complejos *P. capsici* y *P. cryptogea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico se obtuvo de 43 aislados cultivados a 21 ± 1 °C por 15 a 20 días en medio líquido V8 clarificado al 2% siguiendo el protocolo de Möller et al., (1992) con modificaciones en el rompimiento del tejido, previamente descrito por Robideau et al., (2011). El ADN extraído se resuspendió en 0.1X TE buffer el cual contenía 50 µg/mL de RNasa A y se incubó a 65 °C por 10 min.

La región ITS (Internal transcribed spacer) se amplificó empleando los oligonucleótidos UN-up18S42 (Bakkeren et al., 2000), UN-lo28S1220 (Bala et al., 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 e ITS4 (Lévesque y de Cock, 2004). Las secuencias parciales del gen mitocondrial CO1 (Cytochrome c oxidase subunit 1) fueron amplificadas con OomCoxI Levup y Fm85mod modificados por Martin y Tooley (2003), y Oom-Btub-up415 y Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau et al., 2007) de la región del gen β -tubulina para los aislados del complejo de especies *P. capsici* y *P. cryptogea*.

El volumen de la reacción de PCR para los tres genes (ITS, β -tubulina y CO1) fue de 10 µL, con concentraciones finales de 1x Titanium Taq buffer (con 3.5 mM de MgCl₂), 0.1mM de dNTPs, 0.08 µM de cada oligonucleótido, 0.5x Titanium Taq polimerasa y aproximadamente de 1 a 10 ng/µL de ADN. Se agregó agua S-HPLC hasta obtener un volumen de 10 µL.

La amplificación de la región ITS SSU/LSU con los oligonucleótidos Oom-up18S67 y UN-lo28S1220 se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: 95 °C durante 3 min seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 58 °C durante 45 seg, 72 °C por 2 min, y finalmente 72 °C por 8 min de extensión. Para los oligonucleótidos UN-up18S42 y UN-lo28S22 o ITS4 las condiciones fueron: 95

°C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 68 °C durante 45 seg, 72 °C por 1'30", y 72 °C por 10 min de extensión final.

Las condiciones de PCR para la amplificación de CO1 fueron las descritas por Robideau et al. (2011). Las condiciones de PCR para β -tubulina para los aislados de *P. capsici* y *P. tropicalis* fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C por 1 min, y finalmente 72 °C por 8 min de extensión. Mientras que para el complejo *P. cryptogea* (*P. cryptogea*, *P. drechsleri* y *P. kelmiana*) se realizó un PCR "touch-down" bajo las condiciones descritas por Blair et al. (2008), disminuyendo la temperatura de 68 a 58 °C.

Se utilizó un analizador genético Applied Biosciences Prism® 3130xl para generar las secuencias de ADN a partir de las reacciones de amplificación de secuenciación.

Las secuencias se ensamblaron, editaron, generaron secuencias consenso y se alinearon con secuencias de la base de datos del GenBank (NCBI. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante análisis Blast con el programa Geneious (Geneious v. 8.1, www.geneious.com) para determinar los porcentajes de identidad e identificar la especie de *Phytophthora*. Las secuencias se subieron a la base de datos del banco de genes (GenBank), los números de acceso están en proceso de obtención.

Análisis filogenéticos de los complejos de *Phytophthora cryptogea* y *P. capsici*

Se realizaron análisis multilocus utilizando secuencias de la región ITS del ADN ribosomal, del gen β -tubulina y del gen mitocondrial CO1, de los 43

aislados de los complejos de *P. cryptogea* y *P. capsici*, obtenidos de plantas de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos durante el 2014, 2015 y 2016, adicionalmente fueron incluidas secuencias de los Ex-Type (tipo) de las especies de cada complejo. Las secuencias tipo (Ex-Type) del complejo de especies de *P. cryptogea* clado 8a (*P. cryptogea* CBS 113.19, CBS 114074, *P. erythroseptica* CBS 111343, *P. medicaginis* CBS 119902, *P. trifolii* CBS 117687 y *P. drechsleri* CBS292.35) fueron obtenidas de q-bank (<http://www.q-bank.eu>) para las regiones ITS, β -tubulina y CO1. Las secuencias tipo del complejo de especies *P. capsici* clado 2b [*P. capsici* CBS 128.23 y RLW2002.MS8 (NCBI), *P. glovera* S_2 (NCBI), *P. tropicalis* CBS 434.91 y AB211 (NCBI)] también fueron obtenidas del q-bank para los mismos genes.

Se realizó un análisis de Máxima Verosimilitud con la matriz concatenada con 1000 réplicas de bootstrap, y un análisis Bayesiano desarrollándose las corridas por 20 millones de generaciones, con temperatura de 0.2 y frecuencia de muestreo de 100 usando el portal de ciencia CIPRES v. 3.3 (Miller et al., 2010). El alineamiento de secuencias se realizó con MAFFT 7. El mejor modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos al que se ajustaron el grupo de datos fue GTR+I+G (Tiempo General Reversible con sitios Invariables mas distribución Gamma) obtenido en jModelTest2.1.10 (<https://mac.softpedia.com/get/Utilities/jModelTest.shtml>).

Los aislados de *Phytophthora* que produjeron clamidosporas (LEV6692, LEV6716, LEV6729, LEV6738, LEV6742) fueron sometidos a un análisis filogenético con 1000 de bootstrap basado en la región ITS del ADN ribosomal de especies de *Phytophthora* del clado 2b con especímenes de los Ex-types. Utilizando a *P. tropicalis*, *P. menzei*, y *P. siskiyouensis* del sub-clado 2, como

grupos externos.

Redes de haplotipos

Se reconstruyeron redes de haplotipos con secuencias de las regiones ITS, β -tubulina y CO1, para describir las relaciones entre los aislados del complejo de especies *P. capsici*. Las genealogías haplotípicas en estos clados fueron obtenidas por Haploview v. 4.2 (Barrett et al., 2005).

RESULTADOS

Árboles filogenéticos de los complejo de especies de *Phytophthora cryptogea* y *P. capsici*

Los análisis filogenéticos multilocus con la matriz concatenada (ITS, β tubulina y CO1) mostraron buena convergencia con 20 millones de generaciones. El modelo evolutivo que mejor se ajustó a nuestros datos en la prueba de máxima verosimilitud y Bayesiana fue el de sustitución de nucleótidos de tiempo general reversible (GTR+I+G) con sitios invariables más distribución gamma. Los resultados de los análisis filogenéticos multilocus Bayesianos y de máxima verosimilitud resultaron generalmente en topologías bien soportadas con algunas excepciones en algunos clados que se mencionan posteriormente. Las topologías y tamaño de las ramas se muestran en las Figuras 1 y 2.

Figura 1. Análisis filogenético multilocus de inferencia Bayesiana construido con secuencias concatenadas (ITS + CO1 + β -tubulina) de tres marcadores genéticos. Los números en los nodos representan las probabilidades posteriores en cada clado. El tamaño de las ramas y topología se muestran. Secuencias de los Ex-Type (tipo) de las especies de cada complejo fueron incluidas (clado 2a y clado 8a). Las secuencias tipo incluidas (Ex-Type) del complejo de especies *P. cryptogea* (*Phytophthora cryptogea* CBS 113.19, CBS 114074, *P. erythroseptica* CBS 111343, *P. medicaginis* CBS 119902, *P. trifolii* CBS 117687 y *P. drechsleri* CBS292.35) fueron obtenidas de q-bank (<http://www.q-bank.eu>) de ITS, β -tubulina y CO1. Las secuencias tipo del complejo de especies *P. capsici* (*P. capsici* CBS 128.23 y RLW2002.MS8 (NCBI), *P. glovera* S_2 (NCBI), *P. tropicalis* CBS 434.91 y AB211 (NCBI)) también fueron obtenidas de q-bank para los mismos genes. Las secuencias tipo más las del presente estudio fueron concatenadas para los análisis filogenéticos multilocus. Los aislados obtenidos en este estudio del clado 8a se muestran en color azul y color verde. La unidad de escala de la barra indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

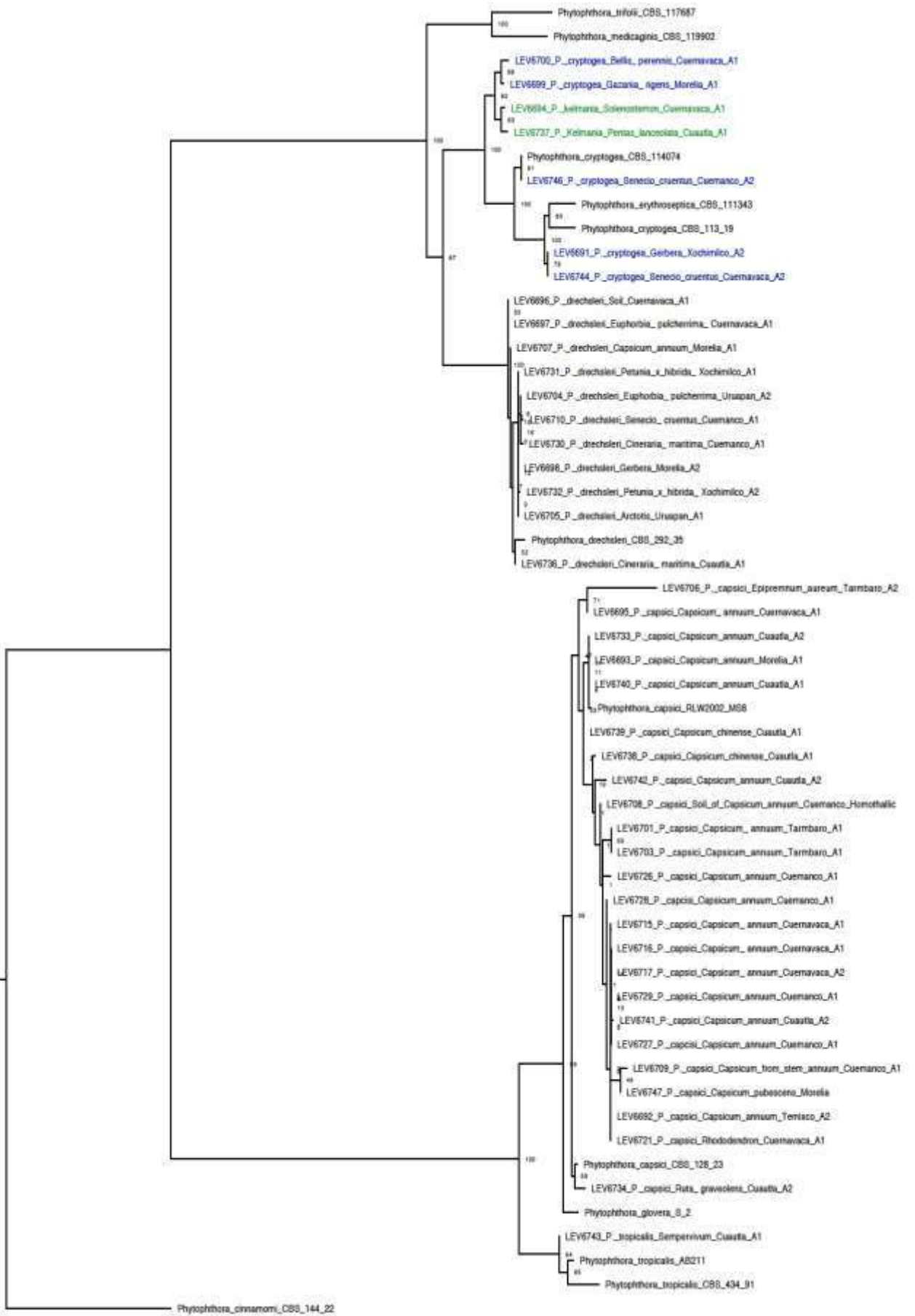


Figura 2. Análisis filogenético multiloci de máxima verosimilitud construido con secuencias concatenadas (ITS + CO1 + β -tubulina) de tres marcadores genéticos. Los números en los nodos representan el porcentaje de soporte de bootstrap en cada clado. El tamaño de las ramas y topología se muestran. Secuencias de los Ex-Type (tipo) de las especies de cada complejo fueron incluidas (clado 2a y clado 8a). Las secuencias tipo incluidas (Ex-Type) del complejo de especies *P. cryptogea* (*Phytophthora cryptogea* CBS 113.19, CBS 114074, *P. erythroseptica* CBS 111343, *P. medicaginis* CBS 119902, *P. trifolii* CBS 117687 y *P. drechsleri* CBS292.35) fueron obtenidas de q-bank (<http://www.q-bank.eu>) de ITS, β -tubulina y CO1. Las secuencias tipo del complejo de especies *P. capsici* (*P. capsici* CBS 128.23 y RLW2002.MS8 (NCBI), *P. glovera* S_2 (NCBI), *P. tropicalis* CBS 434.91 y AB211 (NCBI)) también fueron obtenidas de q-bank para los mismos genes. Las secuencias tipo más las del presente estudio fueron concatenadas para los análisis filogenéticos multiloci. Los aislados obtenidos en este estudio del clado 8a se muestran en color azul y color verde. La unidad de escala de la barra indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

Relaciones filogenéticas de especies del complejo *Phytophthora cryptogea*

Se observó en los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana, realizados con las secuencias de ADN (con los genes ITS + β -tubulina + CO1) que aislados de *P. drechsleri* son monofiléticos con bajos niveles de diversidad genética intraespecífica y aislados del complejo *P. cryptogea* presentaron diferentes grupos taxonómicos con mayor variación genética.

