



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES
MAESTRIA INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLOGICAS

TESIS

VARIABILIDAD DE AISLADOS DE *Phytophthora capsici* Y
***Phytophthora drechsleri* PROVENIENTES DE**
PLANTAS ORNAMENTALES

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA

ING. ANA LUISA MORA DAÑINO

ASESOR DRA. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVIA

CO-ASESOR DR. GERARDO RODRÍGUEZ ALVARADO

Michoacán, México

Agosto 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH durante el desarrollo de esta investigación. Por compartir conmigo sus conocimientos y dirigirme en este proceso de crecimiento profesional y personal.

Al Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado por su paciencia, apoyo y dirección en el desarrollo del análisis molecular de este trabajo de investigación.

A la Dra. Martha Elena Pedraza Santos por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento y cada una de sus atinadas observaciones. Por su aportación con material vegetal para los análisis de virulencia y rango de hospedantes.

Al Dr. John Larsen y al Dr. Rafael Salgado Garciglia por entender y acompañarme en el desarrollo de este proceso de investigación, al realizar observaciones para la mejora de esta investigación.

Al Dr. Frank Martin por sus sugerencias para modificar los protocolos de amplificación.

Al personal académico y administrativo que me apoyó durante mi estancia en esta Universidad para comenzar y finalizar este proceso.

Especiales agradecimientos a la MC Marlene Díaz Celaya, MC Ma. del Rosario Gregorio Cipriano y MC Nuria Gómez Dorantes que me compartieron experiencias, conocimientos, momentos de risas y su tiempo en todo momento que requerí de su apoyo. A la MC Carla Paola Quinto Álvarez por ser compañera en el camino. Un agradecimiento especial al MC Ricardo Santillan Mendoza por su apoyo en el trabajo molecular.

Al Dr. Angel Rebollar Alviter quien fue el que colocó bajo mis pies el primer escalón para llegar a este lugar de investigación. Gracias Amigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de la presente investigación.

DEDICATORIA

CON AMOR...

Al creador universal y todos los seres de luz con quien comparto este universo.

A mi esposo

Gilberto Ramos Sánchez por tu bendito amor y apoyo en todo momento del camino que hemos compartido.

A mis hijos

Cintli Elizabeth, Andrea Yolitzin y Alejandro Ramos, por ser mi motivo.

A mis padres

Lucia y Rafael por traerme a este maravilloso mundo, a mis hermanos Rafael y Carlos Alberto por compartir esta vida.

A todos mis familiares, amigos y personas que de una manera u otra me han alentado a continuar en la lucha día a día.

GRACIAS

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN GENERAL	xv
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Oomicetes que provocan enfermedades en ornamentales	2
<i>Phytophthora capsici</i>	3
<i>Phytophthora drechsleri</i>	5
II. HIPÓTESIS	7
III. OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
CAPÍTULO 1. VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE <i>Phytophthora capsici</i> Y <i>Phytophthora drechsleri</i> PROVENIENTES DE PLANTAS ORNAMENTALES CON EL USO DE MARCADORES FENOTÍPICOS	
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1.1 INTRODUCCIÓN	10
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	14
1.2.1 Tipo de compatibilidad del aislado PV-29	15
1.2.2 Resistencia a mefenoxam	16
1.2.3 Virulencia de los aislados y rango de hospedantes	16

1.2.3.1 Aislados de <i>Phytophthora capsici</i>	16
a) Inoculación de plantas de chile ornamental y chile serrano var. Camino Real	17
b) Inoculación de plantas de teléfono	17
1.2.3.2 Aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i>	18
a) Inoculación de plantas de gazania	19
b) Inoculación de plantas de nochebuena	19
c) Inoculación de plantas de petunia	20
1.2.4 Análisis de datos	21
1.3 RESULTADOS	22
1.3.1. Reactivación de aislados	22
1.3.2 Tipo de compatibilidad	23
1.3.3 Resistencia a mefenoxam	23
1.3.4 Virulencia y rango de hospedantes	24
1.3.4.1 Inoculación de aislados de <i>Phytophthora capsici</i>	24
a) Chile serrano var. Camino Real	24
b) Chile ornamental	27
c) Planta de teléfono	28
d) Rango de hospedantes	30
1.3.4.2 Inoculación de aislados de <i>P. drechsleri</i>	31
a) gazania	31
b) nochebuena	32
c) petunia	38

d) Rango de hospedantes	38
1.4 DISCUSION	40
1.5 CONCLUSIONES	44
1.6 LITERATURA CITADA	45
CAPÍTULO 2. VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE <i>Phytophthora capsici</i> Y <i>Phytophthora drechsleri</i> PROVENIENTES DE PLANTAS ORNAMENTALES CON EL USO DE MARCADORES MOLECULARES	
RESUMEN	52
ABSTRACT	53
2.1 INTRODUCCIÓN	54
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	59
2.2.1 Aislados y extracción de ADN	59
2.2.2 Amplificación de ADN	59
2.2.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos	61
2.2.4 Polimorfismos en la secuencia de nucleótidos	61
2.3 RESULTADOS	62
2.3.1. Amplificación por PCR	62
2.3.1.1 Gen 60S ribosomal	62
2.3.1.2 Gen Citocromo oxidasa (Cox I)	62
2.3.1.3 Gen Citocromo oxidasa (Cox II)	63
2.3.2 Secuencia consenso	64
2.3.2.1 Gen 60S ribosomal	64
2.3.2.2 Gen Citocromo oxidasa (Cox I)	66
2.3.2.3 Gen Citocromo oxidasa (Cox II)	66

2.3.3 Polimorfismo en la secuencia de nucleótidos	68
2.3.3.1 Gen 60S ribosomal	68
2.3.3.2 Gen Citocromo oxidasa (Cox I)	70
2.3.3.3 Gen Citocromo oxidasa (Cox II)	71
2.4 DISCUSIÓN	73
2.5 CONCLUSIONES	77
2.6 LITERATURA CITADA	78
DISCUSIÓN GENERAL	82
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	84
LITERATURA COMPLEMENTARIA	86

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Hospedantes de especies ornamentales en los que se ha reportado <i>Phytophthora capsici</i> .	4
Cuadro 2 Hospedantes de especies ornamentales en los que se ha reportado <i>Phytophthora drechsleri</i> .	5
Cuadro 3 Tipo de compatibilidad y resistencia a mefenoxam de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	13
Cuadro 4 Aislados de <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	14
Cuadro 5 Especies vegetales utilizadas para determinar virulencia, agresividad y rango de hospedantes de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de plantas ornamentales.	17
Cuadro 6 Especies vegetales utilizadas para determinar virulencia, agresividad y rango de hospedantes de aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	18
Cuadro 7 Aislados reactivados de <i>Phytophthora capsici</i> y <i>P. drechsleri</i> provenientes de plantas ornamentales.	22
Cuadro 8 Resistencia a mefenoxam de aislados de <i>P. capsici</i> y <i>P. drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	23
Cuadro 9 Oligonucleótidos para la amplificación del ADN de los aislados de <i>P. capsici</i> y <i>P. drechsleri</i> mediante PCR.	60
Cuadro 10 Porcentaje de identidad de los aislados de <i>Phytophthora</i> analizados utilizando secuencias del gen 60S ribosomal <i>P.</i>	65

capsici.

Cuadro 11	Porcentaje de identidad de los aislados de <i>Phytophthora</i> analizados utilizando secuencias del gen 60S ribosomal <i>P. drechsleri</i> .	65
Cuadro12	Porcentaje de identidad de los aislados de <i>Phytophthora</i> analizados utilizando secuencias del gen Cox I <i>P. drechsleri</i> .	66
Cuadro 13	Porcentaje de identidad de los aislados de <i>Phytophthora</i> analizados utilizando secuencias del gen Cox II <i>P. capsici</i> .	67
Cuadro 14	Porcentaje de identidad de los aislados de <i>Phytophthora</i> analizados utilizando secuencias del gen Cox II <i>P. drechsleri</i> .	67
Cuadro 15	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen 60S de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de plantas ornamentales.	68
Cuadro 16	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen 60S de aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	69
Cuadro 17	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen 60S de aislados de <i>Phytophthora</i> sp. “ <i>kelmania</i> ” obtenidos de plantas ornamentales.	69
Cuadro 18	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox I de aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	70
Cuadro 19	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox I de aislados de <i>Phytophthora</i> sp. “ <i>kelmania</i> ” obtenidos de plantas ornamentales.	70

Cuadro 20	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox II de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de plantas ornamentales.	71
Cuadro 21	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox II de aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales.	72
Cuadro 22	Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox II de aislados de <i>Phytophthora</i> sp. “ <i>kelfmania</i> ” obtenidos de plantas ornamentales.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	25
Plantas de <i>Capsicum annuum</i> (chile serrano var. Camino Real) a los 14 días post-inoculación con aislados de <i>Phytophthora capsici</i> provenientes de <i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental): a) PV-30, b) PV-35, c) PV-36, d) PV-46, e) PV-15, f) PV-30, g) PV-33 y d) Testigo.	
Figura 2	26
Plantas de <i>Capsicum annuum</i> (chile serrano var. Camino Real) sanas a los 14 días post-inoculación con aislados de <i>Phytophthora capsici</i> provenientes de: a) PV-41 de <i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono), b) <i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo) PV-44 y c) Testigo.	
Figura 3	26
Índice de severidad en plantas de <i>Capsicum annuum</i> (chile serrano var. Camino Real) en diferentes días post-inoculación (dpi) con aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de plantas ornamentales: <i>Capsicum annuum</i> (Cap), <i>Cestrum nocturnum</i> (Ces), <i>Epipremnum aureum</i> (Epi) y <i>Solanum ovigerum</i> (Sol).	
Figura 4	27
Plantas de <i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental) a los 20 días post-inoculación con aislados de <i>Phytophthora capsici</i> provenientes de: a) y b) <i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental) PV-35 y PV-46 respectivamente, c) <i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo) PV-44 y d) <i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono) PV-41.	
Figura 5	28
Índice de severidad en plantas de chile ornamental en diferentes días post-inoculación (dpi) con aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de diferentes plantas	

ornamentales: *Capsicum annuum* (Cap), *Cestrum nocturnum* (Ces), *Epipremnum aureum* (Epi) y *Solanum ovigerum* (Sol).

- | | | |
|------------------|--|----|
| Figura 6 | Plantas de <i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono) inoculadas con aislados de <i>P. capsici</i> a) Marchitez, amarillamiento y necrosis ocasionadas por el aislado PV-41 de planta de teléfono, b) Necrosis en el tallo con PV-41, c) Marchitez y amarillamiento con el aislado PV-15 chile ornamental y d) Cultivos de <i>P. capsici</i> obtenidos de tejido de plantas inoculadas con PV-15 y PV-41. | 30 |
| Figura 7 | Porcentaje de plantas muertas de tres hospedantes inoculados con aislados de <i>Phytophthora capsici</i> obtenidos de plantas ornamentales: <i>Capsicum annuum</i> (Cap), <i>Cestrum nocturnum</i> (Ces), <i>Epipremnum aureum</i> (Epi) y <i>Solanum ovigerum</i> (Sol). | 31 |
| Figura 8 | Plantas de <i>Gazania</i> sp. (gazania) inoculadas con aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> . Sin síntomas de marchitez y/o necrosis y con botones florales. | 32 |
| Figura 9 | Plantas de nochebuena var. Valenciana inoculadas con aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> : a) Inoculación en ramas con micelio en cubos de agar, b) Necrosis en el tallo ocasionado por el aislado PV-27 obtenido de <i>Gerbera</i> sp. (gerbera) a los ocho días post-inoculación, c) Aislado PV-27 y testigo a los 12 dpi y d) Plantas con aislado PV-29 de <i>Gazania rigens</i> (gazania) y Testigo sin síntomas. | 33 |
| Figura 10 | Índice de severidad en plantas de nochebuena var. Valenciana en diferentes días post-inoculación (dpi) en | 34 |

ramas, con aislados de *Phytophthora drechsleri* provenientes de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp. (Ger).

- Figura 11** Plantas de nochebuena var. Freedom Red inoculadas con aislados de *P. drechsleri* en ramas: a) y b) Marchitez a los cinco dpi con aislado PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) y con aislado PV-39 de *Arctotis* sp. (margarita africana) respectivamente, c) Plantas sanas a los 13 dpi con aislado PV-40 de *Gazania* sp. (gazania) en donde solo murió una planta y d) Plantas sanas de testigo a los 13 dpi. 35
- Figura 12** Índice de severidad en plantas de nochebuena var. Freedom Red, en diferentes días post-inoculación (dpi) en ramas, con aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp (Ger). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo. 36
- Figura 13** Plantas de nochebuena var. Freedom Red inoculadas con aislados de *P. drechsleri* en suelo a 20 dpi a) y b) Muerte de plantas con el aislado PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) y PV-47 de *Gerbera* sp. (gerbera). 37
- Figura 14** Índice de severidad en plantas de nochebuena var. Freedom Red en diferentes días post-inoculación (dpi) en suelo con aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp 37

(Ger). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo.

Figura 15	Plantas de petunia 22 días post-inoculación con aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> : a) Plantas con marchitez ocasionada con el aislado PV-40 de <i>Gazania</i> sp. (gazania) y b) Plantas inoculadas con PV-29 de <i>Gazania</i> sp. (gazania), en donde se observan plantas muertas.	38
Figura 16	Porcentaje de plantas muertas inoculadas en cinco hospedantes con aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> obtenidos de plantas ornamentales: <i>Arctotis</i> sp. (Arc), <i>Euphorbia pulcherrima</i> (Eup), <i>Gazania</i> sp. (Gaz) y <i>Gerbera</i> sp (Ger).	39
Figura 17	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> (P.c.) y <i>Phytophthora drechsleri</i> (P.d.) amplificados con el gen 60S ribosomal por PCR.	62
Figura 18.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de <i>Phytophthora drechsleri</i> (P.d.) amplificado con el gen Cox I por PCR.	63
Figura 19	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> (P.c.) y <i>Phytophthora drechsleri</i> (P.d.) amplificados con el gen Cox II por PCR.	63
Figura 20	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> (P.c.) y <i>Phytophthora drechsleri</i> (P.d.) amplificados con el gen Cox II por PCR.	64

VARIABILIDAD DE AISLADOS DE *Phytophthora capsici* Y *Phytophthora drechsleri* PROVENIENTES DE PLANTAS ORNAMENTALES

RESUMEN GENERAL

La producción de ornamentales en nuestro país se estima en unos seis mil millones de pesos, las entidades federativas que destacan son el Estado de México, Morelos y Puebla que concentran el 89% del valor nacional ornamental, el 11% restante se encuentra en diecisiete entidades de las que sobresalen Baja California, Distrito Federal y Michoacán. Como toda actividad productiva, durante el proceso de producción, traslado, almacén y venta al cliente, existe el riesgo potencial de pérdidas por la presencia de plagas y enfermedades. Diversos investigadores señalan que para poder realizar un adecuado control de éstos, es necesario conocer mejor al patógeno o plaga que está afectando a la planta. En el estado de Michoacán, México se aislaron oomicetes de ornamentales de viveros entre las que se encuentran dos especies del género *Phytophthora*, las cuales han sido poco estudiadas, por lo que en este trabajo se planteó como objetivo analizar la variabilidad genética de aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* provenientes de plantas ornamentales a través de la utilización de marcadores fenotípicos y moleculares. Con el marcador fenotípico tipo de compatibilidad, se detectó un aislado estéril en *P. drechsleri*. Por otra parte, al realizar el análisis del marcador resistencia al fungicida mefenoxam, se determinó que 14 de los aislados de las dos especies (nueve de *P. capsici* y cinco de *P. drechsleri*) son sensibles a éste y sólo uno de cada especie presentó resistencia intermedia al fungicida. En cuanto a la virulencia para *P. capsici* se encontró que el aislado de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) no fue virulento en ninguno de los otros dos hospedantes inoculados y que es un aislado que presenta características entre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora tropicalis*. El aislado de *Solanum ovigerum* (planta de huevo) y todos los aislados obtenidos de *Capsicum annuum* (chile ornamental) fueron virulentos en chile ornamental y en *Capsicum annuum* (chile serrano var. Camino Real). En los aislados de *Phytophthora drechsleri* se observó que los obtenidos de *Arctotis* sp. (margarita africana), *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena), *Gazania* sp. (gazania) y *Gerbera* sp. (gerbera) pueden ser virulentos en otras especies diferentes de las que fueron aislados. En cuanto a la variabilidad genética a través de la reacción en cadena de la polimerasa, se realizó la amplificación de los genes Cox I, Cox II y 60S ribosomal

(Proteína L10); con las secuencias obtenidas se realizó el Blast para encontrar porcentajes de similitud utilizando las bases de datos Phytophthora Database y Barcode of Life Data Systems. El gen Cox I no se amplificó para *P. capsici*. En la amplificación del gen 60S para *P. capsici* se encontró similitud desde un 99 a 100% en diez aislados de *P. capsici* a diferencia de la amplificación de Cox II en donde se determinó que nueve aislados coinciden con *P. capsici* en porcentajes del 99 al 100% y uno en 100% con *Phytophthora tropicalis*. En la amplificación de los tres genes de los aislados de *P. drechsleri*, se encontró que solo cuatro de los seis identificados en un estudio previo como *P. drechsleri* tuvieron porcentajes de similitud del 99 al 100% en las bases de datos con esta especie y que los dos restantes coincidieron desde un 99 hasta el 100% con *Phytophthora* sp. “*kelmania*”. Por otra parte, se encontraron polimorfismos en las secuencias de nucleótidos de la mayoría los aislados de las dos especies investigadas, excepto en PV-34, PV-35, PV-36 y PV-46 obtenidos de *Capsicum annuum* (chile ornamental). En este trabajo se encontró que existe diversidad genética entre los aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* provenientes de plantas ornamentales de viveros en el estado de Michoacán, con el entendimiento de la biología y genética de estos patógenos es posible generar recomendaciones a los productores de ornamentales con la finalidad de apoyar en el desarrollo de los programas de manejo integrado de enfermedades en estos cultivos.

Palabras clave: ornamentales, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora drechsleri*, variabilidad, virulencia

**VARIABILITY OF ISOLATES OF *Phytophthora capsici* AND
Phytophthora drechsleri FROM ORNAMENTAL PLANTS**

GENERAL ABSTRACT

The production of ornamentals in our country is estimated in around six million pesos, the federal entities that lead the production are the State of Mexico, Puebla and Morelos, concentrating the 89% of the international ornamental value, the 11% remaining is located in seventeen entities in which the most prominent are Baja California, Distrito Federal and Michoacán. Like any other productive activity, during the process of production, transferring, storage and sell to the client, the potential risk of losses exists due to the presence of pests and diseases. Several scientists point out that for an appropriate control of these, it is necessary to know better the pest or the pathogen that is affecting the plant. In the state of Michoacan, Mexico oomycetes were isolated from ornamental nurseries among them are two species of the genus *Phytophthora*, from which few studies have been done, therefore, the objective of this work was to analyze the genetic variability of isolates of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* from ornamental plants, through phenotypic and molecular markers. With the phenotypic marker compatibility type a sterile isolate in *P. drechsleri* was detected. On the other hand, with the analysis of the marker of resistance to the fungicide mefenoxam, it was determined that 14 of the isolates of the two species (nine from *P. capsici* and five from *P. drechsleri*) are sensible and that only one of each species was intermediately resistant to the fungicide. Regarding the virulence of *P. capsici* it was found that the isolate of *Epipremnum aureum* (pothos) was not virulent in neither of the other two inoculated hosts and that it is an isolate that present characteristics in between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. The isolate of *Solanum ovigerum* (eggplant) and all of the isolates obtained from *Capsicum annuum* (ornamental pepper) were virulent on ornamental pepper and on the *Capsicum annuum* (serrano pepper var. Camino Real). On the isolates of *Phytophthora drechsleri* it was observed that the ones obtained from *Arcotis* sp. (african daysi), *Euphorbia pulcherrima* (poinsettia), *Gazania* sp. (gazania) and *Gerbera* sp. (gerbera) can be virulent in other species different from the ones they were isolated from. Regarding

the genetic variability through the polymerase chain reaction, the amplification of the genes Cox I and II and 60S ribosomal (Protein L10); with the sequences obtained Blast analysis was performed to get the percentages of similarity, using the databases Phytophthora Database and Barcode of Life Data Systems. The gen Cox I was not amplified for *P. capsici*. In the amplification of the gen 60S for *P. capsici* similarity from a 99% to a 100% was found with ten isolates of *P. capsici*, unlike the amplification with Cox II in which it was determined that nine isolates match with *P. capsici* in percentages from 99% to 100% and one in 100% with *P. tropicalis*. On the amplification of the three genes of the isolates of *P. drechsleri*, it was found that only four of the six identified on a previous study as *P. drechsleri* had percentages of similarity from 99% to 100% on the database with this specie and that the other two matched from 99% to the 100% with *Phytophthora* sp. “*kelfmania*”. On the other hand, polymorphisms were found on the nucleotide sequences of most of the isolates of the two researched species, except in PV-34, PV-35, PV-36 and PV-46 obtained from *Capsicum annuum* (ornamental pepper). In this study genetic diversity was found among the isolates of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* from ornamental plants nurseries in the state of Michoacan, with the understanding of the biology and genetics of these pathogens it may be possible to generate recommendations to the producers of ornamentals with the purpose of the development of integrated management programs of diseases in these crops.

Keywords: ornamentals, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora drechsleri*, variability, virulence.

INTRODUCCIÓN GENERAL

México dedica 16 mil hectáreas al cultivo de plantas de ornato, el 80% de la producción nacional se destina al consumo interno. Aun cuando la superficie se ha multiplicado desde 1990, no ha alcanzado el nivel adecuado para posicionarse como uno de los países con una producción relevante a nivel mundial (De la Madrid, 2009). En México los principales estados productores son: Baja California, Colima, Chiapas, Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Veracruz y Yucatán. A nivel nacional el cultivo de plantas de ornato se realiza en cielo abierto, viveros e invernaderos para producir plantas en maceta y bolsa para producción de flor y follaje de corte, árboles, arbustos, enredaderas, setos, cubre suelos y exóticas, entre otras (Chalate *et al.*, 2008).

El Estado de México genera el 84.5% del total de plantas y Michoacán el 1.8% (Villeda, 2006) además de comercializar plantas de otros estados. En nuestro país se tienen condiciones para desarrollar la horticultura ornamental, por la diversidad de climas, tratados de libre comercio y la cercanía con Canadá y Estados Unidos para exportación; sin embargo, la calidad es baja por factores como material vegetativo no adecuado, nivel tecnológico deficiente, desorganización en los eslabones de la cadena productiva, el pequeño volumen de producción, deficiente manejo nutrimental durante el desarrollo de las plantas, así como plagas y enfermedades (Chalate *et al.*, 2008).