El análisis concatenado de máxima verosimilitud (Figura 2) muestra los aislados LEV6699 y LEV6700 agrupados en un clado, LEV6691 y LEV6744 en otro clado, y LEV6746 en un tercer clado. Los clados anteriores son concordantes en el análisis de Máxima verosimilitud y Bayesiano con valores de soporte que van de 0.97 a 1 y de 82 a más altos, respectivamente. No así los aislados de *P. pseudocryptogea* (Sin. *P. kelmania*) LEV6694 y LEV6737 que se agrupan en clados diferentes en el análisis multilocus de inferencia Bayesiana (Figura 1), mientras que con máxima verosimilitud se agrupan en un mismo clado (Figura 2) siendo discordantes.

Los aislados de *P. drechsleri* se agrupan en el mismo clado, formando un grupo monofilético con inferencia Bayesiana y de máxima verosimilitud con valores de soporte de 0.86 y 87, respectivamente.

Relaciones filogenéticas del complejo *Phytophthora capsici*

Los análisis Bayesiano y de máxima verosimilitud soportan robustamente la separación de *P. capsici* y *P. tropicalis* como especies diferentes. *Phytophthora tropicalis* fue aislada de *Sempervivum* sp. Este es el primer reporte de *P. tropicalis* afectando *Sempervivum* sp. a nivel mundial. El aislado LEV6706 en un clado con soporte (1/71) se resolvió en el análisis filogenético consistentemente en los análisis Bayesiano y de máxima verosimilitud. Existe la posibilidad de que este aislado obtenido de *Epipremnum aureum* de Tarímbaro, Michoacán pueda ser descrito como una nueva especie de *Phytophthora*; sin embargo, solo se cuenta con un aislado. Asimismo, se detectó un aislado en *Ruta graveolens* (LEV6734) de una distinta rama cercanamente relacionados a *P. capsici* y *P. glovera* con buen soporte (0.81/59), sugiriéndolo como un nuevo

taxón (Figuras 1 y 2). No existen reportes en la literatura científica de *Phytophthora* afectando *Ruta graveolens*.

Los análisis Bayesiano y de máxima verosimilitud muestran la amplia variación genética intraespecífica existente entre los aislados de *P. capsici* de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos (Figuras 1 y 2).

El aislado LEV6706 del complejo *P. capsici* se mantiene concordante en los análisis Bayesiano y de Máxima verosimilitud con valores de soporte de 1 y 71, respectivamente. El aislado LEV6734 obtenido de *Ruta graveolens* es concordante también en los análisis Bayesiano y de máxima verosimilitud con valores de soporte de 0.78 y 99, respectivamente. Este aislado se agrupa con la secuencia tipo CBS 128.23. Ambos aislados LEV6706 y LEV6734 son consistentes. Sin embargo, debido a que estos clados están compuestos de un solo aislado es difícil determinar que tan distintos son con respecto a los aislados de *P. capsici*. Estos aislados permanecen fuera en los extremos y no comparten nodos con el mayor grupo de aislados, por lo que pudieran alcanzar un nivel taxonómico diferente si se tuviesen más aislados para confirmarlo.

El aislado LEV6743 se agrupa en un clado distinto con secuencias tipo de *P. tropicalis*, permaneciendo monofilético y siendo concordante en los análisis multiloci Bayesiano y de máxima verosimilitud con valores de soporte de 1 y 100, respectivamente.

Filogenia de aislados del complejo *Phytophthora capsici* que producen clamidosporas

En el análisis realizado con las secuencias Ex-Types y las del presente estudio de los aislados que producen clamidosporas, se logró identificar lo

siguiente: con base en los clados soportados del análisis de estos aislados de *Phytophthora* junto con las secuencias tipo del complejo de especies *P. capsici*, los aislados LEV6692, LEV6716 y LEV6729 fueron identificados como *P. capsici*. El aislado LEV6738 se agrupó en un clado diferente con la secuencia tipo de *P. glovera* y se identificó como *Phytophthora_aff_glovera*. El aislado LEV6742 se separó en otro clado bien soportado y se identificó como *Phytophthora_sp_nov.* (Figura 3).

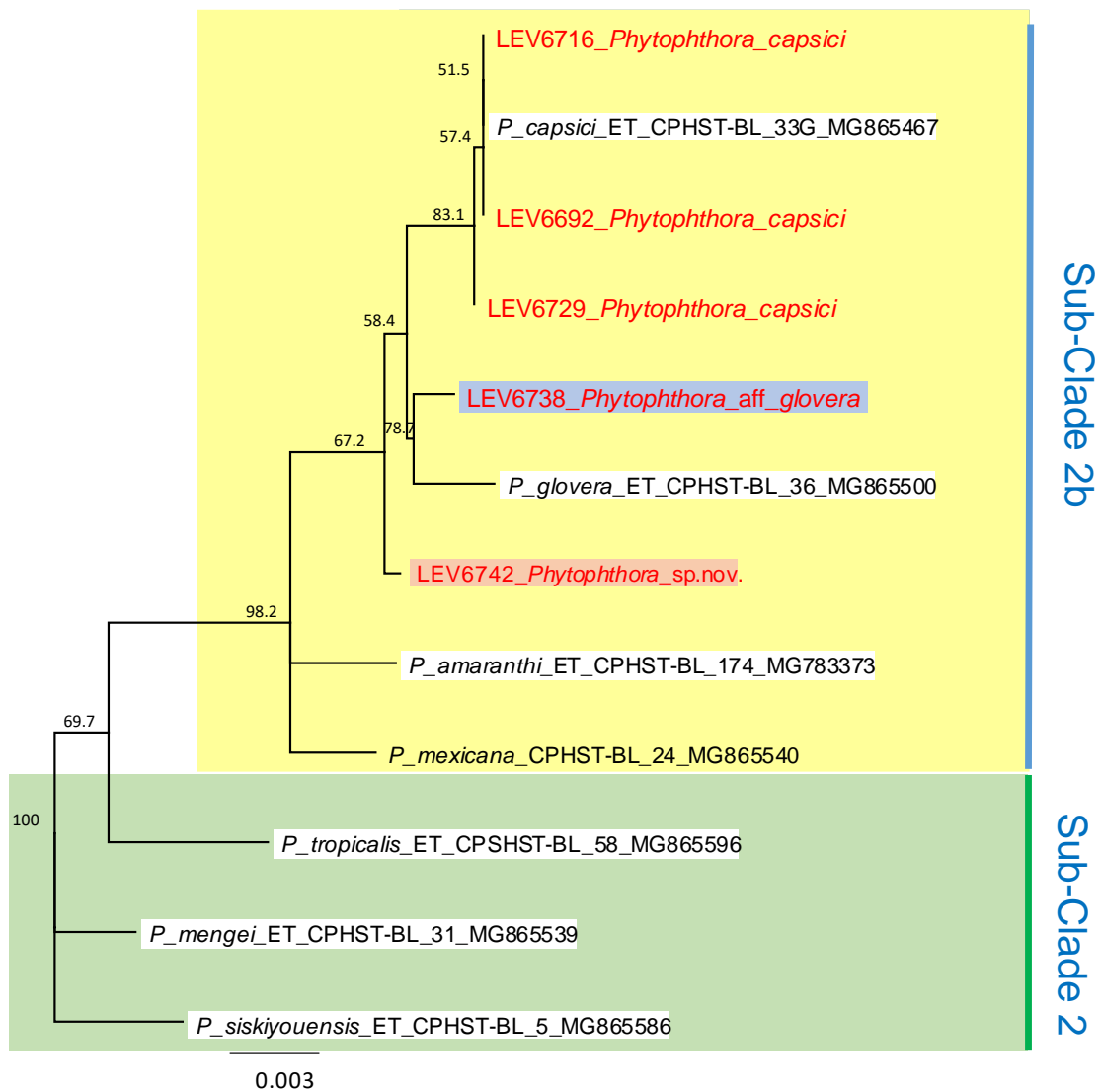


Figura 3. Aislados de *Phytophthora* que producen clamidosporas. Árbol filogenético con 1000 de bootstrap basado en la región ITS rDNA de especies

de *Phytophthora* del clado 2b. Las especies de *Phytophthora* de este estudio se muestran en color rojo. *P. tropicalis*, *P. menzei*, y *P. siskiyouensis* en el subclado 2 son los grupos externos. Las marcadas en color blanco son especímenes de los Ex-tipos. La unidad de escala de la barra: Número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

Heterocigocis en aislados de *Phytophthora capsici*

Durante el proceso de ensamblaje de secuencias en ambas direcciones para generar la secuencia consenso, se observaron dobles picos en la misma posición en los cromatogramas en los genes β -tubulina e ITS para algunos aislados. Esto fue considerado como el resultado de alelos heterocigóticos y se dejaron como ambigüedades en la secuencia consenso.

La secuenciación de ADN de una porción del gen β -tubulina (Figura 4) e ITS (Figura 5) en algunos aislados de *P. capsici* contenían sitios heterocigotos. Esto sugiere que los aislados son producto de la hibridación que posiblemente está ocurriendo dentro de este complejo de especies. Las ambigüedades fueron tratadas como caracteres desconocidos en los análisis.

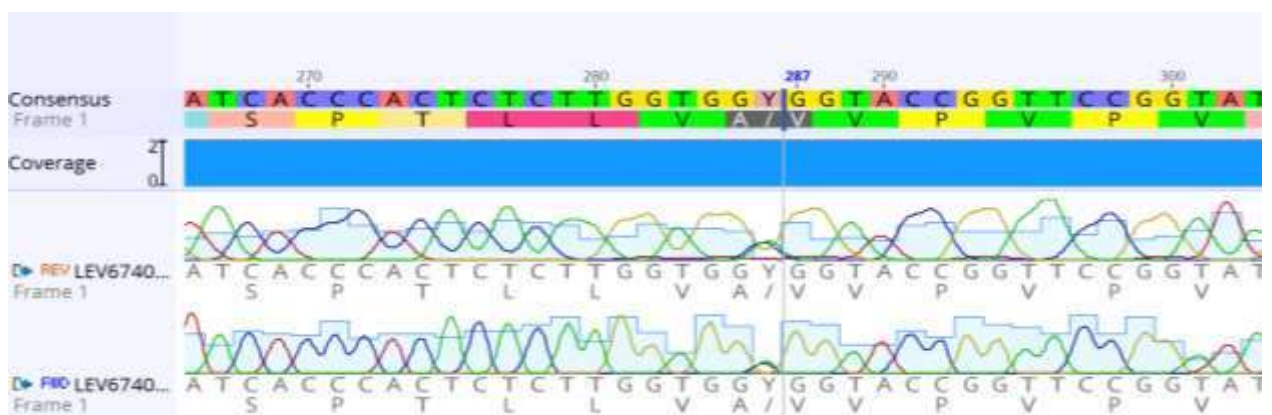


Figura 4. Electroferogramas del gen nuclear β -tubulina que ilustra un sitio heterocigoto de *P. capsici* en la posición 287.

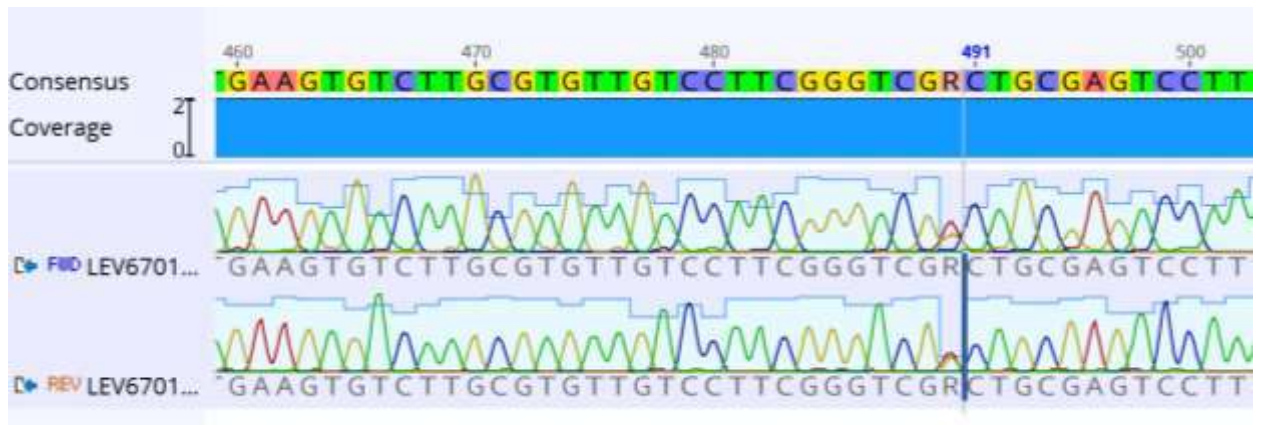


Figura 5. Electroferogramas de la región ITS que ilustra un sitio heterocigoto de *P. capsici* en la posición 491.

Redes de haplotipos del complejo *Phytophthora capsici*

Las redes de haplotipos mostraron haplo-grupos bien diferenciados que separan a *P. capsici* de *P. tropicalis* por varios pasos mutacionales. Las poblaciones de la especie *P. capsici* mostraron haplotipos compartidos entre las diferentes localidades de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Los pasos mutacionales que separan estos haplotipos compartidos es muy bajo. Los haplotipos más frecuentes para las regiones ITS (Figura 6), β -tubulina (Figura 7) y CO1 (Figura 8), provinieron de Cuautla, seguido de los de Cuernavaca y Morelia. El haplotipo más ancestral es el de Cuautla, Morelos.

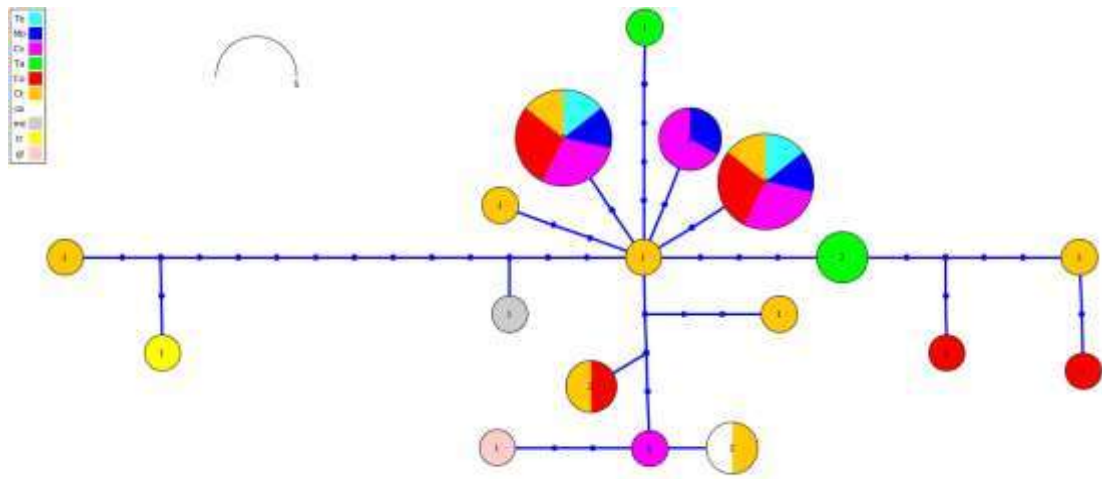


Figura 6. Red de haplotipos del complejo de especies *P. capsici* con la subunidad pequeña de la región ITS. Los puntos en las líneas azules indican posibles pasos mutacionales. Los círculos representan tipos de secuencia; los números dentro de los círculos son proporcionales al número de aislados; localidades de los aislados: Te=Temixco, Mo=Morelia, Cv=Cuernavaca, Ta=Tarímbaro, Co=Cuemanco, Ct=Cuautla; nombre de las especies de *Phytophthora* ex-type: ca=*P. capsici*, me=*P. medicaginis*, tr=*P. tropicalis*, gl=*P. glovera*.

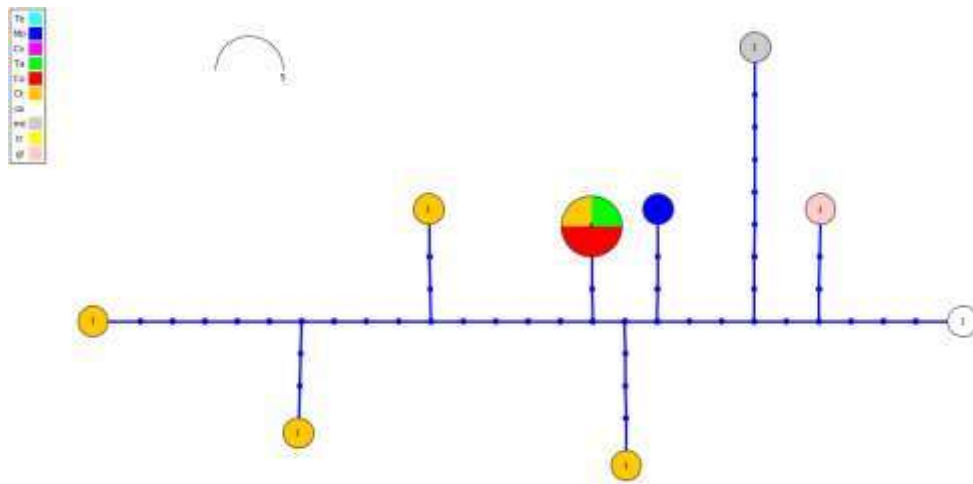


Figura 7. Red de haplotipos del complejo de especies *P. capsici* con el gen nuclear β -tubulina. Los puntos en las líneas azules indican posibles pasos mutacionales. Los círculos representan tipos de secuencia; los números dentro de los círculos son proporcionales al número de aislados; localidades de los aislados: Te=Temixco, Mo=Morelia, Cv=Cuernavaca, Ta=Tarímbaro, Co=Cuemanco, Ct=Cuautla; nombre de las especies de *Phytophthora* ex-type: ca=*P. capsici*, me=*P. medicaginis*, tr=*P. tropicalis*, gl=*P. glovera*.

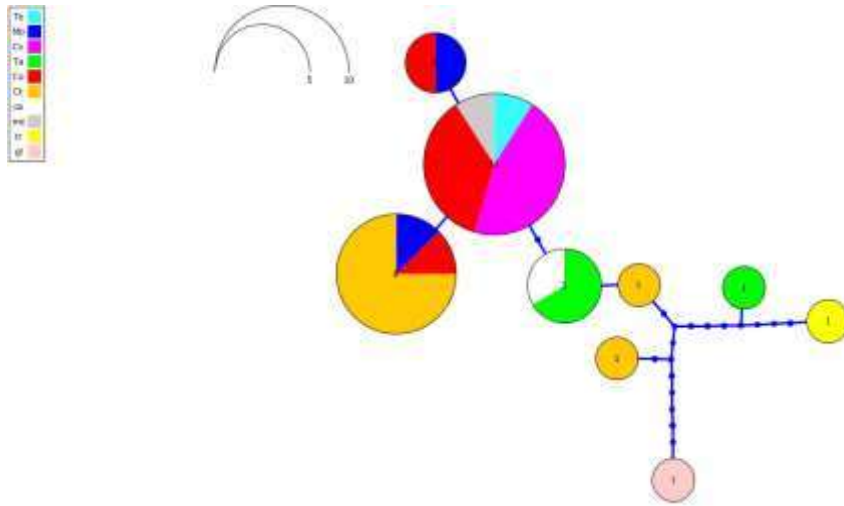


Figura 8. Red de haplotipos del complejo de especies *P. capsici* con el gen mitocondrial CO1. Los puntos en las líneas azules indican posibles pasos mutacionales; los círculos representan tipos de secuencia; los números dentro de los círculos son proporcionales al número de aislados; localidades de los aislados: Te=Temixco, Mo=Morelia, Cv=Cuernavaca, Ta=Tarímbaro, Co=Cuemanco, Ct=Cuautla; nombre de las especies de *Phytophthora* ex-type: ca=*P. capsici*, me=*P. medicaginis*, tr=*P. tropicalis*, gl=*P. glovera*.

DISCUSIÓN

La inferencia filogenética del complejo *P. capsici* mostró tres clados. En el clado I se agrupan aislados de *P. tropicalis* el cual se resuelve en un clado monofilético distinto a *P. capsici*, observándose baja variación intraespecífica. En este clado se ubica el aislado LEV6743 obtenido de *Sempervivum* sp. con un soporte de 1/100 (Bayesiano y de máxima verosimilitud, respectivamente). El clado II lo conforma el aislado LEV6706 de *Epipremnum aureum* de Tarímbaro, Michoacán, estando bien soportado; sin embargo, solo se tiene un aislado, se requieren más aislados para describirlo como *Phytophthora* sp. nov. El clado III agrupa aislados de *P. capsici*. Los análisis con la región ITS de los aislados que produjeron clamidosporas muestran que el aislado LEV6742 es una nueva especie dentro del complejo *P. capsici*. Mientras que el aislado LEV6738 se clasificó como *P. aff. glovera*, por lo que se necesitan realizar más análisis y estudios con este aislado para su clara identificación. Los aislados LEV6692, LEV6717 y LEV6729 concuerdan con *P. capsici*. Con esta evidencia se determina que *P. capsici*, y la nueva especie LEV6742 dentro del complejo *P. capsici* y LEV6738 *P. aff. glovera* dentro de este mismo complejo, producen clamidosporas. Siendo una evidencia más de que se pueden presentar clamidosporas las cuales ya se han observado en otros aislados (Kurt Lamour, comunicación personal). La presencia de clamidosporas en *P. capsici* sugiere nuevas interrogantes dentro de este complejo de especies. ¿Porqué están presentando clamidosporas estos aislados?

Los análisis filogenéticos proporcionaron evidencia de flujo genético dentro de la especie. Las redes de haplotipos demuestran que las poblaciones de *P. capsici* de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos están compartiendo

haplotipos. Estos datos sugieren que el grupo podría tener altos niveles de aneuploidía. La cual podría estar jugando un papel importante en la evolución del complejo de especies en el campo.

Los análisis de la estructuración genética en las poblaciones de *P. capsici* con secuencias tipo de ADN descargadas de bases de datos verificadas para cada gen, y su concatenación con las secuencias de ADN de nuestros aislados, destaca la importancia de incluir aislados de todos los clados detectados que representan la variación genética en *P. capsici* para el desarrollo de herramientas de diagnóstico, susceptibilidad a fungicidas y resistencia a hospedantes. La estructura de la población detectada también afectará el diseño e interpretación de los estudios de asociación en *P. capsici*. Este estudio proporciona un mapa inicial de la estructura de la población del complejo de especies *P. capsici* en la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Es necesario continuar con el genotipificado de aislados para ampliar nuestro conocimiento de variación genética en este importante patógeno de plantas.

Es importante obtener secuencias tipo de ADN descargadas de bases de datos verificadas para análisis filogenéticos por las siguientes razones: porque puede haber una ligera discordancia que se observa en los árboles filogenéticos debido a errores en la secuenciación y baja calidad de algunas de las secuencias depositadas en la base de datos del banco de genes (Genbak NCBI) que no han sido verificadas. El ruido de fondo se puede identificar incorrectamente como características filogenéticamente importantes, como los SNP o polimorfismos de secuencia de las corridas de secuenciación y baja calidad de secuencia. Algunas secuencias de la base de datos del banco de genes (GENBANK, NCBI) no tienen cobertura bidireccional completa y no son de la más alta calidad y/o están mal

identificadas, por lo que se pueden hacer inferencias incorrectas en los análisis individuales de cada gen. Por lo que para identificar correctamente nuestros aislados se optó por realizar análisis filogenéticos multiloci (ITS + CO1 + β -tubulina) Bayesiano y de máxima verosimilitud con secuencias tipo de las especies del complejo *P. cryptogea*. Esto ayudó a clasificar con mayor certeza los aislados.

Las redes de haplotipos con las regiones ITS, β -tubulina y CO1 de los aislados de la especie *P. capsici*, demuestran que existe un fenómeno de flujo genético dentro de la especie en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Mientras que la especie *P. tropicalis* es un haplotipo único y no se está entrecruzando con los aislados de la especie *P. capsici*. Los diferentes datos de los análisis filogenéticos son congruentes con las redes de haplotipos al observarse que *P. capsici* y *P. tropicalis* son distintas especies. Se detectó la presencia de varios haplotipos compartidos de *P. capsici* en viveros de plantas ornamentales de la ciudad de México, Michoacán y Morelos.