Existen patógenos que causan enfermedades, como los oomicetes, dentro de los cuales el género *Phytophthora* provoca grandes pérdidas a nivel mundial, éste ocasiona principalmente pudrición de raíz y tallo, ahogamiento de plántulas, marchitamiento, tizón foliar y muerte regresiva. En todos sus hospedantes mata a las raíces pequeñas y con frecuencia aparecen lesiones pardas necróticas en raíces más grandes (Agrios, 2005).

En el estado de Michoacán, se colectaron plantas ornamentales en diferentes viveros y se aisló a *Phytophthora capsici* de *Capsicum annuum* (chile ornamental), *Cestrum nocturnum* (huele de noche), *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) y *Solanum ovigerum* (planta de huevo), así como a *P. drechsleri* de *Gerbera* sp. (gerbera), *Gazania rigens* y *G. sp.* (gazania), *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena), *Pentas lanceolata* (pentas), *Petunia x hybrida*

(petunia) y *Arctotis* sp. (margarita africana) en donde se observó que causan marchitez, pudrición de la corona, del tallo, de la raíz y muerte regresiva (Díaz-Celaya, 2011).

El realizar estudios de diversidad genética es importante porque al revelar la estructura de una población de fitopatógenos, éstos permiten implementar estrategias de control adecuadas (Valderrama *et al.*, 2000). Se han llevado a cabo estudios de variabilidad en aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas de ornato, en los que se ha analizado marcadores como tipo de compatibilidad y resistencia al fungicida mefenoxam (Olson y Benson, 2011; Olson *et al.*, 2013,). Sin embargo, para *P. capsici* la mayoría de los estudios se han enfocado a investigar poblaciones provenientes de cultivos agrícolas (Lamour y Hausbeck, 2001; Lamour y Hausbeck, 2003; Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Hausbeck y Lamour, 2004; Sylvar *et al.*, 2006; Keinath, 2007; Hu *et al.*, 2008; Hurtado-González *et al.*, 2008; Silva-Rojas *et al.*, 2009; Foster y Hausbeck, 2010; Li *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012).

Oomicetes que provocan enfermedades en ornamentales

Los oomicetes son organismos que poseen un micelio no septado. Producen zoosporas biflageladas en zoosporangios, esporas sexuales de resistencia denominadas oosporas producidas por la unión de dos gametangios llamados anteridio (masculino) y oogonio (femenino). Los oomicetes fitopatógenos más importantes pertenecen a los órdenes Saprolegniales y Peronosporales, de los primeros solo el género *Aphanomyces* causa pudrición de raíz en plantas anuales y del orden Peronosporales el género *Phytophthora* es agente causal de un gran número de enfermedades. La clasificación taxonómica del género *Phytophthora* es la siguiente: Reino Stramenipila, Phylum Oomycota, Clase Oomycetes, Orden Peronosporales, Familia Pythiaceae, Género *Phytophthora* (Agrios, 2005). El género *Phytophthora* fue identificado por primera vez por Anton De Bary en 1865 y significa “destructor de plantas” (Erwin y Ribeiro, 1996), desde entonces y hasta el 2014, se han descrito 117 especies, aunque algunas tienen nombres provisionales ya que aún no han sido reconocidas por el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICN por sus siglas en inglés) (Martin *et al.*, 2012). Las especies de este género tienen un amplio rango de hospedantes entre los que se encuentran las plantas ornamentales (Erwin y Ribeiro,

1996). Las condiciones ambientales y de manejo que se presentan en los viveros e invernaderos en donde se siembran, crecen o se comercializan estas plantas, favorecen el desarrollo de enfermedades ocasionadas por estos patógenos (Daughtrey y Benson, 2005, citados por Martin *et al.*, 2012).

La identificación de *P. ramorum* y su presencia en diversos países Europeos entre los que destacan Alemania, Eslovenia, España, Francia, Holanda, Irlanda Italia, Noruega, Polonia, y Reino Unido y así como en Estados Unidos y Canadá, ha creado una alerta mundial ya que es un patógeno que afecta ornamentales en viveros, jardines y hasta en grandes superficies de bosques (Alvaréz *et al.*, 2005). En Estados Unidos se obtuvieron de plantas ornamentales enfermas, aislados de patógenos entre los que se identificó a *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, y *P. palmivora* (Hwang y Benson, 2005), además de *P. ramorum*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. foliorum*, *P. gonapodyides*, *P. hibernalis*, *P. nemorosa*, *P. “Pgchlamydo”*, *P. syringae*, *P. pseudosyringae* y *P. tropicalis* (Yakabe *et al.*, 2009). La diversidad de las especies del género *Phytophthora* que afectan ornamentales en seis estados del sureste de Estados Unidos es alta sin embargo, las especies que tuvieron un mayor porcentaje de incidencia de las 19 identificadas en plantas enfermas fueron *P. nicotianae* (27% recuperado en los seis estados), *P. cinnamomi* (27% recuperado en cuatro) *P. ramorum* ((23% en un estado), *P. drechsleri* (3% en tres estados) (Olson *et al.*, 2013).

Phytophthora capsici y *P. drechsleri* son dos oomicetes que causan pudrición en raíz, corona de la raíz y tallo, tizones, marchitamiento y muerte en diferentes plantas ornamentales (Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2003; Cundom y Cabrera, 2004; Quesada-Ocampo *et al.*, 2009; Olson y Benson, 2011; Hoover, 2012; Rahman *et al.*, 2013; Olson y Benson, 2013), en México se aislaron estos dos patógenos en diferentes especies de plantas (Díaz-Celaya 2011).

Phytophthora capsici

P. capsici fue descrito por primera vez por Leonian en 1922, como el agente causal de la marchitez del chile en Nuevo México, EUA. Éste organismo se caracteriza por tener

esporangios subesféricos, ovoides, elipsoides, piriformes, papilados o semipapilados, con pedicelo largo y caducos, son generalmente heterotálicos con anteridio anfígino que al cruzarse con el oogonio forma oosporas, ocasionalmente puede presentar hinchamientos hifales (Erwin y Ribeiro, 1996). Diversos investigadores citados por Bowers; *et al.*, 2006 señalan que las clamidosporas son raras en aislados obtenidos de solanáceas y cucurbitáceas, pero comunes en aislados de pimienta, cacao y macadamia. Este patógeno penetra en la planta a través de la raíz o del tallo y provoca la obstrucción de los haces vasculares (Latin y Rane, 1999, citados por Li *et al.*, 2012), los síntomas que ocasiona son tizones foliares, muerte de plántulas, marchitamiento y pudrición de raíz, tallo y frutos (Hausbeck y Lamour, 2004). Se ha observado que presenta una producción masiva de esporas asexuales llamadas zoosporas. Con respecto a la reproducción sexual, las oosporas permanecen en forma invernante por años, este tipo de reproducción mantiene una alta variabilidad genética, dificultándose la producción de cultivos susceptibles en lugares infestados (Lamour *et al.*, 2012). Tiene un amplio rango de hospedantes e infecta principalmente especies de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae; sin embargo, también se ha detectado en plantas de la familia Fabaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, entre otras (Erwin y Ribeiro, 1996, Givens *et al.*, 2008). En plantas ornamentales, se ha realizado el aislamiento de este patógeno de diferentes especies (Cuadro 1).

Cuadro 1. Hospedantes de especies ornamentales en los que se ha reportado *Phytophthora capsici*.

Hospedantes	Familia	Referencia
<i>Abies fraseri</i> (abeto o árbol de navidad)	Pinaceae	Quesada-Ocampo <i>et al.</i> , 2009
<i>Anthurium andreaum</i> (anturio)	Araceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Browallia speciosa</i> (arbusto violeta)	Solanaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Solanaceae	Erwin y Ribeiro, 1996, Díaz-Celaya, 2011
<i>Cestrum nocturnum</i> (huele de noche)	Solanaceae	Díaz-Celaya, 2011
<i>Cosmos</i> sp. (cosmos)	Asteraceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Dianthus barbatus</i> (clavelina)	Caryophyllaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Enkianthus quinquefolius</i> (flor china de año nuevo)	Ericaceae	Erwin y Ribeiro, 1996

Continuación **Cuadro 1.** Hospedantes de especies ornamentales en los que se ha reportado *Phytophthora capsici*.

<i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono)	Araceae	Orlikowski <i>et al.</i> , 2006, Díaz-Celaya, 2011
<i>Philodendron scandens</i> (filodendro)	Araceae	Cundom y Cabrera, 2004
<i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo)	Solanaceae	Díaz, 2011

Phytophthora drechsleri

Este patógeno fue aislado por primera vez de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) en 1931 por Drechsler y descrita por Tucker en ese mismo año. Es un oomicete heterotálico que presenta los dos tipos de compatibilidad A1 y A2 (Erwin y Ribeiro, 1996) y que al ser compatibles producen para la fase sexual oosporas, la reproducción asexual se realiza por la fragmentación de hifas, por esporangios que pueden germinar directamente o que liberan zoosporas móviles en agua o por clamidosporas que se forman en algunos aislados (Lutz y Mengue, 1991, citados por Lamour *et al.*, 2003). Tiene un amplio espectro de hospedantes principalmente de raíz, pero algunos aislados infectan frutos maduros de melón y pepino (Erwin y Ribeiro, 1996). Se han reportado 110 hospedantes de 40 familias (Farr y Rosman, 2012, citados por Olson y Benson, 2013) y de éstas aproximadamente 25 son ornamentales (Olson y Benson, 2013). A diferencia de *Phytophthora capsici*, *P. drechsleri* es una especie que frecuentemente es patógeno de plantas ornamentales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Hospedantes de especies ornamentales en los que se ha reportado *Phytophthora drechsleri*.

Hospedante	Familia	Referencia
<i>Abies fraseri</i> (abeto o árbol de navidad)	Pinaceae	Hoover, 2012
<i>Antirrhinum majus</i> (perritos)	Plantaginaceae	Olson y Benson, 2013
<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	Asteraceae	Díaz-Celaya, 2011
<i>Azalea indica</i> (azalea)	Ericaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Callistemon citrinus</i> (escobetilla)	Myrtaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Celosia plumosa</i> (amaranto ornamental)	Amaranthaceae	Erwin y Ribeiro, 1996

Continuación **Cuadro 2.** Hospedantes de especies ornamentales en los que se ha reportado *Phytophthora drechsleri*.

<i>Coleus</i> sp. (coleo)	Lamiaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Cordyline australis</i> (racena)	Agavaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Crowea salignata</i> (crowea)	Rutaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Chamaelaucium uncinatus</i> (flor de cera)	Apocynaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> (crisantemo)	Asteraceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Dodonaea viscosa</i> (dodonea)	Sapindaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	Euphorbiaceae	Erwin y Ribeiro, 1996, Lamour <i>et al.</i> , 2003; Daughthrey, 2009, Díaz-Celaya, 2011
<i>Fuchsia x hybrida</i> (fuchsia)	Onagraceae	Olson y Benson, 2011, Olson y Benson, 2013
<i>Gazania rigens</i> (gazania)	Asteraceae	Díaz-Celaya, 2011
<i>Gerbera jamesonii</i> (gerbera “daisy”)	Asteraceae	Erwin y Ribeiro, 1996, Díaz-Celaya, 2011, Olson y Benson, 2011, Olson y Benson, 2013
<i>Grevillea bitermata</i> (flor araña)	Proteaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Hebe speciosa</i> (verónica)	Scrophulariaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Hedera helix</i> (hiedra común)	Araliaceae	Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>Helianthus annuus</i> (girasol)	Asteraceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Melaleuca armillaris</i> (brazalete)	Myrtaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Matthiola incana</i> (alhelí)	Brassicaceae	Olson y Benson, 2013
<i>Osteospermum</i> sp. (osteospermum)	Asteraceae	Olson y Benson, 2013
<i>Pelargonium zonale</i> (geranio)	Geraniaceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Pentas lanceolata</i> (pentas)	Rubiaceae	Díaz-Celaya, 2011
<i>Petunia x hybrida</i> (petunia)	Solanaceae	Díaz-Celaya, 2011
<i>Polygala myrtifolia</i> (poligala)	Polygalaceae	Moralejo <i>et al.</i> , 2009
<i>Senecio cineraria</i> (cineraria gris)	Asteraceae	Olson y Benson, 2013
<i>Senecio cruentus</i> (cineraria)	Asteraceae	Erwin y Ribeiro, 1996
<i>Verbena x hybrida</i> (verbena)	Verbenaceae	Olson y Benson, 2013
<i>Viburnum tinus</i> (laurel salvaje)	Asteraceae	Erwin y Ribeiro, 1996

HIPÓTESIS

Existe variabilidad entre los aislados de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas de ornato, ya que provienen de diferentes hospedantes y de diversas regiones del país.

I. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la variabilidad de aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* provenientes de plantas ornamentales.

Objetivos específicos

- 1) Determinar el tipo de compatibilidad para del aislado de *Phytophthora drechsleri* proveniente de gazania.
- 2) Evaluar la resistencia de los aislados a mefenoxam *in vitro*.
- 3) Evaluar la agresividad de los aislados en plantas ornamentales de importancia en el estado de Michoacán.
- 4) Estimar el rango de hospedantes de los aislados en plantas ornamentales de importancia en el estado de Michoacán.
- 5) Detectar si existe polimorfismo en los aislados usando genes nucleares y mitocondriales.

CAPÍTULO 1. VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE *Phytophthora capsici* Y *Phytophthora drechsleri* PROVENIENTES DE PLANTAS ORNAMENTALES CON EL USO DE MARCADORES FENOTÍPICOS

RESUMEN

El conocimiento de la variabilidad dentro una población es importante, ya que los organismos pueden adaptarse constantemente a los cambios del medio ambiente que los rodea y de las actividades del hombre. Dentro de las poblaciones pueden ocurrir cambios en su genoma por la reproducción sexual, la deriva genética y las mutaciones, además existe presión de selección en las poblaciones cuando se realiza la aplicación de fungicidas, la rotación de cultivos, el movimiento de material vegetativo, uso de variedades resistentes, etc. En el presente estudio se utilizaron diversos marcadores que determinan la variabilidad en una población entre los cuales estuvieron la virulencia, tipo de compatibilidad y resistencia a mefenoxam. El aislado de *P. drechsleri* PV-29 obtenido de *Gazania rigens* (gazania) se determinó como estéril ya que no formó oosporas en las cruzas. Por otra parte, al realizar el análisis del marcador resistencia al fungicida mefenoxam, se determinó que 14 de los aislados de las dos especies (nueve de *P. capsici* y cinco de *P. drechsleri*) son sensibles a éste y sólo uno de cada especie presentó resistencia intermedia al fungicida. En las dos especies estudiadas, se presentaron diferencias en virulencia dependiendo del hospedante de donde se aisló y en el cual se inoculó, también en agresividad los aislados fueron distintos ya que al inocularlos, los síntomas de marchitamiento, necrosis o muerte de la planta variaron en días post-inoculación (dpi), en que se observaron. En cuanto a la virulencia para *P. capsici* se encontró que el aislado de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) no fue virulento en ninguno de los otros dos hospedantes inoculados y que es un aislado que presenta características entre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora tropicalis*. El aislado de *Solanum ovigerum* (planta de huevo) y todos los aislados obtenidos de *Capsicum annuum* (chile ornamental) fueron virulentos en chile ornamental y en *Capsicum annuum* (chile serrano var. Camino Real). En los aislados de *Phytophthora drechsleri* se observó que los obtenidos de *Arctotis* sp. (margarita africana), *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena), *Gazania* sp. (gazania) y *Gerbera* sp. (gerbera) pueden ser virulentos en otras especies diferentes de las que fueron aislados.

CHAPTER 1. GENETIC VARIABILITY IN ISOLATES OF *Phytophthora capsici* AND *Phytophthora drechsleri* FROM ORNAMENTAL PLANTS WITH THE USE OF PHENOTYPIC MARKERS

ABSTRACT

The knowledge of variability among a population is important, since the organisms can adapt constantly to environmental changes that surround them and to the human activities. Among the population changes in their genome, these may occur through sexual reproduction, genetic drift and mutations, also selection pressure exists in the populations with fungicide application, crop rotation, movement of vegetative material, use of resistant varieties, etc. In the present study various markers that determine the variability in a population were used, among them were virulence, compatibility type and resistance to mefenoxam. The isolate *P. drechsleri* PV-29 obtained from *Gazania rigens* (gazania) was determined as sterile since it did not form oospores in the crosses. On the other hand, with the analysis of the marker of resistance to the fungicide mefenoxam, it was determined that 14 of the isolates of the two species (nine from *P. capsici* and five from *P. drechsleri*) are sensible and that only one of each species was intermediately resistant to the fungicide. In the two species studied, differences in virulence were observed depending on the host from which they were isolated from and the one they were inoculated on, also the aggressiveness of the isolates was different, because the time when the symptoms of wilt, necrosis and death of the plant were observed varied in days post inoculation (dpi). Regarding the virulence of *P. capsici* it was found that the isolate of *Epipremnum aureum* (pothos) was not virulent in neither of the other two inoculated hosts and that it is an isolate that present characteristics in between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. The isolate of *Solanum ovigerum* (eggplant) and all of the isolates obtained from *Capsicum annuum* (ornamental pepper) were virulent on ornamental pepper and on the *Capsicum annuum* (serrano pepper var. Camino Real). On the isolates of *Phytophthora drechsleri* it was observed that the ones obtained from *Arcotis* sp. (african daysi), *Euphorbia pulcherrima* (poinsettia), *Gazania* sp. (gazania) and *Gerbera* sp. (gerbera) can be virulent in other species different from the ones they were isolated from.

1.1 INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos adaptan la información contenida en su genoma de acuerdo con las necesidades de sobrevivir en su entorno. El resultado de la interacción adaptativa se traduce en la acumulación de la información genética que a manera de variantes cada especie va guardando entre los miembros de su población y que se va transmitiendo en las subsiguientes generaciones a través del tiempo y aunque la población de individuos en una especie comparte características comunes y se pueden cruzar entre ellos, existen variantes individuales que se pueden manifestar en el fenotipo o dentro de su genoma. La suma de todos los individuos con sus respectivas variantes es lo que se conoce como variabilidad genética de una especie, la cual permite a ésta adaptarse a los cambios que se presentan en su entorno (Franco e Hidalgo, 2003).

Dentro de los marcadores que se utilizan para determinar variabilidad genética, se considera a la virulencia como el principal marcador fenotípico para el estudio de poblaciones. Este marcador consiste en determinar el espectro de virulencia de algún patógeno en un grupo de variedades de plantas diferenciales y que generalmente es utilizado para la búsqueda de plantas resistentes o susceptibles al ataque de dicho patógeno; sin embargo, el loci que determina este patrón es una pequeña parte del total de la variación genética que se presenta entre aislados y pueden estar sometidas a una fuerte presión de selección por el hospedante (Leung *et al.*, 1993, citados por Macías *et al.*, 2006; Silvar *et al.*, 2006). La virulencia y patogenicidad de la progenie de *Phytophthora capsici* al haber recombinación sexual en el laboratorio, fue diferente a la de los padres al inocular en tomate y pepino, lo anterior fue corroborado en observaciones en campo en donde se encontró que las características morfológicas de *P. capsici* varían ampliamente en las poblaciones naturales y en donde la patogenicidad es diferente entre cultivos de solanáceas y cucurbitáceas (Ristaino, 1990). Las pruebas de virulencia han sido utilizadas para estudios de diferenciación genética, sin embargo su desventaja es que consumen tiempo y las variables pueden ser influenciadas por las condiciones del medio ambiente y las técnicas de inoculación del patógeno (Silvar *et al.*, 2006). Cuando se hicieron estudios sobre la virulencia de varias especies de *Phytophthora*

utilizando diferentes sustratos, método de inoculación, hospedantes y partes de la planta, se observaron diferencias en virulencia entre los aislados (Hong *et al.*, 2008; Foster y Hausbeck, 2010). En Estados Unidos al caracterizar 49 aislados de *P. capsici*, considerando la agresividad como fuente de variabilidad en seis genotipos de Chile, se observaron diez patotipos y no se observó correlación entre ésta y el hospedante de origen o la región geográfica (Yin *et al.*, 2012).

Otro de los marcadores para detectar variabilidad es la compatibilidad sexual que es usada para delinear especies biológicas (también conocidas como poblaciones de apareamiento compatibles) las cuales son indistinguibles a simple vista y puede ser determinada por el apareamiento de individuos heterotálicos en un medio artificial o natural y observando las pruebas de fertilidad sexual entre ellos, por ejemplo la producción de oosporas, basidiosporas, ascosporas, etc. (González-Chavira y Simpson, 2008). Se ha observado que cuando un organismo tiene reproducción sexual, se genera variabilidad, lo que proporcionará al patógeno mayores posibilidades de adaptarse a los cambios que se generen alrededor de él (Ristaino, 1990; McDonald y Linde, 2002). Se ha señalado que aproximadamente el 60% de las especies del género *Phytophthora* son homotálicas, el resto en donde se incluyen *P. capsici* y *P. drechsleri* son heterotálicas y requieren de dos tipos de compatibilidad A1 y A2 para completar el estado sexual y formar oosporas, el cual es la forma más eficiente para desarrollar diversidad genética (Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour y Hausbeck, 2001). Las investigaciones que se han generado con respecto a la variabilidad genética atendiendo el parámetro de tipo de compatibilidad reportan que aislados de *P. capsici* con el tipo de compatibilidad A1 fueron más virulentos que los aislados con el tipo A2 (Cristinzio y Noviello, 1980, citados por Fernández-Pavía, *et al.*, 2004). En México se han reportado los grupos A1 y A2 de *P. capsici* en Chile, lo que sugiere que en la región centro existe apareamiento y en consecuencia variabilidad genética (Pérez-Moreno *et al.*, 2003). Por otra parte, al realizar el análisis de tipo de compatibilidad de aislados de *Phytophthora* spp. obtenidos de plantas ornamentales en Estados Unidos, se observó que al presentarse el mismo tipo de compatibilidad en diferentes aislados de la misma especie, se concluyó que no existía variabilidad y que las epidemias provenían de la misma fuente de inóculo (Hwang y Benson, 2005) (Cuadro 3).