La especie de *P. capsici* fue detectada con mayor frecuencia en viveros de plantas ornamentales de México principalmente en *Capsicum annuum*. Los estudios de *P. capsici* afectando *C. annuum*, *C. chinense* y *C. pubescens* en México son escasos en comparación con los reportados en EUA. En un estudio realizado por Quesada-Ocampo et al., (2011) para determinar la estructura genética de poblaciones de *P. capsici* en *C. annuum* analizando el número promedio de diferencias de bases nucleotídicas, se encontró una diferenciación genética de 3.14 con 13 aislados de México comparado con 164 aislados de EUA con 2.77 de diferencia genética, por lo tanto, México tiene mayor diversidad genética. México es uno de los centros de origen, domesticación, diversificación

e importancia económica del género *Capsicum* (Aguilar-Rincón et al., 2010). Esto sugiere que México podría ser el centro de origen y diversificación de *P. capsici* en el mundo. Futuros estudios tienen que realizarse para resolver el complejo de especies *P. capsici* y determinar los genes de virulencia y los que producen las clamidosporas. Una reevaluación del complejo de especies *P. capsici* y *P. cryptogea* debe realizarse para clarificar su taxonomía, patogenicidad y de fenotipos de virulencia, rango de hospedantes, y detectar la existencia de híbridos naturales. La utilización de varios genes hipervariables nucleares y mitocondriales enlazados servirá para detectar flujo genético para lo cual se necesitan más muestreos y obtención de aislados de los cinco continentes.

En los análisis filogenéticos multilocus (ITS + CO1 + β -tubulina) Bayesiano y de máxima verosimilitud de los aislados LEV6691 y LEV6744, son concordantes las topologías de los árboles de genes y están soportados (0.97/78). No hay incongruencias, no se produjeron sesgos, es decir no hay nodos incongruentes. La topología es similar en todos los clados. Lo que sugiere que no hay flujo génico y ahí termina la especie. Estos aislados deben clasificarse como *Phytophthora* sp. nov.

El análisis de los electroferogramas de las regiones ITS y β -tubulina muestran escasos a nulos dobles picos indicando que no hay heterocigosis. Esto provee fuerte evidencia de que no hay flujo génico entre los aislados del complejo *P. cryptogea*. Rintoul et al., (2012), menciona que en los análisis filogenéticos basados en conjuntos de datos concatenados, es poco probable que algunas diferencias leves de topología puedan representar el flujo de genes y afecten las conclusiones finales y/o se reflejen en la disminución de los apoyos de las ramas.

El aislado LEV6746 (1/91 de soporte) se agrupa solo en un clado diferente en los análisis filogenéticos multiloci (ITS + CO1 + β -tubulina) Bayesiano y de máxima verosimilitud a los aislados LEV6691 y LEV6744. Estos aislados deben clasificarse como *Phytophthora* sp. nov. Por otro lado, dentro del mismo complejo de especies de *P. cryptogea*, los aislados LEV6699 y LEV6700 (1/88) se agrupan en un mismo clado en el análisis multiloci (ITS + CO1 + β -tubulina) Bayesiano y de máxima verosimilitud. Por lo que deben clasificarse como *Phytophthora* sp. nov. El gen mitocondrial CO1, ha sido utilizado para resolver especies de *Phytophthora* que son indistinguibles con ITS ADNr (Robideau et al., 2011), siendo una buena alternativa para resolver complejos de especies aparentes. Robideau et al. (2011) y Lévesque (comunicación personal), mencionan que las secuencias de la region ITS de los mismos aislados en algunos casos han mostrado que la identificación con el gen CO1 es una buena opción complementaria debido a que es ADN mitocondrial y no nuclear. En algunos casos, CO1 ha sido más discriminatorio que ITS a nivel de especie, contrastando con la subunidad ribosomal larga, que mostró una baja resolución de las especies cuando se secuenció a partir de un subconjunto de los aislados utilizados en dicho estudio. Los resultados descritos indican que la secuenciación de CO1 y el conjunto de datos generado son un complemento valioso a los recursos de taxonomía de oomicetes disponibles en la actualidad, son marcadores de ADN aceptables y complementarios que se utilizan para la identificación de oomicetos.

Los aislados LEV6700 y LEV6744 aislados de *Bellis perennis* y *Senecio cruentus* de Cuernavaca, Morelos, con tipos de compatibilidad A1 y A2 respectivamente, sugiere una recombinación putativa entre los tipos de compatibilidad A1 y A2.

Esto sugiere que la reproducción sexual puede ocurrir o ha ocurrido en la historia de estos aislados generando variación genética en éstos. No se observa una clara relación entre el linaje molecular y el tipo de compatibilidad en estos aislados. La cruce de tipos de compatibilidad es posible, ya que no es evidente de que existan barreras para el cruzamiento entre los aislados, se necesitan estudios integrales de cruces para examinarlo con más detalle.

Un mayor número de aislados de los complejos *P. capsici* y *P. cryptogea* son necesarios para evaluar completamente la posición taxonómica de estos aislados antes de cualquier cambio taxonómico formal.

De este análisis, se concluye que hay movimiento de plantas infectadas de *Phytophthora* entre la Ciudad de México, Michoacán y Morelos y que existe un mal manejo de los viveros de plantas ornamentales en las localidades antes mencionadas. La Ciudad de México y Morelos son los principales estados productores de plantas ornamentales en maceta en vivero en México, los cuales abastecen la demanda de planta en nuestro país. Dichas localidades son una fuente de inóculo de especies de *Phytophthora*, y con el flujo continuo de plantas y por consiguiente de especies de este patógeno se dispersa a viveros de otros estados y nuevos ambientes donde no estaba presente. El movimiento de plantas por personas a través del comercio nacional o internacional parece ser un factor importante en la diseminación del patógeno. Esto podría estar favoreciendo la variación genética y diseminación de especies a diferentes regiones del país o el mundo si no se tiene un manejo adecuado y buenas prácticas fitosanitarias en los viveros. La información obtenida en este estudio será útil para generar hospedantes resistentes.

CONCLUSIONES

1. Los aislados del complejo *Phytophthora cryptogea* de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos son filogenéticamente distintos.
2. Los aislados de *Phytophthora capsici* de viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos presentan flujo génico.
3. Este estudio provee un mapa inicial de la estructura poblacional del complejo *P. capsici* y *P. cryptogea* en viveros de México. Es necesario continuar con el genotipificado de aislados para expandir nuestro conocimiento sobre la variación genética de estos patógenos de plantas en el país.
4. La estructura poblacional detectada impactará en el diseño e interpretación de estudios del complejo de especies *P. capsici* y *P. cryptogea*.
5. Este trabajo muestra el papel que está jugando el flujo continuo de plantas y especies de *Phytophthora* entre viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos a otros estados y nuevos ambientes donde no estaba presente, favoreciendo la variación genética y diseminación de especies o formación de nuevas especies en diferentes regiones del país.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

1. En México se desconocen los mecanismos de recombinación sexual de poblaciones de *Phytophthora* en campo y la evolución y linajes clonales y los mecanismos básicos de patogenicidad.
2. Es necesario realizar muestreos en todos o la gran mayoría de viveros de plantas ornamentales de México para detectar especies de *Phytophthora*, especialmente de *P. cryptogea* para obtener un mayor número de aislados y determinar si existe una correlación entre el origen geográfico de los aislados del complejo o si hay especificidad de hospedantes. Así como determinar si hay o hubo divergencia evolutiva.
3. La secuenciación completa de genomas de poblaciones de aislados de los complejos *P. capsici* y *P. cryptogea* de México ayudará a entender mas sobre su biología y genética.
4. Los análisis filogenómicos de poblaciones de aislados de los complejos *P. capsici* y *P. cryptogea* podrían ser una buena opción para diferenciar nuevos taxones dentro de estos complejos.

LITERATURA CITADA

- Abad, Z. G., Burgess T., Bienapfl J. C., Redford A. J., Coffey M., and Knight L. (2019). IDphy: Molecular and Morphological Identification of *Phytophthora* Based on the Types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, and Centre for *Phytophthora* Science and Management. <http://idtools.org/id/phytophthora/index.php>. 7 de junio de 2019.
- Aguilar-Rincón V.H., Corona-Torres T., López-López P., Latournerie-Moreno L., Ramírez-Meraz M., Villalón-Mendoza H. y Aguilar Castillo J. A. (2010). Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- Aragaki, M., and Uchida, J.Y. (2001). Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia*, 93(1), 137-145. doi:10.2307/3761611
- Bakkeren, G., Kronstad, J.W., and Levesque, C.A. (2000). Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia*, 92(3), 510-521. doi:10.2307/3761510
- Bala, K., Robideau, G., Désaulniers, N., De Cock, A. W. A. M., and Lévesque, C. A. (2010). Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 22-31. doi:10.3767/003158510x524754
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M.J. (2004). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263-265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
- Bilodeau, G.J., Lévesque, C.A., De Cock, A.W.A.M., Duchaine, C., Brière, S., Uribe, P., Martin, F. N., and Hamelin, R.C. (2007). Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by Real-Time Polymerase Chain Reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. *Phytopathology*, 97(5), 632-642. doi:10.1094/phyto-97-5-0632
- Blair, J.E., Coffey, M.D., Park, S., Geiser, D.M., and Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45(3), 266-277. doi:10.1016/j.fgb.2007.10.010
- Castro-Rocha, A., Shrestha, S., Lyon, B., Grimaldo-Pantoja, G.L., Flores-Marges, J.P., Valero-Galván, J., Aguirre-Ramírez, M., Osuna-Ávila, P., Gómez-Dorantes, N., Ávila-Quezada, G., Luna-Ruiz, J. J., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., and Lamour, K. (2016). An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycological Progress*, 15(2), 1-15. doi:10.1007/s11557-016-1157-0

- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 562 p.
- Gevens,A.J., Donahoo,R.S., Lamour,K.H., and Hausbeck,M.K. (2008). Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. *Plant Disease*, 92(2), 201-209. doi:10.1094/pdis-92-2-0201
- Groves,C. (2017). Phylogenetic species concept. *The International Encyclopedia of Primatology*, 1-2. doi:10.1002/9781119179313.wbprim0044
- Kang,S., Mansfield,M.A., Park,B., Geiser,D.M., Ivors,K.L., Coffey,M.D., Grünwald, N. J., Martin, F. N., Lévesque C. A., and Blair,J.E. (2010). The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. *Phytopathology*, 100(8), 732-737. doi:10.1094/phyto-100-8-0732
- Lamour,K.H., and Hausbeck,M.K. (2001). The dynamics of mefenoxam insensitivity in a recombining population of *Phytophthora capsici* characterized with Amplified Fragment Length Polymorphism markers. *Phytopathology*, 91(6), 553-557. doi:10.1094/phyto.2001.91.6.553
- Lamour,K.H., Stam,R., Jupe,J., and Huitema,E. (2011). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329-337. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Lévesque,C.A., and De Cock,A.W.A. M. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(12), 1363-1383. doi:10.1017/s0953756204001431
- Martin,F.N., and Tooley,P.W. (2003). Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*, 95(2), 269-284. doi:10.1080/15572536.2004.11833112
- Miller,M.A., Pfeiffer,W., and Schwartz,T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA. Pp 1-8. 14 novembre de 2010 doi:10.1109/gce.2010.5676129
- Mishler, B. D., and Theriot, E.C. (2000). The phylogenetic species concept (sensu Mishler and Theriot): Monophyly, Apomorphy, and Phylogenetic species concept. Pages 44-54 in Q. D. Wheeler and R. Meier, editors. Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate. Columbia University Press, New York.
- Moralejo,E., Clemente,A., Descals,E., Belbahri,L., Calmin,G., Lefort,F., Spies, C. F., and McLeod,A. (2008). *Pythium recalcitrans* sp. nov. revealed by multigene phylogenetic analysis. *Mycologia*, 100(2), 310-319. doi:10.1080/15572536.2008.11832486