Para determinar la diversidad de poblaciones, también se analiza la resistencia a fungicidas, en donde las fenilamidas son uno de los 5 grupos de fungicidas que son utilizados para el control de oomicetes, dentro de éstos el mefenoxam y el metalaxil son de los productos más usados (Jaramillo, 2003). La especificidad en el sitio de acción permitió que se presentara resistencia en *P. infestans* en Europa a los dos años de su introducción y desde entonces se ha reportado para otras especies de *Phytophthora*, también se ha señalado que la resistencia a fungicidas es el resultado de mutaciones estables y heredables (Gisi y Gohen, 1996; Moornan y Kim, 2004; Hwang y Benson, 2005, Pérez y Forbes, 2008). El nivel de resistencia puede medirse en el laboratorio exponiendo una población obtenida en el campo, al fungicida en cuestión, midiendo su respuesta a diferentes dosis del compuesto. Las respuestas a la toxicidad se miden generalmente por la inhibición del crecimiento del hongo, de la germinación de esporas y de la infección a la planta (Pérez y Forbes, 2008). En 95 aislados de *Phytophthora* spp. obtenidos de plantas ornamentales, al probar 100 µg/mL de mefenoxan, se encontró que 25 fueron altamente resistentes, 4 medianamente resistentes y 66 sensibles (Hu *et al.*, 2008). Por otra parte, Olson y Benson (2011) reportaron que todos los aislados encontrados de *P. drechsleri* en gerbera daisy y fuchsia fueron resistentes a la aplicación de mefenoxam a dosis de 1 y 100 µg/mL. Sin embargo, recientemente Olson *et al.* (2013) al analizar diferentes especies del género *Phytophthora* que afectan ornamentales en Estados Unidos, encontraron que el porcentaje de aislados insensibles a mefenoxam es reducido, por lo que aún se puede considerar el uso de este fungicida para el manejo integrado de este patógeno. En Estados Unidos se ha reportado la presencia de aislados de *P. capsici* resistentes (Lamour y Hausbeck, 2000). Por otra parte, otro estudio señala que de 120 aislados de *P. capsici* de calabaza y chile, al determinar la sensibilidad a mefenoxam (100mg/l), se encontró que 8 fueron tolerantes con crecimiento del oomicete mayor al 90%, 60 sensibles con crecimiento menor al 30% y 50 medianamente sensibles, estos últimos fueron aislados en sitios donde no se había aplicado mefenoxam (Keinath, 2007) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tipo de compatibilidad y resistencia a mefenoxam de aislados de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Hospedante	Especie/Tipo de compatibilidad	Resistencia a mefenoxam		Fuente
		1 µg i.a./ml	100 µg i.a./ml	
No reportado	<i>P. capsici</i>		Sensibilidad	Olson <i>et al.</i> , 2013
			Intermedia	
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	<i>P. drechsleri</i> /A1		Sensible	Lamour <i>et al.</i> 2003
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	<i>P. drechsleri</i> /A1		Resistencia Intermedia	
<i>Gerbera daisy</i> (gerbera)	<i>P. drechsleri</i> /A1	Resistente	Resistente	Olson y Benson, 2011
<i>Fuchsia</i> (fuchsia)	<i>P. drechsleri</i> /A1	Resistente	Resistente	
<i>Gerbera daisy</i> (gerbera)	<i>P. drechsleri</i> /A1	Resistente	Resistente	Olson <i>et al.</i> , 2011
<i>Fuchsia</i> (fuchsia)	<i>P. drechsleri</i> /A1			
<i>Senecio cineraria</i> (senecio)	<i>P. drechsleri</i> /A1			
<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	<i>P. drechsleri</i> /A2			Díaz-Celaya, 2011
<i>Gazania rigens</i> (gazania)	<i>P. drechsleri</i> /ND*			
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	<i>P. drechsleri</i> /A2			
<i>Pentas lanceolata</i> (pentas)	<i>P. drechsleri</i> /A2			
<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	<i>P. drechsleri</i> /A1			
<i>Gazania</i> sp. (gazania)	<i>P. drechsleri</i> /A1			
<i>Petunia x hybrida</i> (petunia)	<i>P. drechsleri</i> /A1			
<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	<i>P. drechsleri</i> /A2			
<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	<i>P. capsici</i> /A1			
<i>Cestrum nocturnum</i> (huele de noche)	<i>P. capsici</i> /H**			
<i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono)	<i>P. capsici</i> /A2			
<i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo)	<i>P. capsici</i> /A1			

*No determinado, **Homotálico

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 aislados obtenidos de plantas ornamentales de la colección del Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH, Morelia, Michoacán, de los cuales diez corresponden a *Phytophthora capsici* y seis a *P. drechsleri* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Aislados de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado	Especie	Localidad de colecta
<i>Phytophthora capsici</i>		
PV-15	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Morelia, Mich.
PV-30	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Tarímbaro, Mich.
PV-31	<i>Cestrum nocturnum</i> (Huele de noche)	Tarímbaro, Mich.
PV-33	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Edo. de Morelos
PV-34	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Tarímbaro, Mich.
PV-35	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Tarímbaro, Mich.
PV-36	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Tarímbaro, Mich.
PV-41	<i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono)	Tarímbaro, Mich.
PV-44	<i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo)	Morelia, Mich.
PV-46	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	Morelia, Mich.
<i>Phytophthora drechsleri</i>		
PV-27	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	Morelia, Mich.
PV-29	<i>Gazania rigens</i> (gazania)	Morelia, Mich.
PV-37	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	Uruapan, Mich.
PV-39	<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	Uruapan, Mich.
PV-40	<i>Gazania</i> sp. (gazania)	Uruapan, Mich.
PV-47	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	Edo. de Morelos

En condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar se reactivaron los aislados de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Se abrió el microtubo en la campana de flujo laminar y se tomaron con las pinzas dos cubos de agar conteniendo micelio.
- b) El cubo de agar se colocó en una caja Petri vacía para eliminar la mayor cantidad de líquido que fuera posible, éstos se transfirieron a medio de cultivo Agar Harina de Maíz (AHM, Anexo 1) para su crecimiento y se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad.
- c) Cuando los aislados crecieron, se realizó la prueba de Luria Bertoni (LB, Anexo II), para verificar que estuvieran libres de bacterias. Todos los aislados se mantuvieron en medio de cultivo AHM para posteriores experimentos.

1.2.1 Tipo de compatibilidad del aislado PV-29

En un estudio realizado anteriormente por Díaz-Celaya, 2011 se determinó el tipo de compatibilidad de los aislados. Sin embargo, debido a que no había sido posible determinar el tipo de compatibilidad del aislado PV-29 se repitió esta prueba con diferentes aislados de tipo de compatibilidad conocida.

- a) Se utilizaron como referencia para realizar las cruas los aislados heterotáticos de *P. drechsleri* PV-27 (A2), PV-37 (A2), PV-39 (A1), PV-40 (A1) y PV-47 (A2).
- b) Se preparó medio Agar-V8 (AV8, Anexo 1) y se vació en cajas Petri de 100 x 15mm, se colocó un disco de micelio del aislamiento con tipo de compatibilidad A1 ya conocido y al lado de éste a una distancia de aproximadamente 2 cm, se colocó el disco de micelio del aislado PV-29, se realizó el mismo procedimiento con el tipo de compatibilidad A2.
- c) Se incubaron a 25°C y se revisaron cada tercer día bajo el microscopio óptico para verificar si se observaban oosporas.

1.2.2 Resistencia a mefenoxam

- a) Se cortó un cubo de agar con micelio de cada aislado y se colocó en medio AHM, éstos se incubaron a temperatura ambiente por 3 días. Se preparó medio de cultivo AV8 adicionado con 100 ppm de mefenoxam (Ridomil Gold 4E de Syngenta y no menos de 46.2% i. a. en peso) y medio sin fungicida. Se vació en cajas Petri, utilizando tres repeticiones para cada aislado.
- b) De los aislados con 3 días de crecimiento se tomó con un sacabocados un círculo de 8 mm que se colocó en el centro de cada caja Petri con medio AV8 con y sin fungicida. Las cajas se distribuyeron al azar y se incubaron a 25°C durante tres días. Posteriormente se midió el diámetro de la colonia en dos direcciones, a este dato se le restaron los 8 mm del círculo de AHM colocado en el centro y se promediaron los datos de las tres cajas Petri con y sin fungicida para cada aislado.
- c) Para obtener el porcentaje de crecimiento, se dividió el resultado promediado con 100 ppm entre el resultado del testigo.
- d) Para definir la resistencia de los aislados al mefenoxam se utilizó el rango propuesto por Lamour *et al.* (2003) con respecto al porcentaje de crecimiento: Sensible a mefenoxam (S) < 30%, Resistencia Intermedia (RI) > 30% y < 90% y Resistente a mefenoxam (R) > 90%.

1.2.3 Virulencia de los aislados y rango de hospedantes

1.2.3.1 Aislados de *Phytophthora capsici*

Se inocularon los aislados de *P. capsici* PV-15, PV-30, PV-33-PV-36, PV-41, PV-44 y PV-46 en chile ornamental, planta de teléfono y chile serrano variedad Camino Real para determinar si en este chile comestible eran virulentos y si existía diferencia en la agresividad de éstos. En planta de teléfono también se inoculó el aislado PV-31 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Especies vegetales utilizadas para determinar virulencia, agresividad y rango de hospedantes de aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de plantas ornamentales.

Especie	Edad de la planta	Zoosporas	Sustrato
Chile ornamental (<i>C. annuum</i>)	35 días	10,000/mL	SCE*
Chile serrano (<i>C. annuum</i>)	40 días	10,000/mL	SCE*
Var. Camino real	35 días	10,000/mL	
Teléfono (<i>E. aureum</i>)	45 días	1,000/mL	Agua destilada estéril
	90 días	10,000/mL	

*SCE=Suelo comercial estéril Miracle Gro®

a) Inoculación de plantas de chile ornamental y chile serrano var. Camino Real

- Se sembraron las plántulas en charolas para germinación de seis compartimientos.
- Se agregó agua al sustrato hasta saturarlo y posteriormente se agregó 1 mL de la suspensión de 10,000 zoosporas de cada aislado, al testigo se le aplicó solamente 1 mL de agua. Las plantas se mantuvieron en contenedores con agua para que permanecieran húmedas.
- En chile serrano fueron seis repeticiones y en chile ornamental 12, con sus respectivos testigos, se distribuyeron al azar. La inoculación de chile serrano fue durante el mes de noviembre y de chile ornamental fue en el mes de abril, meses en que la temperatura promedio fueron de 31 y 32.8 °C, respectivamente.
- Se realizó el registro de los síntomas y del progreso de los mismos cada tercer día.

b) Inoculación de plantas de teléfono

- Se utilizaron plantas de teléfono de dos años de edad a las que se realizaron cortes de la guía de aproximadamente 10 cm cada una con 2-3 hojas, éstas se colocaron en frascos con agua.

- Cuando en las plantas se observaron raíces, se lavaron con agua y jabón y se colocaron en frascos esterilizados con 40 mL de agua destilada estéril. Se utilizaron tres plantas por cada aislado y tres para el testigo.
- En el experimento 1 se inoculó cada planta con 1,000 zoosporas/mL de cada aislado, en el experimento 2 se inocularon 10,000 zoosporas/mL, al testigo se le agregó 1 mL de agua. Las plantas se distribuyeron al azar en charolas. La temperatura durante los experimentos fue de 25 ± 2 °C. Se registraron los síntomas cada tercer día.

1.2.3.2 Aislados de *Phytophthora drechsleri*

Los aislados de *P. drechsleri* PV-27, PV-29, PV-37, PV-40, PV-47 y PV-49 se inocularon en el suelo cerca de la base del tallo en gazania, petunia y nochebuena variedades Valenciana y Freedom Red y en las ramas de estas dos variedades de nochebuena (Cuadro 6).