- Moralejo, E., Pérez-Sierra, A.M., Álvarez, L.A., Belbahri, L., Lefort, F., and Descals, E. (2009). Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology*, 58(1), 100-110. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01930.x
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., and Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115-6116. doi:10.1093/nar/20.22.6115
- Pethybridge, G. H., and Lafferty, H. A. (1919). A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora*. *Science Proceedings of the Royal Dublin Society*, (15) 487-505.
- Olson, H.A., Carbone, I., and Benson, D.M. (2011). Phylogenetic history of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* isolates from floriculture crops in North Carolina greenhouses. *Phytopathology*, 101(11), 1373-1384. doi:10.1094/phyto-11-10-0302
- Quesada-Ocampo, L.M., and Hausbeck, M.K. (2010). Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 100(6), 619-627. doi:10.1094/phyto-100-6-0619
- Quesada-Ocampo, L. M., Granke, L. L., Mercier, M. R., Olsen, J., Hausbeck, M. K. (2011). Investigating the genetic structure of *Phytophthora capsici* populations. *Phytopathology*, 101(9):1061-1073.
- Rintoul, T.L., Eggertson, Q.A., and Lévesque, C.A. (2012). Multigene phylogenetic analyses to delimit new species in fungal plant pathogens. Pages 549-569 in M. D. Bolton and B. P. Thomma, editors. *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Robideau, G. P., De Cock A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C. H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J., Ristaino, J. B., and Lévesque, C. A. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002-1011. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., and Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 21-32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Tucker, C. M. 1931 (reprint 1967). *The Taxonomy of the Genus Phytophthora* de Bary. Wheldon & Wesley, Ltd. and Stechert-Hafner Service Agency, Inc., New York.
- Wilkins, J.S. (2018). Phylogenetic species concepts. *Species*, 241-254. doi:10.1201/b22202-10

DISCUSIÓN GENERAL

Las especies detectadas en este estudio en viveros de plantas ornamentales en México han sido reportadas en viveros de otros países. En Australia (Hardy y Sivasithamparam 1988, Linderman y Zeitoun 1977), Estados Unidos de América (Lamour et al., 2003, Warfield et al., 2008, Olson y Benson 2011, Schwingle et al., 2007, Yakabe et al., 2009, Reeser et al., 2015), España (Moralejo et al., 2009, Pérez-Sierra 2012), Italia (Cacciola et al., 2008, Prigigallo et al., 2015), Reino Unido (Denton et al., 2008), República Checa (Černý et al., 2011) y en Sudáfrica (McLeod y Coertze 2007). Lo cual indica que las especies de *Phytophthora* están ampliamente distribuidas debido al inadecuado manejo que prevalece en muchos viveros, por lo que éstas se han dispersado en viveros alrededor del mundo .

La especie de *P. capsici* fue detectada con mayor frecuencia en viveros de plantas ornamentales de México principalmente en *Capsicum annuum*. Los estudios de *P. capsici* afectando *C. annuum* en México son escasos en comparación con los reportados en EUA. En un estudio realizado por Quesada-Ocampo et al., (2011) para determinar la estructura genética de poblaciones de *P. capsici* en *C. annuum* analizando el número promedio de diferencias de bases nucleotídicas, encontraron una diferenciación genética de 3.14 con 13 aislados de México comparado con 164 aislados de EUA con los que obtuvieron 2.77 de diferencia genética, lo que demostró que México tiene mayor diversidad genética. Esto concuerda con la hipótesis de que México es el centro de origen y diversificación de *P. capsici* en el mundo ya que México es uno de los centros de origen, domesticación, diversificación e importancia económica del género *Capsicum* (Aguilar-Rincón et al., 2010). Otra característica de los aislados de *P.*

capsici de México es que a diferencia de lo que se ha observado en otros países algunos aislados analizados en el presente estudio LEV6692, LEV6716, LEV6729, LEV6738 y LEV6742 presentan clamidosporas, estructuras no reportadas en la literatura para *P. capsici*. El análisis realizado consistió en la secuenciación de tres genes y aunque una de las características morfológicas que diferencian a *P. capsici* de *P. tropicalis* es la ausencia de clamidosporas en la primera (Aragaki y Uchida, 2001), el análisis molecular de nuestros aislados concuerda con *P. capsici*.

Una reevaluación amplia del complejo de especies *P. capsici* debe realizarse para clarificar su taxonomía, patogenicidad, fenotipos de virulencia, rango de hospedantes y formación de híbridos naturales, para los cuales se necesitan realizar más muestreos y obtención de aislados de los cinco continentes.

Es recomendable usar varios genes hipervariables nucleares y mitocondriales enlazados para detectar flujo genético en el complejo de especies. Los análisis genómicos y filogenómicos son otras herramientas que pueden emplearse para conocer más sobre la biología y genética de este complejo de especies. Lo mismo se sugiere para el complejo de especies *P. cryptogea* ya que se encontró que lo que se consideraba que correspondía a esta especie en realidad abarca varias especies entre las que se encuentran *P. pseudocryptogea* y *P. drechsleri*. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* están presentes en viveros de la ciudad de México, Michoacán y Morelos, así como en su forma homotática en Ciudad de México. El tipo de compatibilidad A2 de *P. cinnamomi* está presente únicamente en México. Mientras que el A1 de *P. drechsleri* está presente en viveros del estado de Michoacán afectando *Arctotis* sp., y *Capsicum annuum* y el A2 en *Gerbera* sp. y *Euphorbia pulcherrima*. Así como el A1 y A2 en *Petunia*

x híbrida en la localidad de Xochimilco, Ciudad de México. Ambos tipos de compatibilidad de *P. cryptogea* están presentes en el estado de Morelos, el A1 en *Bellis perennis* y el A2 en *Senecio cruentus*. El A1 y A2 de *P. nicotianae* fueron detectados en *Catharanthus roseus* en Cuernavaca, Morelos. Álvarez-Rodríguez et al. (2016) reporta la presencia de ambos tipos de compatibilidad en plantas de vinca en viveros de Sinaloa, México. El movimiento de planta entre viveros, la proximidad de tipos de compatibilidad y la diversidad genotípica sugieren que está ocurriendo la reproducción sexual. La presencia de reproducción sexual conlleva a la existencia de diversidad de las especies de *Phytophthora* en viveros de la ciudad de México, Michoacán y Morelos como consecuencia del intercambio de material genético entre aislados debido al mal manejo fitosanitario.

La presencia de ambos tipos de compatibilidad en aislados de *P. capsici* en *Capsicum annuum* y *P. drechsleri* en *Petunia* x híbrida, en la misma planta y rizosfera, respectivamente, indica que la reproducción sexual y variación genética están ocurriendo en las plantas de vivero de Morelos y la Ciudad de México. Las oosporas podrían estarse formando y ser una fuente de inóculo primario (Lehtinen y Hannukkala, 2004), ya que la reutilización de suelo y macetas infestadas se lleva a cabo en viveros en todo México, lo que contribuye a la presencia anual de *Phytophthora* en las plantas de vivero. Las oosporas son estructuras resistentes que podrían sobrevivir por un periodo largo en viveros, lo que permite una nueva colonización del hospedante y pueden introducir nuevos genotipos recombinantes de *Phytophthora* en nuevas áreas. Este trabajo mostró que ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* ocupan el mismo nicho en ambientes de vivero. Los productores necesitan mejorar las prácticas

de manejo recomendadas por Parke y Grünwald (2012), acorde con sus recursos económicos, para reducir pérdidas significativas. Estudios previos en México han confirmado la presencia de ambos tipos de compatibilidad dentro de un mismo campo de cultivo agrícola en diferentes zonas productoras de Chile en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas (Rodríguez et al., 2004 y Silva-Rojas et al., 2009). Sánchez-Gurrola (2019) observó oosporas *in planta* en Chile pimiento morrón al inocular los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* obtenidos de una misma planta de un cultivo agrícola de Chile de pimiento de la localidad de Delicias, Chihuahua. Sin embargo, este es el primer reporte en México que demuestra la presencia de ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) *in planta* en viveros.

La presencia de los dos tipos de compatibilidad de la misma especie de *Phytophthora* o diferentes especies en la misma o diferente especie de planta hospedante dentro del mismo vivero sugiere que pueden estar ocurriendo procesos de hibridación, lo que podría llevar al surgimiento de nuevas especies. La hibridación podría estar jugando un papel evolutivo importante en la transferencia de material genético dentro de este género (Stukenbroock 2016, Bertier et al., 2013), como ocurre entre *P. cactorum* x *P. hedraiaandra* (Man in 't Veld et al., 2007), *P. nicotianae* x *P. cactorum* (Bonants et al., 2000). Así como se ha demostrado entre diferentes especies de *Phytophthora* y plantas hospedantes, como en el caso de las cruces entre *P. capsici* aislado de calabaza y *P. tropicalis* de *Rhododendron* que hibridizan (Donahoo y Lamour, 2008). La hibridación entre especies podría estar incrementándose a medida que se intensifica el comercio de plantas infectadas, lo que representa un riesgo potencial en sistemas de producción agrícola, parques, bosques y jardines. Las

especies de *Phytophthora* híbridas introducidas en nuevos ecosistemas de plantas heterogéneos y las especies que ya se encuentran en el ecosistema, podrían llevar al surgimiento de especies genéticamente diferentes o especies nuevas, incrementando la diversidad genética del género.

Los análisis filogenéticos multiloci de máxima verosimilitud y Bayesiano del complejo *P. capsici* demuestran la presencia de distintos grupos filogenéticos y estos análisis proporcionan evidencia de flujo genético dentro del complejo. Las redes de haplotipos demuestran que las poblaciones de *P. capsici* de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos están compartiendo haplotipos. Estos datos sugieren que el grupo podría tener altos niveles de aneuploidía. Barchenger et al., (2017), encontraron ploidía en aislados de *P. capsici* con expansión y contracción intragenómica. La cual podría estar jugando un papel importante en la evolución y plasticidad del complejo en campo.

La estructura de la población detectada también afectará el diseño e interpretación de los estudios de asociación en *P. capsici*. Este estudio proporciona un mapa inicial de la estructura de la población global de *P. capsici* sin embargo, es necesario continuar con el genotipificado de aislados para ampliar nuestro conocimiento de variación genética en este importante patógeno de plantas.

Las redes de haplotipos con los genes ITS, β -tubulina y CO1 de los aislados de la especie *P. capsici* demuestran que existe un fenómeno de intercambio genético dentro de la especie en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Mientras que la especie *P. tropicalis* es un haplotipo único y no se está entrecruzando con los aislados de la especie *P. capsici*. Los diferentes datos de los análisis filogenéticos son congruentes con las redes de haplotipos al

observarse que *P. capsici* y *P. tropicalis* son distintas especies. Se detectó la presencia de varios haplotipos compartidos de *P. capsici* en viveros de plantas ornamentales de la ciudad de México, Michoacán y Morelos.

En *P. drechsleri* se encontraron niveles bajos de variación intraespecífica en comparación con *P. cryptogea*. Los análisis filogenéticos en este estudio, claramente dan buen soporte a *P. drechsleri* como un taxón monofilético distinto, corroborando lo demostrado en estudios previos (Yang et al., 2017, Olson et al., 2011). Los análisis concatenados resuelven distintos grupos dentro de *P. cryptogea*. Estos grupos comparten un ancestro común reciente pero ha ocurrido una posible divergencia evolutiva por la especificidad al hospedante o el origen geográfico. Por lo tanto, es probable que cualquier análisis biogeográfico sea confuso por la distribución generalizada del patógeno mediante el comercio nacional e internacional de plantas infectadas (Brasier 2008).

Se concluye que existe un mal manejo de los viveros de plantas ornamentales en las localidades donde se realizó este estudio. La Ciudad de México y Morelos son los principales estados productores de plantas ornamentales en maceta en vivero en México, los cuales abastecen la demanda de planta en nuestro país. Dichas localidades son una fuente de inóculo de especies de *Phytophthora*, y con el flujo continuo de plantas y por consiguiente de especies de este patógeno se dispersa a viveros de otros estados y nuevos ambientes donde no estaba presente. El movimiento de plantas por personas a través del comercio nacional o internacional parece ser un factor importante en la diseminación del patógeno. Esto podría estar favoreciendo la hibridación y diseminación de especies a diferentes regiones del país o el mundo si no se tiene un manejo adecuado y buenas prácticas fitosanitarias en los viveros.

Los viveros de México se caracterizan por tener heterocultivos, haciéndolos extremadamente complejos para el manejo de enfermedades causadas por *Phytophthora*. Las plantas se propagan a partir de semillas, plántulas, cultivo *in vitro* y esquejes, se trasplantan varias veces y trasladan del lugar de propagación a invernaderos o viveros pudiendo llevar consigo *Phytophthora*. Las especies de *Phytophthora* representan un riesgo potencial en jardines de México debido a su distribución no regulada. Las malas prácticas de manejo realizadas por los productores en los viveros de México deben mejorarse para evitar la diseminación del patógeno hacia áreas donde no estaba presente, parques, jardines, bosques, viveros y campos de cultivo. *Phytophthora* infecta un amplio rango de especies de plantas, lo que indica que otros géneros de las familias de plantas infectadas podrían estar siendo infectadas. Esto a su vez puede causar grandes pérdidas económicas, y la alteración de ecosistemas ya que causa la muerte de las plantas afectadas. Las rutas comerciales de entrada de las especies de *Phytophthora* detectadas en México aún se desconocen, así como el centro de origen de muchas de estas. El comercio global es considerado como una de las principales vías entre el ecosistema invadido y el hábitat original (Moralejo et al., 2009).

En México se tiene que prevenir la introducción de *Phytophthora* en los viveros a través de material vegetal infectado. Es necesaria una reevaluación urgente de las estrategias actuales de manejo en México para mejorarlas, particularmente mediante el uso de enfoques que tomen en cuenta los puntos críticos de control en viveros donde el riesgo de propagación de este importante patógeno de plantas puede ser mitigado. La detección de *Phytophthora* en viveros de México parece similar a la de otros países; sin embargo, en el país

esta situación es preocupante, por la gran dispersión de este patógeno, debido a la falta de regulación ya que no existe certificación de viveros. Es recomendable que trabajen de manera conjunta y coordinada las instituciones de gobierno y viveristas produciendo planta certificada libre de este patógeno para reducir la dispersión y afectaciones causadas por *Phytophthora* en viveros, bosques, jardines y campos agrícolas.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Especies de *Phytophthora* están afectando plantas de algunos viveros de la Ciudad de México el estado de Michoacán y Morelos.
- 2) Las plantas de vivero infectadas con *Phytophthora* son una fuente de inóculo en viveros de la ciudad de México, el estado de Michoacán y Morelos.
- 3) La presencia de *Phytophthora* en plantas de *Arctotis*, *Cineraria marítima*, *Pentas lanceolata*, *Ruta graveolens*, *Sempervivum* sp. y *Solenostemon* sp. como nuevos hospedantes de *Phytophthora*, indica que el rango de hospedantes conocidos se irá ampliando a medida que se realicen más estudios.
- 4) La coexistencia de especies de *Phytophthora* en un mismo vivero podría generar nuevos taxa vía hibridación.
- 5) La presencia del tipo de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora* en una misma planta de chile serrano, petunia y azalea indica que la reproducción sexual está ocurriendo en viveros de la Ciudad de México y Morelos. Repercutiendo en mayor cantidad de inóculo e infección de plantas por el patógeno al tener mayor variación genética.
- 6) La presencia de ambos tipos de compatibilidad de la misma especie o diferente en un mismo vivero sugiere mayor variabilidad y que nuevas especies podrían estar surgiendo.
- 7) Este estudio provee un mapa inicial de la estructura poblacional de los complejos *P. capsici* y *P. cryptogea* en viveros de México. Es necesario continuar con el genotipificado de aislados para expandir nuestro

conocimiento sobre la variación genética de estos patógenos de plantas en el país.

- 8) La estructura poblacional detectada impactará en el diseño e interpretación de estudios de *P. capsici* y *P. cryptogea*.

LITERATURA CITADA GENERAL

- Abad, Z. G., Burgess T., Bienapfl J. C., Redford A. J., Coffey M., and Knight L. (2019). IDphy: Molecular and Morphological Identification of *Phytophthora* Based on the Types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, and Centre for *Phytophthora* Science and Management. <http://idtools.org/id/phytophthora/index.php>. 7 de junio de 2019.
- Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., López-López, P., Latournerie-Moreno, L., Ramírez-Meraz, M., Villalón-Mendoza, H., y Aguilar Castillo, J. A. (2010). Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- Álvarez-Rodríguez, B., Ortiz-Meza, J.A., Rojo-Baez, I., Marquez-Zequera, I., Garcia-Estrada, R.S., Carrillo-Fasio, J.A., and Allende-Molar, R. (2013). First report of Vinca blight caused by *Phytophthora nicotianae* in Northwestern Mexico. *Plant Dis.* 97(9), 1257-1257. doi:10.1094/pdis-04-13-0400-pdn
- Álvarez-Rodríguez, B., Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Allende-Molar, R., y Santos-Cervantes, M.E. (2016). Caracterización de *Phytophthora nicotianae* causante de tizón de vinca en áreas urbanas y viveros de ornamentales en Culiacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(3), 242-257. doi:10.18781/r.mex.fit.1605-1
- Aragaki, M., and Uchida, J.Y. (2001). Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia*, 93(1), 137. doi:10.2307/3761611
- Barchenger, D.W., Lamour, K.H., Sheu, Z., Shrestha, S., Kumar, S., Lin, S.W., Burlakoti, R., and Bosland, P.W. (2017). Intra- and Intergenomic variation of ploidy and clonality characterize *Phytophthora capsici* on *Capsicum* sp. in Taiwan. *Mycological Progress*, 16(10), 955-963. doi:10.1007/s11557-017-1330-0
- Bertier, L., Leus, L., D'hondt, L., De Cock, A.W., and Höfte, M. (2013). Host adaptation and speciation through hybridization and polyploidy in *Phytophthora*. *PLoS ONE*, 8(12), 1-15. e85385. doi:10.1371/journal.pone.0085385
- Bezuidenhout, C., Denman, S., Kirk, S., Botha, W., Mostert, L., and McLeod, A. (2010). *Phytophthora* taxa associated with cultivated *Agathosma*, with emphasis on the *P. citricola* complex and *P. capensis* sp. nov. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 32-49. doi:10.3767/003158510x538371
- Bienapfl, J.C., and Balci, Y. (2014). Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's nursery trade. *Plant Disease*, 98(1), 134-144. doi:10.1094/pdis-06-13-0662-re

- Blair, J.E., Coffey, M.D., Park, S.Y., Geiser, D.M., and Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45(3), 266-277. doi:10.1016/j.fgb.2007.10.010
- Bonants, P.J., Hagenaar-de Weerd, M., Man in 't Veld, W.A., and Baayen, R.P. (2000). Molecular Characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology*, 90(8), 867-874. doi:10.1094/phyto.2000.90.8.867
- Brasier, C., and Kirk, S. (2004). Production of gametangia by *Phytophthora ramorum* in vitro. *Mycological Research*, 108(7), 823-827. doi:10.1017/s0953756204000565
- Brasier, C.M., Cooke, D.E., Duncan, J.M., and Hansen, E.M. (2003). Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides*-*P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research*, 107(3), 277-290. doi:10.1017/s095375620300738x
- Brasier, C.M., Kirk, S.A., Delcan, J., Cooke, D.E., Jung, T., and Man In't Veld, W.A. (2004). *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research*, 108(10), 1172-1184. doi:10.1017/s0953756204001005
- Braze, N.J., Yang, X., and Hong, C.X. (2016). *Phytophthora caryae* sp. nov., a new species recovered from streams and rivers in the eastern United States. *Plant Pathology*, 66(5), 805-817. doi:10.1111/ppa.12617
- Burgess, T.I., Scott, J.K., McDougall, K.L., Stukely, M.J., Crane, C., Dunstan, W.A., Brigg, F., Andjic, V., White, D., Rudman, T., Arentz, F., Ota, N. and Hardy, G.E. (2017). Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Global Change Biology*, 23(4), 1661-1674. doi:10.1111/gcb.13492
- Cacciola, S.O., Pane, A., Martini, P., Agosteo, G.E., Raudino, F. and Magnano, di San Lio. G. (2008). Recovery of *Phytophthora* species from potted ornamentals in commercial nurseries in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 90: S2.185
- Černý, K., Tomšovský, M., Mrázková, M. and Strnadová, V. (2011). The present state of knowledge on *Phytophthora* spp. diversity in forest and ornamental woody plants in the Czech Republic. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 41: (Supplement). S75-S82.
- Dart, N.L., and Chastagner, G.A. (2007). Estimated economic losses associated with the destruction of plants due to *Phytophthora ramorum* quarantine efforts in Washington State. *Plant Health Progress*, 8(1), 20. doi:10.1094/php-2007-0508-02-rs
- Dart, N.L., Chastagner, G.A., Rugarber, E.F., and Riley, K.L. (2007). Recovery frequency of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* spp. in the soil

- profile of ornamental retail nurseries. *Plant Disease*, 91(11), 1419-1422. doi:10.1094/pdis-91-11-1419
- Denton, G., Denton, J., Waghorn, I. and Henricot, B. (2008). *Phytophthora* diversity in UK gardens. *Journal of Plant Pathology*, 90:S2. 186
- De Cock, A., Lodhi, A., Rintoul, T., Bala, K., Robideau, G., Abad, Z.G., Lévesque, C. (2015). *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 25-39. doi:10.3767/003158515x685382
- Díaz-Celaya, M. (2011). Detección e identificación de especies de *Phytophthora* y *Pythium* en viveros de plantas ornamentales. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 82p.
- Donahoo, R.S., and Lamour, K.H. (2008). Interspecific hybridization and apomixis between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycologia*, 100(6), 911-920. doi:10.3852/08-028
- Erwin, D.C., & Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. *American Phytopathological Society*. 562 p.
- Fernández-Pavía, S. P., Díaz-Celaya, M., Rodríguez-Alvarado, G. (2013). *Phytophthora* in México. En: Lamour K. (Ed.). *Phytophthora* a global perspective. Cambridge, MA:CAB International, 166-177.
- Graham, J.H., Timmer, L.W., Drouillard, D.L., and Peever, T.L. (1998). Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. *Phytopathology*, 88(7), 724-729. doi:10.1094/phyto.1998.88.7.724
- Hall, K.M., and Albers, H.J. (2009). Economic analysis for the impact of *Phytophthora ramorum* on Oregon forest industries. <http://www.suddenoakdeath.org/?bibliography=economic-analysis-for-the-impact-of-phytophthora-ramorum-on-oregon-forest-industries>. (Consultada 11 junio de 2019).
- Hansen, E.M., Reeser, P.W., and Sutton, W. (2012). *Phytophthora borealis* and *Phytophthora riparia*, new species in *Phytophthora* ITS Clade 6. *Mycologia*, 104(5), 1133-1142. doi:10.3852/11-349
- Hardy, G.E. (1988). *Phytophthora* spp. Associated with container-grown plants in nurseries in Western Australia. *Plant Disease*, 72(5), 435. doi:10.1094/pd-72-0435
- Hardy, G.E., and Sivasithamparam, K. (1988). *Phytophthora* spp. Associated with container-grown plants in nurseries in Western Australia. *Plant Disease*, 72(5), 435-437. doi:10.1094/pd-72-0435
- Hendrix, F.F., Campbell, W.A., and Chien, C.Y. (1971). Some Phycomycetes indigenous to soils of old growth forests. *Mycologia*, 63(2), 283. doi:10.2307/3757761

- Hong, C., Richardson, P.A., Hao, W., Ghimire, S.R., Kong, P., Moorman, G.W., Lea-Cox, J. D. and Ross, D. S. (2012). *Phytophthora aquimorbida* sp. nov. and *Phytophthora* taxon 'aquatilis' recovered from irrigation reservoirs and a stream in Virginia, USA. *Mycologia*, 104(5), 1097-1108. doi:10.3852/11-055
- Hong, C.X., Gallegly, M.E., Richardson, P.A., Kong, P., Moorman, G.W., Lea-Cox, J.D., and Ross, D.S. (2010). *Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. *Plant Pathology*, 59(5), 913-921. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02323.x
- Hong, C.X., Richardson, P.A., Kong, P., Jeffers, S.N., and Oak, S.W. (2006). *Phytophthora tropicalis* isolated from diseased leaves of *Pieris japonica* and *Rhododendron catawbiense* found in irrigation water and soil in Virginia. *Plant Disease*, 90(4), 525-525. doi:10.1094/pd-90-0525c
- Ioos, R., Andrieux, A., Marçais, B., and Frey, P. (2006). Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology*, 43(7), 511-529. doi:10.1016/j.fgb.2006.02.006
- Jeffers, S.N., Schnabel, G., and Smith, J.P. (2004). First report of resistance to mefenoxam in *Phytophthora cactorum* in the United States and elsewhere. *Plant Disease*, 88(5), 576-576. doi:10.1094/pdis.2004.88.5.576a
- Jung, T., Jung, M., Scanu, B., Seress, D., Kovács, G., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T. T., Chandelier, A., Heungens, K., Van Pouche, K., Abad-Campos, P., Leon, M., Cacciola, S. O., and Bakonyi, J. (2017). Six new *Phytophthora* species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 38(1), 100-135. doi:10.3767/003158517x693615
- Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguín Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S. O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corcobado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Franceschini, A., Ginetti, B., Green, S., Glavendekić, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca, N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla-Vázquez, P. J., Marçais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., Nagy, Z. Á., Nechwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane, A., Paplomatas, E.J., Pintos Varela, C., Prospero, S., Rial-Martínez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytkönen, A., Sánchez, M. E., Sanz-Ros, A. V., Scanu, B., Schlenzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgø, V., Tomic, Z., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A. M., Wenneker, M., Woodward, S. and Pérez-Sierra, A. (2016). Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology*, 46(2), 134-163. doi:10.1111/efp.12239