Cuadro 6. Especies vegetales utilizadas para determinar virulencia, agresividad y rango de hospedantes de aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Especie	Edad de la planta	Zoosporas	Sustrato
<i>Gazania</i> sp. (gazania)*	3 meses	6,000/mL	SCE**
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena var. Valenciana)	1 año	No aplica	Suelo del proveedor
	1 año	6,000/mL	de la planta
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena var. Freedom Red)	2 meses	6,000/mL	SCE
	2 meses	No aplica	
<i>Petunia</i> sp. (petunia)*	3 meses	6,000/mL	SCE

*Plantas aportadas por la Dra. Martha Elena Pedraza Santos. **SCE=Suelo comercial estéril Miracle Gro®

a) Inoculación de plantas de gazania

- Se trasplantaron doce plantas de esta especie en charolas para germinación con suelo estéril. Éstas se colocaron en contenedores que se mantuvieron continuamente con agua y se inocularon con 1 mL de la suspensión de zoosporas, al testigo se le adicionó 1mL de agua.
- Se regaron las plantas hasta saturación y se distribuyeron al azar.
- Se realizó el registro de síntomas cada tercer día.

b) Inoculación de plantas de nochebuena

Variedad Valenciana y Freedom Red

- ✓ Experimento 1 (Inoculación en ramas con medio de cultivo con micelio)
 - Se utilizaron cinco plantas de la variedad Valenciana y tres de Freedom Red para inocular con cada aislado así como sus respectivos testigos, se colocaron en contenedores de plástico para mantener el suelo con agua constantemente.
 - Se raspó con una aguja de disección en el tallo de la planta en donde se observó el tejido menos leñoso y se colocó un cuadro de medio de cultivo AV8 de 15 días de edad con micelio de cada aislado y éste se envolvió con parafilm. Al testigo únicamente se le colocó un cuadro sin micelio, envuelto con el parafilm.
 - Se agregó agua al suelo de las plantas y a las charolas, por último se colocaron bolsas de plástico sobre cada planta para proporcionar condiciones de alta humedad.
 - A las 24 hr se levantaron las bolsas de plástico solo en la base de la planta y a las 48 hr después de la inoculación, se retiró la bolsa de plástico.
 - Se registró la aparición de síntomas y el progreso de los mismos cada tercer día.
- ✓ Experimento 2 (Suspensión de 6,000 zoosporas/mL de agua en el sustrato)
 - Este experimento se realizó con la variedad Freedom Red.

- Se retiraron las plantas de la maceta en las que el proveedor las envió y se sembraron en suelo estéril, cada maceta se colocó en una bolsa de plástico para mantener siempre la humedad del sustrato. Se usaron doce plantas por cada aislado y doce para el testigo. Las plantas se distribuyeron al azar.
- Se regaron las plantas hasta saturación y posteriormente se inocularon con 1 mL de una suspensión de 6,000 zoosporas/mL, al testigo únicamente se le agregó 1 mL de agua.
- El registro de los síntomas se realizó cada tercer día

c) Inoculación de plantas de petunia

- Se trasplantaron 8 plantas de esta especie en charolas para germinación y se colocaron en charolas de plástico, por lo que quedaron 8 plantas/charola inoculadas con cada aislado y 8 para el testigo. Las charolas se distribuyeron al azar.
- Se regaron las plantas hasta saturación y se inoculó una suspensión de 6,000 zoosporas /mL de agua de cada aislado en cada planta, al testigo se le agregó 1mL de agua.
- Se agregó agua a las charolas constantemente para mantener la humedad de las plantas.
- Se realizó el registro de datos cada tercer día.

Reaislamiento del patógeno.

Las plantas que presentaron síntomas de marchitez, necrosis o pudrición de tallo y/o corona de la raíz, se usaron para realizar el aislamiento de tejido vegetal (Anexo III) en medio de cultivo selectivo con agar harina de maíz (NARPH, Anexo I). Cuando se observó el crecimiento característico de *Phytophthora*, se transfirió un cubo de micelio de aproximadamente 1 cm³ en agar harina de maíz para inducir la formación de esporangios.

1.2.4 Análisis de datos

Para registrar los datos y hacer comparación entre los aislados, se elaboró una tabla de Índice de Severidad de Síntomas (ISS), de la siguiente manera:

- 1: Plantas sanas.
- 2: Plantas ligeramente marchitas (algunas hojas y/o brácteas sin turgencia).
- 3: Marchitas (Todas las hojas y/o brácteas sin turgencia y/o necrosis en tallos).
- 4: Plantas muertas.

Para el análisis de los datos, se empleó la prueba no paramétrica de análisis de varianza por rangos usando la mediana según Kruskal-Wallis con Statgraphics. Adicionalmente, se realizó un análisis post ANOVA comparando los tratamientos con la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$) utilizando el software Statistix y se calculó el porcentaje de plantas muertas.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Reactivación de aislados

Se realizó la reactivación de 16 aislados de *Phytophthora* spp. obtenidos de plantas ornamentales, diez de *P. capsici* y seis de *P. drechsleri* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Aislados reactivados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* provenientes de plantas ornamentales.

<i>Phytophthora capsici</i>		
Aislado	Hospedante de origen	Reactivación
PV-15	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
PV-30	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
PV-31*	<i>Cestrum nocturnum</i> (huele de noche)	+
PV-33	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
PV-34	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
PV-35	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
PV-36	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
PV-41	<i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono)	+
PV-44	<i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo)	+
PV-46	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	+
<i>Phytophthora drechsleri</i>		
PV-27	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	+
PV-29	<i>Gazania rigens</i> (gazania)	+
PV-37	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	+
PV-39	<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	+
PV-40	<i>Gazania</i> sp. (gazania)	+
PV-47	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	+

* Este aislado creció hasta después de 1 mes

1.3.2 Tipo de compatibilidad

El tipo de compatibilidad del aislado PV-29 no se pudo determinar ya que al realizar las cruza con los aislados de *P. drechsleri* PV-27, PV-37, PV-39, PV-40 y PV-47 no se observaron oosporas, por lo que se consideró como estéril.

1.3.3 Resistencia a mefenoxam

Catorce aislados fueron sensibles (S) a la dosis de 100 ppm de mefenoxam. Los aislados que presentaron porcentajes de crecimiento >30% con respecto al control, fueron el aislado PV-15 obtenido de *Capsicum annuum* (chile ornamental) y el aislado PV-37 obtenido de *E. pulcherrima* (nochebuena), estos se determinaron con resistencia intermedia (RI) porque presentaron un crecimiento de 31.0% con respecto al control (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resistencia a mefenoxam de aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Localidad	Hospedante	Código del aislado	Crecimiento respecto al control (%)	Resistencia a mefenoxam*
<i>P. capsici</i>				
Morelia, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-15	31	RI
Tarímbaro, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-30	7	S
Morelia, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-31	22	S
Morelos	<i>Capsicum annuum</i>	PV-33	8	S
Tarímbaro, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-34	8	S
Tarímbaro, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-35	6	S
Tarímbaro, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-36	12	S
Tarímbaro, Mich	<i>Epipremnum aureum</i>	PV-41	0	S
Morelia, Mich	<i>Solanum ovigerum</i>	PV-44	13	S
Morelia, Mich	<i>Capsicum annuum</i>	PV-46	5	S

Continuación **Cuadro 8.** Resistencia a mefenoxam de aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

<i>P. drechsleri</i>				
Morelia, Mich	<i>Gerbera</i> sp.	PV-27	18	S
Morelia, Mich	<i>Gazania rigens</i>	PV-29	3	S
Uruapan, Mich	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	PV-37	31	RI
Uruapan, Mich	<i>Arctotis</i> sp.	PV-39	2	S
Uruapan, Mich	<i>Gazania</i> sp.	PV-40	12	S
Morelos	<i>Gerbera</i> sp.	PV-47	7	S

*Sensible a mefenoxam (S) crecimiento <30%, Resistencia Intermedia (RI) crecimiento >30% pero <90%, Resistente a mefenoxam (R) crecimiento >90%. La dosis aplicada de mefenoxam fue de 100ppm.

1.3.4 Virulencia y rango de hospedantes

1.3.4.1 Inoculación de aislados de *Phytophthora capsici*

Los aislados de esta especie que fueron obtenidos de diferentes plantas (chile ornamental, huelle de noche, planta de huevo y planta de teléfono) presentaron diferencias tanto en la virulencia como en el rango de hospedantes cuando se inocularon en *Capsicum annuum* (chile ornamental), *Capsicum annuum* (chile serrano var. Camino Real) y *Epipremnum aureum* (planta de teléfono).

a) Chile serrano var. Camino Real

Los primeros síntomas que se presentaron en esta especie con los aislados que se determinaron como virulentos, fue pérdida de turgencia en las hojas y amarillamiento, posteriormente la planta se marchitó completamente y se presentó necrosis en la base del tallo, la cual fue ascendiendo hasta provocar la muerte en la planta. Los aislados PV-35, PV-36 y PV-46 obtenidos de chile ornamental causaron los primeros síntomas al quinto día post-inoculación (dpi), PV-30, PV-33 y PV-34 a los 10 dpi y PV-15 a los 13 dpi, la totalidad de

las plantas murieron. Los aislados PV-41 de teléfono y PV-44 planta de huevo no fueron virulentos en esta especie (Fig. 1 y 2).

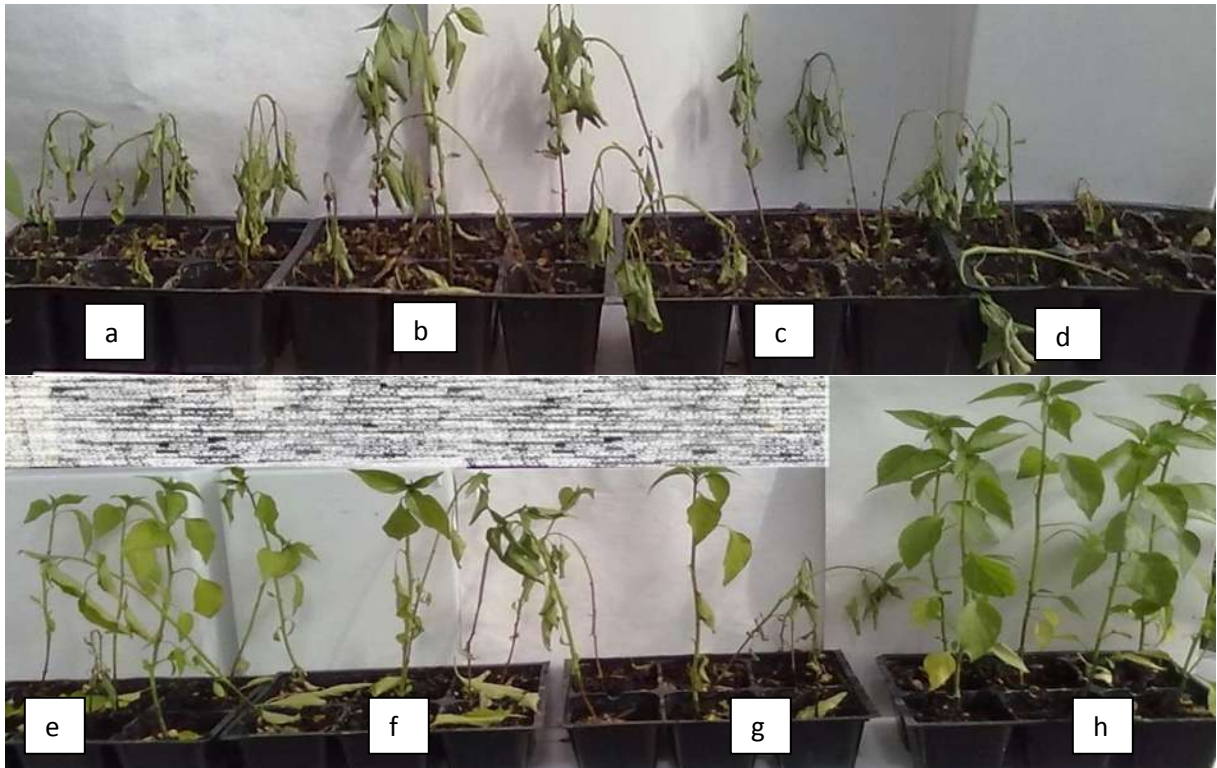


Figura 1. Plantas de *Capsicum annuum* (chile serrano var. Camino Real) a los 14 días post-inoculación con aislados de *Phytophthora capsici* provenientes de *Capsicum annuum* (chile ornamental): a) PV-30, b) PV-35, c) PV-36, d) PV-46, e) PV-15, f) PV-30, g) PV-33 y d) Testigo.



Figura 2. Plantas de *Capsicum annuum* (chile serrano var. Camino Real) sanas a los 14 días post-inoculación con aislados de *Phytophthora capsici* provenientes de: a) PV-41 de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono), b) PV-44 *Solanum ovigerum* (planta de huevo) y c) Testigo.

Con respecto al índice de severidad, al finalizar el registro de datos, se determinó que no existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los aislados de *C. annuum* (chile ornamental) con respecto a los dpi pero sí con respecto al testigo (Fig. 3).

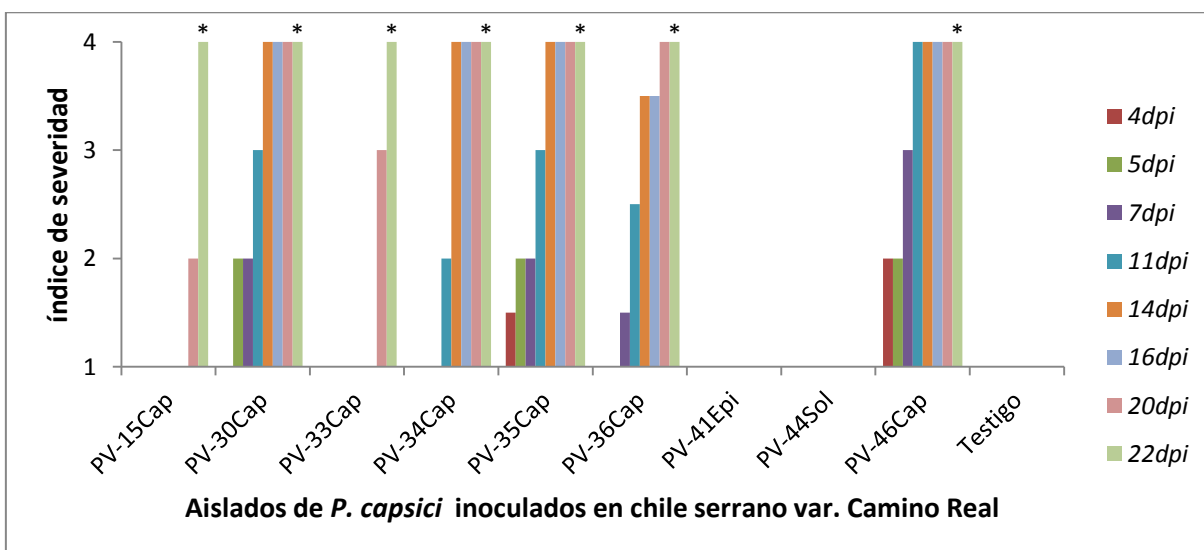


Figura 3. Índice de severidad en plantas de *Capsicum annuum* (chile serrano var. Camino Real) en diferentes días post-inoculación (dpi) con aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de plantas ornamentales: *Capsicum annuum* (Cap), *Cestrum nocturnum* (Ces), *Epipremnum aureum* (Epi) y *Solanum ovigerum* (Sol). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo.

b) Chile ornamental

En las plantas de esta especie que se inocularon con los aislados obtenidos de chile ornamental, se observaron diferencias en la severidad y virulencia, ya que se presentaron síntomas a los cinco dpi con los aislados PV-35, PV-36 y PV-46 y a los siete dpi con PV-15, PV-30, PV-33 y PV-34, la mortalidad fue de 33 y 58% para PV-34 y PV-33 respectivamente, 92% con PV-15, PV-30 y PV-35 y hasta el 100% con PV-36 y PV-46. Con el aislado PV-44 de planta de huevo, los síntomas se presentaron a los cinco dpi y solo el 8% de las plantas de chile ornamental murieron, el aislado PV-41 no causó síntomas en esta especie. Al principio se observó marchitez en las hojas y paulatinamente en toda la planta, posteriormente los tejidos del tallo presentaron necrosis y por último la muerte, después de 26 dpi ya no se observaron cambios en la sintomatología (Fig. 4).



Figura 4. Plantas de *Capsicum annuum* (chile ornamental) a los 20 días post-inoculación con aislados de *Phytophthora capsici* provenientes de: a) y b) *Capsicum annuum* (chile ornamental) PV-35 y PV-46 respectivamente, c) *Solanum ovigerum* (planta de huevo) PV-44 y d) *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) PV-41.

De acuerdo al análisis estadístico, entre los aislados de chile ornamental PV-15, PV-30, PV-33, PV-35, PV-36 y PV46 no se observan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cuanto a los dpi, pero sí con respecto al testigo. Con el resto de los aislados, sí existen diferencias significativas (Fig. 5).

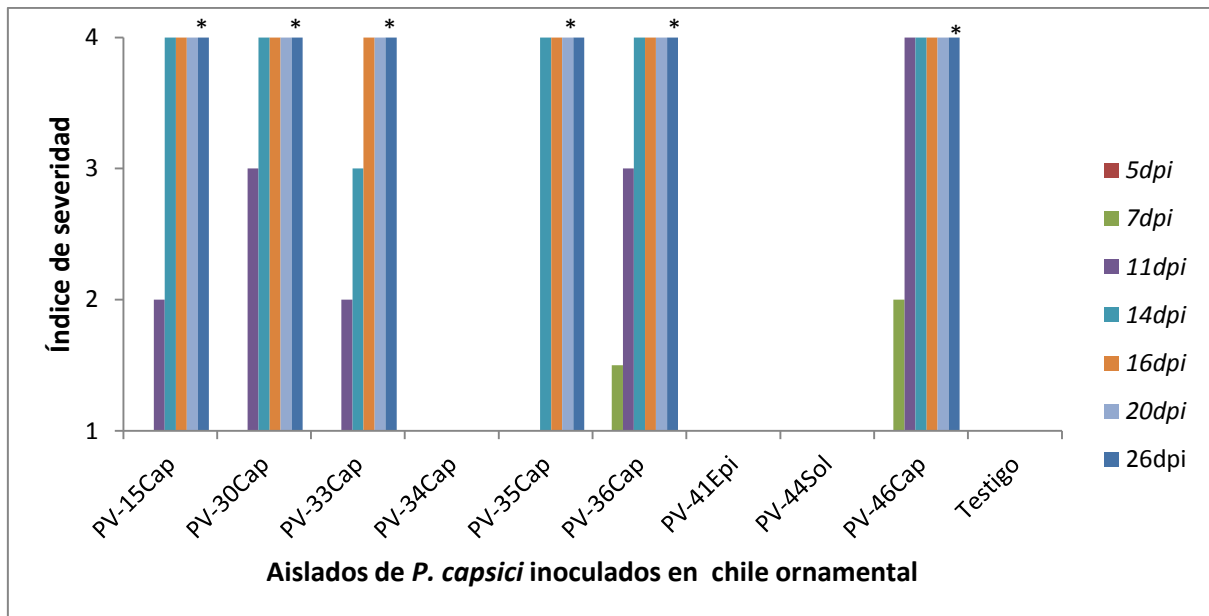


Figura 5. Índice de severidad en plantas de *Capsicum annuum* (chile ornamental) en diferentes días post-inoculación (dpi) con aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de diferentes plantas ornamentales: *Capsicum annuum* (Cap), *Cestrum nocturnum* (Ces), *Epipremnum aureum* (Epi) y *Solanum ovigerum* (Sol). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo.

c) Planta de teléfono

- ✓ Tratamiento 1 (1,000 zoosporas/mL)

En estas plantas sólo cuatro de los diez aislados obtenidos de plantas ornamentales fueron virulentos éstos fueron: el PV-15, PV-30, PV-46 de chile ornamental y el PV-41 de planta de teléfono. La virulencia de los aislados se manifestó en el amarillamiento en las hojas, marchitez, necrosis y muerte. Con los aislados PV-15 y PV-30 se comenzaron a observar síntomas a los cinco dpi y al final del experimento, se encontró una mortalidad del 100 y 67% respectivamente, las plantas inoculadas con el aislado PV-46 presentaron sólo

marchitamiento de las hojas y hasta los 30 dpi murió el 67% de éstas. En las plantas inoculadas con el aislado PV-41, los primeros síntomas de marchitamiento se observaron después de cuatro dpi, a los diez dpi se presentó amarillamiento y marchitez total así como necrosis del tallo, posteriormente el 100% de las plantas murieron. Es importante resaltar que solamente el aislado PV-41 provocó necrosis del tallo.

✓ Tratamiento 2 (10,000 zoosporas/mL)

Con esta concentración de zoosporas, se observaron síntomas de marchitamiento a los siete dpi en las plantas inoculadas con los aislados PV-15, PV-30, PV-34 y PV-46 de chile ornamental con porcentajes de muerte al final del experimento de 67, 33, 67 y 33% respectivamente. Las que se inocularon con PV-36 y PV-44 mostraron síntomas a los nueve dpi, al final del experimento volvieron a formar hojas y se recuperaron totalmente sin que se presentara muerte de ninguna planta. La totalidad de las plantas que se inocularon con PV-41 murieron a los siete dpi. Cuando se realizó una preparación del micelio del aislamiento de tejido vivo bajo el microscopio, se observó la presencia de esporangios de las plantas inoculadas con PV-15, PV-30, PV-41 y PV-46; con PV-34, PV-36 y PV-44 no se logró observar la presencia de esporangios aun cuando el aislado PV-34 sí provocó la muerte de las plantas por lo que no se consideraron como avirulentos (Fig. 6). En esta especie no se realizó el análisis de la severidad ya que algunas plantas que presentaron marchitez después se recuperaron hasta formar nuevos brotes.