- Jung, T., Stukely, M., Hardy, G., White, D., Paap, T., Dunstan, W., and Burgess, T. (2011). Multiple new *Phytophthora* species from ITS Clade 6 associated with natural ecosystems in Australia: evolutionary and ecological implications. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26(1), 13-39. doi:10.3767/003158511x557577
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J.D., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X. R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B. M., Grünwald, N. J., Mukhtar, M. S., Tomé, D.F., Tör, M., Van Den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W. E., Lindqvist-Kreuzer, H., Meijer, H.J., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P. R., and Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413-434. doi:10.1111/mpp.12190
- Kroon, L.P., Brouwer, H., De Cock, A.W., and Govers, F. (2012). The Genus *Phytophthora* Anno 2012. *Phytopathology*, 102(4), 348-364. doi:10.1094/phyto-01-11-0025
- Lamour, K. 2013. *Phytophthora: A Global Perspective*. CABI plant protection series. <https://books.google.com.mx/books?id=OpcbkhSE2lcC>
- Lamour, K.H., Daughtrey, M.L., Benson, D.M., Hwang, J., and Hausbeck, M.K. (2003). Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Disease*, 87(7), 854-858. doi:10.1094/pdis.2003.87.7.854
- Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J., and Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329-337. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Lévesque, A.C., and De Cock, A.W. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(12), 1363-1383. doi:10.1017/s0953756204001431
- Leyva-Mir, S.G., Tovar-Pedraza, J. M., Camacho-Tapia, M., Almaraz-Sánchez, A., and Silva, M.S. (2016). First Report of *Phytophthora tropicalis* causing wilt of *Cyclamen persicum* in Mexico. *Plant Disease*, 100(8), 1796. doi:10.1094/pdis-12-15-1465-pdn
- Liew, E., Maclean, D., and Irwin, J. (1998). Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycological Research*, 102(1), 73-80. doi:10.1017/s0953756297004450
- Linderman, R. G., and Zeitoun, F. (1977). *Phytophthora cinnamomi* causing root rot and wilt of nursery-grown native western azalea and salal. *Plant Disease Reporter*, 61:1045-1048.
- Man in 't Veld, W.A., De Cock, A.W., and Summerbell, R.C. (2006). Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new

- hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 117(1), 25-33. doi:10.1007/s10658-006-9065-9
- McLeod, A., and Coertze, S. (2007). First report of *Phytophthora cryptogea* on *Osteospermum* spp. in South Africa. *Plant Disease*, 91(3), 322-322. doi:10.1094/pdis-91-3-0322a
- Mills, S.D., Förster, H., and Coffey, M.D. (1991). Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analyses. *Mycological Research*, 95(1), 31-48. doi:10.1016/s0953-7562(09)81359-2
- Moralejo, E., Pérez-Sierra, A.M., Álvarez, L.A., Belbahri, L., Lefort, F., and Descals, E. (2009). Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology*, 58(1), 100-110. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01930.x
- Mundo-Ocampo, J. (2006). El vivero ornamental. 1st ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 461 pp.
- Olson, H.A., and Benson, D.M. (2011). Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease*, 95(8), 1013-1020. doi:10.1094/pdis-09-10-0619
- Olson, H.A., Carbone, I., and Benson, D.M. (2011). Phylogenetic history of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* isolates from floriculture crops in North Carolina greenhouses. *Phytopathology*, 101(11), 1373-1384. doi:10.1094/phyto-11-10-0302
- Parke, J.L., and Grünwald, N.J. (2012). A systems approach for management of pests and pathogens of nursery crops. *Plant Disease*, 96(9), 1236-1244. doi:10.1094/pdis-11-11-0986-fe
- Parke, J.L., Knaus, B.J., Fieland, V.J., Lewis, C., and Grünwald, N.J. (2014). *Phytophthora* community structure analyses in Oregon nurseries inform systems approaches to disease management. *Phytopathology*, 104(10), 1052-1062. doi:10.1094/phyto-01-14-0014-r
- Pérez-Sierra A., Mora-Sala B., León M., García-Jiménez J., y Abad-Campos P. (2012). Enfermedades causadas por *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 38:143-156.
- Pérez-Sierra, A. M., and Jung, T. (2013). *Phytophthora* in woody ornamentals. En: *Phytophthora a global perspective*. K, Lamour (ed.). CABI Plant Protection. 166-177. doi:10.1079/9781780640938.0166
- Prigigallo, M., Mosca, S., Cacciola, S., Cooke, D., and Schena, L. (2015). Molecular analysis of *Phytophthora* diversity in nursery-grown ornamental and fruit plants. *Plant Pathology*, 64(6), 1308-1319. doi: 10.1111/ppa.12362

- Prospero, S., and Cleary, M. (2017). Effects of host variability on the spread of invasive forest diseases. *Forests*, 8(3), 80: 1-21. <https://doi.org/10.3390/f8030080>
- Quesada-Ocampo, L. M., Granke, L. L., Mercier, M. R., Olsen, J., Hausbeck, M. K. (2011). Investigating the genetic structure of *Phytophthora capsici* populations. *Phytopathology*, 101(9):1061-1073.
- Rea, A., Jung, T., Burgess, T., Stukely, M., and Hardy, G. (2010). *Phytophthora elongate* sp. nov., a novel pathogen from the *Eucalyptus marginata* forest of Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 39(6), 477-491. doi: 10.1071/ap10014
- Reeser, P., Sutton, W., and Hansen, E. (2013). *Phytophthora pluvialis*, a new species from mixed tanoak-Douglas-fir forests of western Oregon, U.S.A. *North American Fungi*, 8 (7), 1-8. doi:10.2509/naf2013.008.007
- Reeser, P.W., Hansen, E.M., and Sutton, W. (2007). *Phytophthora siskiyouensis*, a new species from soil, water, myrtlewood (*Umbellularia californica*) and tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) in southwestern Oregon. *Mycologia*, 99(5), 639-643. doi:10.3852/mycologia.99.5.639
- Reeser, P.W., Sutton, W., Hansen, E.M., Goheen, E.M., Fieland, V.J., and Grünwald, N.J. (2015). First report of *Phytophthora occultans* causing root and collar rot on *Ceanothus*, *Boxwood*, *Rhododendron*, and other hosts in horticultural nurseries in Oregon, USA. *Plant Disease*, 99(9), 1282. doi:10.1094/pdis-02-15-0156-pdn
- Rizzo, D.M., Garbelotto, M., and Hansen, E.M. (2005). *Phytophthora ramorum*: Integrative Research and management of an emerging pathogen in California and Oregon Forests. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 309-335. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140418
- Rodríguez, V. M., Luna-Ruiz, J. J., Valle-García, P., Tiscareño-López, M., y Ruiz-Corral, J. A. (2004). Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el Centro-Norte de México mediante un sistema de información geográfica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1): 72–81.
- Romero-Cova, S., and Solis-Aragon, G. (1996). New hosts of some species of the genus *Phytophthora* (Phycomycetes: Pythiaceae) in Mexico. *Agrociencia*, 30: 241-247.
- Rooney-Latham, S., Blomquist, C.L., Kosta, K.L., Gou, Y.Y., and Woods, P.W. (2019). *Phytophthora* species are common on nursery stock grown for restoration and revegetation purposes in California. *Plant Disease*, 103(3), 448-455. doi:10.1094/pdis-01-18-0167-re
- Roy, S. G., and Grünwald, N. J. (2014). The plant destroyer genus *Phytophthora* in the 21st century. *Review of Plant Pathology*. 6: 387-412.

- Sánchez-Gurrola, C., Gómez-Dorantes, N., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S.P., y Ávila-Quezada, G. 2019. Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 37 (1): 65-71.
- Schwingle, B. W., Smith, J. A., and Blanchette, R. A. (2007). *Phytophthora* species associated with diseased woody ornamentals in Minnesota nurseries. *Plant Disease*, 91:97-102.
- Silva-Rojas, H. V., Fernández-Pavía, S. P., Góngora-Canul, C., Macías-López, B. C., y Ávila-Quezada, G. D. (2009). Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 134-147.
- Stukely, M.J., Webster, J.L., Ciampini, J.A., Brown, E., Dunstan, W.A., Hardy, G.E., Woodman, G. E., Davison, E.M., and Tay, F.C. (2007). *Phytophthora inundata* from native vegetation in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 36(6), 606-608. doi:10.1071/ap07073
- Turner, R.S. (2005). After the famine: Plant pathology, *Phytophthora infestans*, and the late blight of potatoes, 1845–1960. *Historical Studies in the Physical and Biological Sciences*, 35(2), 341-370. doi:10.1525/hsp.2005.35.2.341
- Vettraino, A.M., Brasier, C.M., Brown, A.V., and Vannini, A. (2011). *Phytophthora himalsilva* sp. nov. an unusually phenotypically variable species from a remote forest in Nepal. *Fungal Biology*, 115(3), 275-287. doi:10.1016/j.funbio.2010.12.013
- Warfield, C.Y., Hwang, J., and Benson, D.M. (2008). *Phytophthora* blight and dieback in North Carolina nurseries during a 2003 survey. *Plant Disease*, 92(3), 474-481. doi:10.1094/pdis-92-3-0474
- Yakabe, L.E., Blomquist, C.L., Thomas, S.L., and MacDonald, J.D. (2009). Identification and frequency of *Phytophthora* species associated with foliar diseases in California ornamental nurseries. *Plant Disease*, 93(9), 883-890. doi:10.1094/pdis-93-9-0883
- Yang, X., Balci, Y., Brazee, N.J., Loyd, A.L., and Hong, C.X. (2016). A unique species in *Phytophthora* clade 10, *Phytophthora intercalaris* sp. nov., recovered from stream and irrigation water in the eastern USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 845-855. doi:10.1099/ijsem.0.000800
- Yang, X., Copes, W.E., and Hong, C. (2014). Two novel species representing a new clade and cluster of *Phytophthora*. *Fungal Biology*, 118(1), 72-82. doi:10.1016/j.funbio.2013.11.003
- Yang, X., Gallegly, M.E., and Hong, C. (2014). A high-temperature tolerant species in clade 9 of the genus *Phytophthora*: *P. hydrogena* sp. nov. *Mycologia*, 106(1), 57-65. doi:10.3852/13-043

Yang, X., Tyler, B.M., and Hong, C. (2017). An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus*, 8(2), 355-384.
doi:10.5598/ima fungus.2017.08.02.09

Zitko, S. E., Timmer, L. W., and Sandler, H. A. (1991). Isolation of *Phytophthora palmivora* pathogenic to citrus in Florida. *Plant Disease*, 75(5), 532-535.

ANEXO

Medios de cultivo

Cantidades para preparar 1 litro de medio de cultivo, todos los medios se mezclan y posteriormente se esterilizan 20 min a 121 °C.

Agar harina de maíz (AHM)

17 g de agar harina de maíz

1000 mL de agua destilada

Agar V8 (AV8)

15 g de agar

3 g de carbonato de calcio CaCO_3

160 mL de jugo de verduras V8 (Campbell's)

840 mL de agua destilada

Agar harina de maíz o V8 selectivo (NARPH)

Preparar 1 L de medio de agar harina de maíz o V8, esterilizar.

Enfriar el medio (49 °C) y agregar 2 mL de los siguientes fungicidas y antibióticos:

- PCNB
- Natamicina (Delvolid)
- Ampicilina
- Rifampicina
- Himexazol

Considerar el volumen de los antibióticos antes de agregar el agua destilada al medio de cultivo. Ejemplo: si se prepara 1L de medio se agregan solamente 990

mL de agua destilada, cuando los antibióticos y fungicidas están disueltos en 10 mL.

La rifampicina tiene que cubrirse y/o estar en oscuridad durante el descongelamiento, debido a que es altamente sensible a luz.

Las cajas Petri se cubren con papel aluminio antes de almacenar para evitar la degradación de los antibióticos por la luz.

Agua agar

15 g de agar bacteriológico

1000 mL de agua destilada

Agar papa dextrosa (PDA)

39 g de agar papa dextrosa

1000 mL de agua destilada

Medio agar ejote

339 g de gerber de ejote Nestlé®

15 g de agar bacteriológico

646 mL de agua destilada

Medio LB (Luria Bertani). Medio para detectar presencia de bacterias en los cultivos

1. Disolver 20 g de agar en 1L de agua.
2. Agregar 2 mL a cada tubo de ensayo.
3. Esterilizar los tubos con medio a 121 °C por 20 min.

4. Dejar enfriar y almacenar a 15 °C.
5. Usar hasta el día siguiente para asegurar que no hay presencia de contaminantes en el medio.

Procedimiento para detectar contaminación bacteriana:

1. Seleccionar cajas de cultivo de las que se sospeche están contaminadas con bacterias. Realizar cortes de cubos de 5 mm² aproximadamente de medio mas micelio de diversas partes de la caja.
2. Colocar de tres a cuatro cuadros de medio (agar) con micelio en un tubo con medio estéril Luria Bertani bajo condiciones asépticas, cerrar e incubar a temperatura del laboratorio (24 °C) por al menos 24 h.
3. Realizar observaciones despues de 24 h. Si el medio está turbio significa que hay bacterias, es decir que está contaminando el cultivo, si permanece cristalino (claro) indica ausencia de bacterias.

Agar papa dextrosa (PDA) + ácido tartárico

Preparar 1 L de PDA esterilizar.

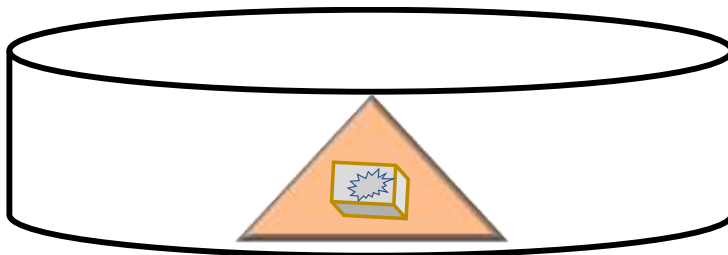
En un tubo preparar 14 mL de ácido tartárico a 10% y esterilizar (1.4 g de ácido tartárico en 14 mL).

Mezclarlos antes de vaciar el medio en las cajas Petri.

Método de superposición para limpieza de aislados contaminados con bacterias

1. Cortar un cubo de 5 mm² aproximadamente de medio mas micelio contaminado con bacterias y colocarlo en una caja petri nueva estéril, orientando el crecimiento micelial hacia arriba.

2. Colocar sobre el cubo un triángulo de medio selectivo V8 (NARPH).
3. Incubar las cajas en oscuridad a 25 °C.
4. Realizar observaciones periódicas con el microscopio estereoscópico para ver si creció micelio sobre el triángulo.
5. Si se observa micelio sobre el triángulo tomar micelio y transferir a cajas con medio.



Metodo de superposición. El triángulo se coloca sobre el bloque de agar con el micelio contaminado.

Limpieza de aislados en medio PDA mas ácido tartárico

1. Cortar un cubo de 5 mm² aproximadamente de medio mas micelio contaminado con bacterias y colocarlo en una caja Petri con medio PDA mas ácido tartárico orientando el crecimiento micelial hacia abajo, teniendo contacto el micelio con el medio PDA mas ácido tartárico.
2. Incubar las cajas a 25 °C y realizar observaciones periódicas y transferir el micelio a cajas Petri con medio HMA.

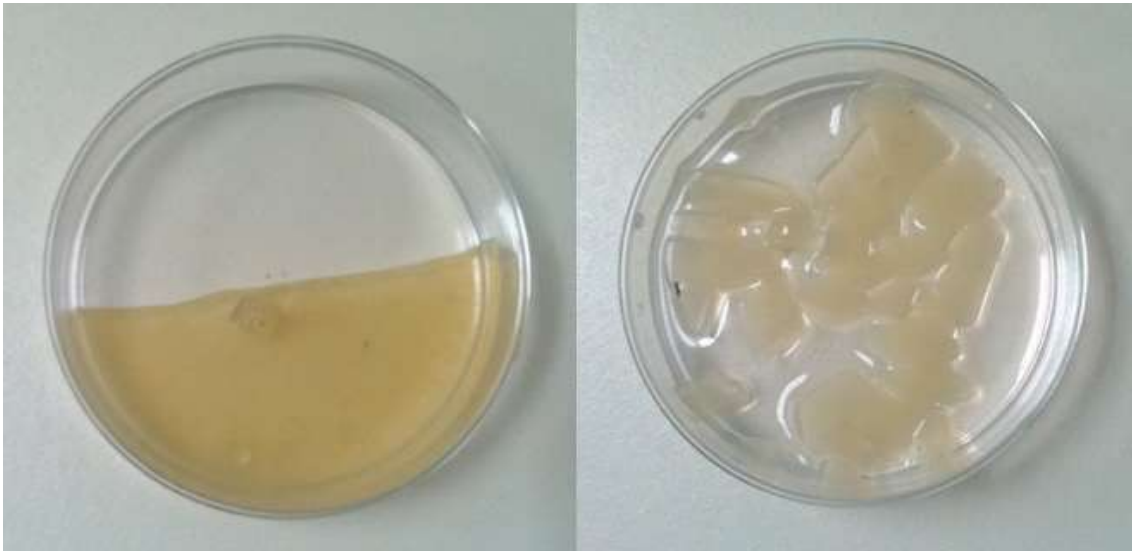
Extracto de suelo no estéril para inducir la formación de esporangios

1. Pesar 20 g de suelo de campo y colocar en un matraz de 2 L.
2. Agregar al matraz 1L de agua destilada estéril.

3. Colocar el suelo en agitación constante durante 3 h a temperatura ambiente usando una barra magnética. Se recomienda agitar a una velocidad de 6.
4. Filtrar usando una bomba de vacío, en un matraz Kitasato, colocar un embudo de porcelana y papel filtro de diferente tamaño de poro en el siguiente orden: número 2 GF/A de 1.6 μm y GF/C de 1.2 μm .
5. Filtrar tres veces con el filtro GF/A de 1.6 μm y tres veces con el GF/C de 1.2 μm .
6. Colocar el líquido del extracto de suelo en frascos color ámbar y almacenar a 4 °C.
7. El líquido del extracto de suelo se agrega a las cajas con bloques de medio V8, a la misma temperatura que están los bloques para evitar la liberación de zoosporas por el cambio de temperatura.

Inducción de esporulación

1. Sembrar un bloque de medio con micelio de los aislados en medio V8 agar y dejar crecer de 3 a 5 días.
2. Cortar la mitad del medio V8 agar y transferir una mitad a una caja estéril.
3. Cortar bloques de 5 mm² aproximadamente en las dos cajas y agregar suficiente agua destilada estéril hasta 3/4 del bloque sin que el agua los cubra.
4. Incubar bajo luz blanca fluorescente y cambiar cada 24 h el agua destilada estéril hasta observar esporangios.



La figura del lado izquierdo muestra la mitad de medio V8 mas micelio y la del lado derecho con los bloques y agua destilada estéril.

Protocolo para aislamiento de *Phytophthora* de tejido

1. Lavar con agua de la llave el tejido con síntomas.
2. Cortar en pequeñas secciones de 5 a 10 mm² aproximadamente usando un bisturí estéril a partir del borde de la lesión.
3. Enjuagar los cortes de tejido con agua destilada estéril.
4. Para la desinfestación del tejido se probaron tres variantes:
 - a. Los cortes de tejidos de la planta se enjuagan dos veces, secan y se siembran directamente en el medio de cultivo.
 - b. Los cortes de tejidos se sumergen en etanol a 70% durante 30 seg, se secan y siembran en el medio de cultivo.
 - c. Los cortes de tejidos se colocan en una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) a 10% durante 30 seg, enjuagar, secar y sembrar en el medio de cultivo.
5. Los cortes de tejido se enjuagan con agua destilada estéril.

6. Se colocan sobre papel absorbente estéril para retirar el exceso de agua, para evitar que crezcan bacterias.
7. Las secciones de tejido se transfieren con pinzas estériles a cajas Petri con medio selectivo V8 o HMA (NARPH) y se incuban a temperatura constante de 25 °C hasta observar crecimiento de colonias.



Secciones de tejido sembradas en medio de cultivo

Aislamiento de *Phytophthora* de suelo o sustrato de siembra

1. Tomar una muestra de suelo de 10 g de una planta con síntomas de marchitez, suelo o sustrato de siembra y colocarlo en una caja de Petri con 20 mL de agua destilada estéril. Colocar como tejido trampa hojas completas de *Rhododendron* spp. (azalea) e incubar de 24 a 48 h a 25 °C en obscuridad.

2. Las hojas completas se desinfectan con una solución de cloro comercial (Clorox®) a 1% durante 30 seg y se secan con toallas de papel absorbente estéril.
3. El peciolo necrosado se corta y siembra en medio selectivo V8 (NARPH).
4. Incubar a 25 °C en oscuridad hasta observar crecimiento de colonias.

Nota: Las hojas de *Rhododendron* spp. antes de colocarlas en las cajas Petri con suelo o sustrato de siembra deben lavarse con agua y jabón. Preferentemente tomar hojas jóvenes (en desarrollo) de la parte apical de la planta.



Peciolos de hojas de *Rhododendron* sp. sembrados en medio selectivo V8 (NARPH).

LOGROS ACADÉMICOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Alejandro Soto-Plancarte, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Yolanda Leticia Fernández-Pavía, Martha Elena Pedraza-Santos, Luis López-Pérez, Marlene Díaz-Celaya y Sylvia Patricia Fernández-Pavía. 2017. **Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(8), pp1867-1880.

Soto-Plancarte A, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, López-Pérez L, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, Álvarez-Vargas JE. 2018. ***Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2). Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-5.

ASESORÍA A PRODUCTORES

Evaluación fitosanitaria de cultivos de chile en el Municipio de Queréndaro, Michoacán, para el diagnóstico de la marchitez causada por *Phytophthora capsici* y recomendaciones para su control. Queréndaro, Michoacán, México. 30 de octubre de 2017.

CONGRESOS

Alejandro Soto-Plancarte, Kurt Lamour, Sylvia P. Fernández-Pavía. ***Phytophthora* species detected in ornamental nurseries in Mexico.** LV Sociedad Americana de Fitopatología (APS-División Caribe), XVIII Asociación Latinoamericana de Fitopatología (ALF), XVII Congreso Internacional y XLII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). International Congress of Plant Pathology. Distrito Federal, México. 19 al 22 de julio de 2015. (Presentación oral).

Soto-Plancarte A, Fernández-Pavía Y.L., Pedraza-Santos M.E., Rodríguez-Alvarado G. Lopez-Perez L., Fernández-Pavía S.P. **Plantas ornamentales infectadas por *Phytophthora*.** XV Congreso Nacional y VIII Internacional de Horticultura Ornamental. Chapingo, México. 17 al 21 agosto de 2015. (Presentación oral).

Alejandro Soto Plancarte, Gerardo Rodríguez Alvarado y Sylvia P. Fernández Pavía. **Coexistencia y variación estacional de especies de *Phytophthora* en plantas ornamentales cultivadas en viveros comerciales.** Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, 5º Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 9 al 11 de diciembre de 2014. (Poster).

Alejandro Soto-Plancarte, Yolanda Leticia Fernández-Pavía, Martha Elena Pedraza-Santos, G. Rodríguez Alvarado, L. López-Pérez y S.P. Fernández-Pavía. **Formación de oosporas de *Phytophthora* en medio agar ejote**. XLIII Congreso Nacional y XVIII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Mazatlán, Sinaloa, México. 3 al 7 de julio de 2016. (Poster).

Alejandro Soto Plancarte, André Lévesque, Tara Rintoul, Yolanda Leticia Fernández Pavía, Martha Elena Pedraza Santos, Gerardo Rodríguez Alvarado, Luis López Pérez y Sylvia Patricia Fernández Pavía. **Mating types A1 and A2 of different *Phytophthora* spp. occurring in ornamental nurseries in México**. The American Phytopathological Society Pacific Division. Riverside, California, E.U.A. 27 al 29 de Junio de 2017. Diciembre supplement (S5.1-S5.207) *Phytopathology* 107:S5.180. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-107-12-S5.180>. (Poster).

A. Soto-Plancarte, C.A. Lévesque, T. Rintoul, G. Rodríguez-Alvarado, Y.L. Fernández-Pavía, M.E. Pedraza-Santos, L. López-Pérez y S.P. Fernández-Pavía. **Plantas ornamentales hospedantes de *Phytophthora***. XVI Congreso Nacional y IX Internacional de Horticultura Ornamental. Tapachula, Hueuetán, Chiapas, México. 21 al 25 de agosto de 2017. (Poster).

A. Soto-Plancarte, C.A. Lévesque, T. Rintoul, G. Rodríguez-Alvarado, Y.L. Fernández-Pavía, M.E. Pedraza-Santos, L. López-Pérez y S.P. Fernández-Pavía. **Estructura genética de los complejos *P. cryptogea* y *P. capsici* de viveros de México**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Reunión académica del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas (PIDCB). Morelia, Michoacán, México. 27 y 28 de noviembre de 2017. (Presentación oral).