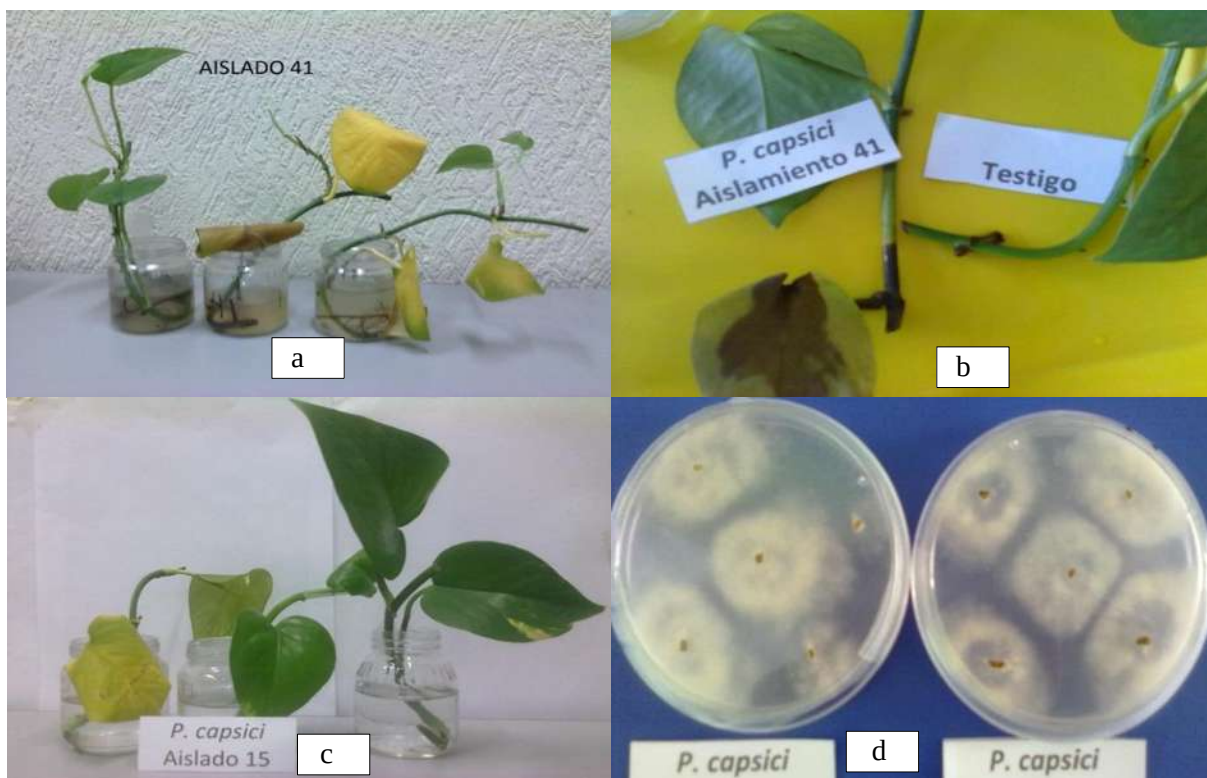


Figura 6. Plantas de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) inoculadas con aislados de *P. capsici* a) Marchitez, amarillamiento y necrosis ocasionadas por el aislado PV-41 de planta de teléfono, b) Necrosis en el tallo con PV-41, c) Marchitez y amarillamiento con el aislado PV-15 chile ornamental y d) Cultivos de *P. capsici* obtenidos de tejido de plantas inoculadas con PV-15 y PV-41.

d) Rango de hospedantes

El rango de hospedantes de los aislados de *P. capsici* fue variable. Las diferencias se presentaron dependiendo del hospedante del que fue obtenido cada aislado (Tabla 7).

Todos los aislados de chile ornamental (PV-15, PV-30, PV-33, PV-34, PV-35, PV-36 y PV-46) fueron virulentos en chile ornamental, sin embargo, los más virulentos fueron el PV-36 y PV-46 con el 100% de muerte. En chile serrano también todos fueron virulentos, generando 100% de muerte. En planta de teléfono los aislados PV-15, PV-30 y PV-46 inoculados con 1000 y 10,000 zoosporas se consideraron como virulentos. Asimismo, el aislado PV-44 de planta de huevo ocasionó el 8% de plantas muertas sólo en chile ornamental. Por otra parte,

el aislado de PV-41 de planta de teléfono no fue virulento ni en chile serrano ni en chile ornamental. El resto de los aislados no fue virulento.

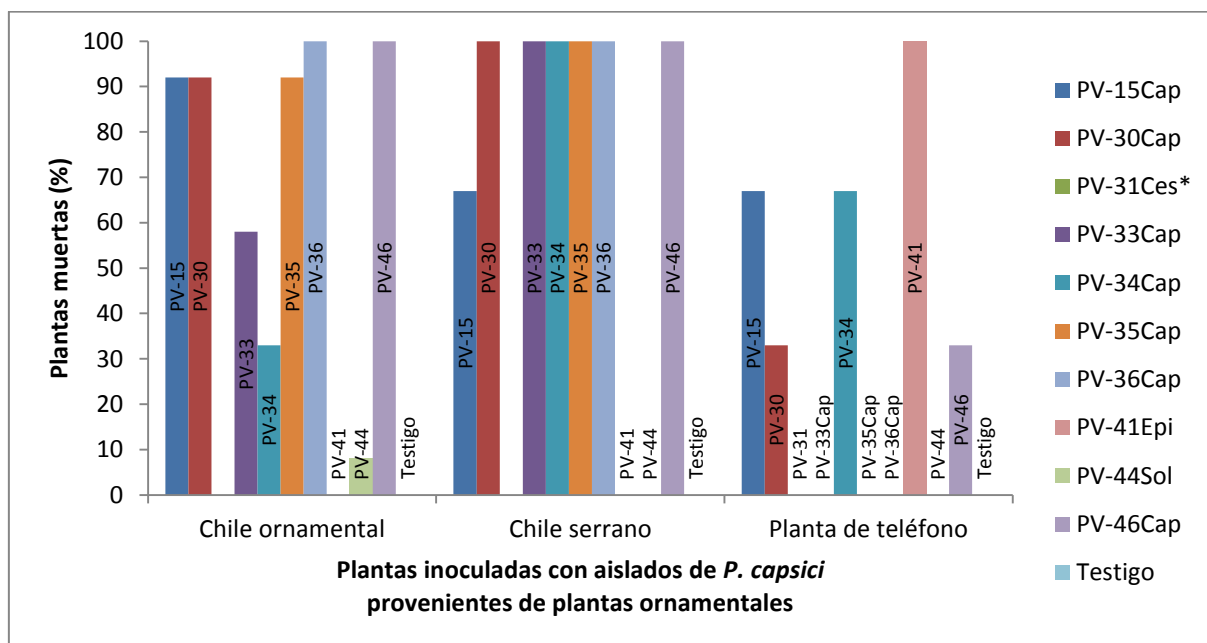


Figura 7. Porcentaje de plantas muertas de tres hospedantes inoculados con aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de plantas ornamentales: *Capsicum annuum* (Cap), *Cestrum nocturnum* (Ces), *Epipremnum aureum* (Epi) y *Solanum ovigerum* (Sol). *Sólo se inoculó en planta de teléfono.

1.3.4.2 Inoculación de aislados de *P. drechsleri*

Los aislados de esta especie obtenidos de gerbera, gazania, margarita africana y nochebuena, presentaron variabilidad tanto en la virulencia como en el rango de hospedantes cuando se inocularon en *Gazania* sp. (gazania), *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) y *Petunia* sp. (petunia).

a) *Gazania*

En esta especie que se inoculó con los aislados PV-27 y PV-47 de gerbera, PV-29 y PV-40 de gazania, PV-37 de nochebuena y PV-39 de margarita africana, se observaron ligeros síntomas de marchitez en algunas plantas; sin embargo, con el paso de los días éstas se

recuperaron totalmente ya que formaron hojas nuevas y produjeron flores por lo que se consideró que los aislados fueron avirulentos. (Fig. 8).



Figura 8. Plantas de *Gazania* sp. (gazania) inoculadas con aislados de *Phytophthora drechsleri* sin síntomas de marchitez y/o necrosis y con botones florales.

b) Nochebuena

- **Variedad Valenciana**

- ✓ Experimento 1 (Inoculación en ramas con medio de cultivo con micelio)

Los aislados PV-27, PV-37 y PV-39 obtenidos de gerbera, nochebuena y margarita africana respectivamente, fueron virulentos al inocularlos en las ramas, el primer síntoma se observó a los cinco dpi como una mancha oscura en el sitio de infección y marchitez en las hojas inferiores. En dos plantas inoculadas con el aislado PV-27 se observó marchitez completa de la planta (brácteas verdes y hojas rojas) a los ocho dpi, así como pudrición y muerte del tallo. A los 12 dpi todas las plantas murieron por lo que este aislado fue el más agresivo. En dos de las plantas inoculadas con el aislado PV-39, a los 17 dpi se observó marchitamiento completo

y otras tres presentaron defoliación, muriendo solo dos plantas. En el testigo no se observaron síntomas (Fig. 9). Las plantas inoculadas con PV-29 y PV-40 de gazania y PV-47 de gerbera, se recuperaron de la marchitez que presentaron al inicio del experimento, por lo que al final del mismo estaban sanas.



Figura 9. Plantas de nochebuena var. Valenciana inoculadas con aislados de *P. drechsleri* : a) Inoculación en ramas con micelio en cubos de agar, b) Necrosis en el tallo ocasionado por el aislado PV-27 obtenido de *Gerbera* sp. (gerbera) a los ocho días post-inoculación, c) Aislado PV-27 y testigo a los 12 dpi y d) Plantas con aislado PV-29 de *Gazania rigens* (gazania) y Testigo sin síntomas.

El análisis de varianza ($p \leq 0.05$) detectó diferencias significativas en el índice de severidad de síntomas a partir del día cinco dpi con los aislados PV-27 y PV-37 en el resto de los aislados no se observaron diferencias significativas (Fig. 10).

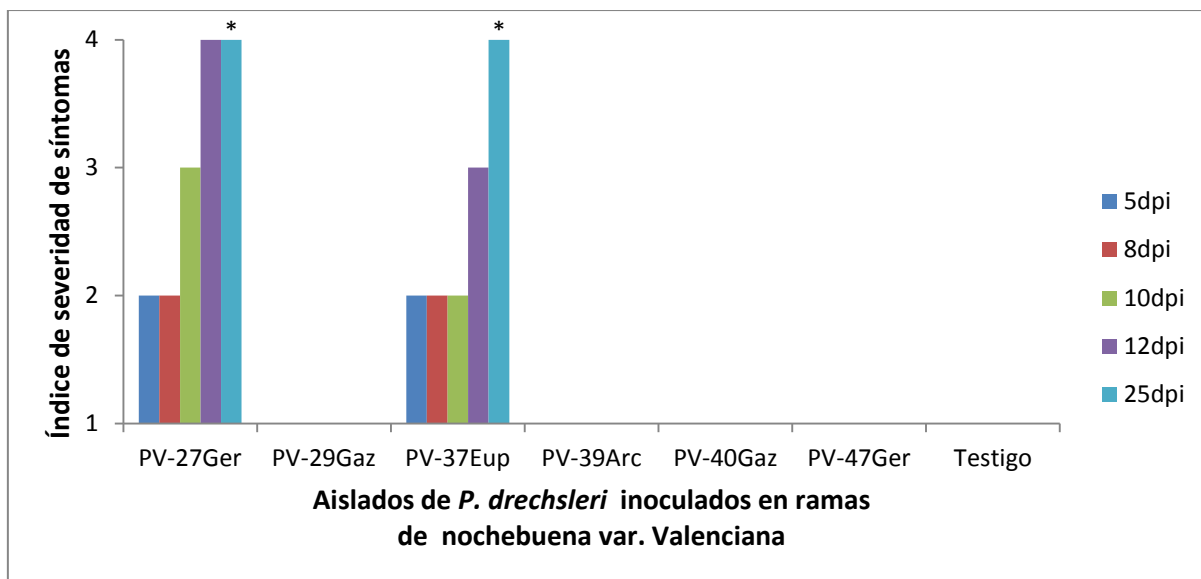


Figura 10. Índice de severidad en plantas de nochebuena var. Valenciana en diferentes días post-inoculación (dpi) en ramas con aislados de *Phytophthora drechsleri* provenientes de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp. (Ger). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo.

- **Variedad Freedom Red**

✓ Experimento 1 (Inoculación en ramas con medio de cultivo con micelio).

Todos los aislados inoculados ocasionaron síntomas de marchitez, PV-27 de gerbera, PV-37 de nochebuena y PV-39 de margarita africana a los tres dpi y PV-29 y PV-40 de gazania y PV-47 de gerbera a los seis dpi. Se observó necrosis en el tallo conforme transcurrieron los días. Los aislados PV-37 y PV-39, fueron los de mayor virulencia ya que causaron el 100% de muerte. Asimismo el más agresivo fue el PV-39 ya que a los cinco dpi ya había provocado el marchitamiento completo del 67% de las plantas inoculadas y a los diez dpi su muerte. El aislado PV-40 sólo ocasionó la muerte de una planta (Fig. 11).

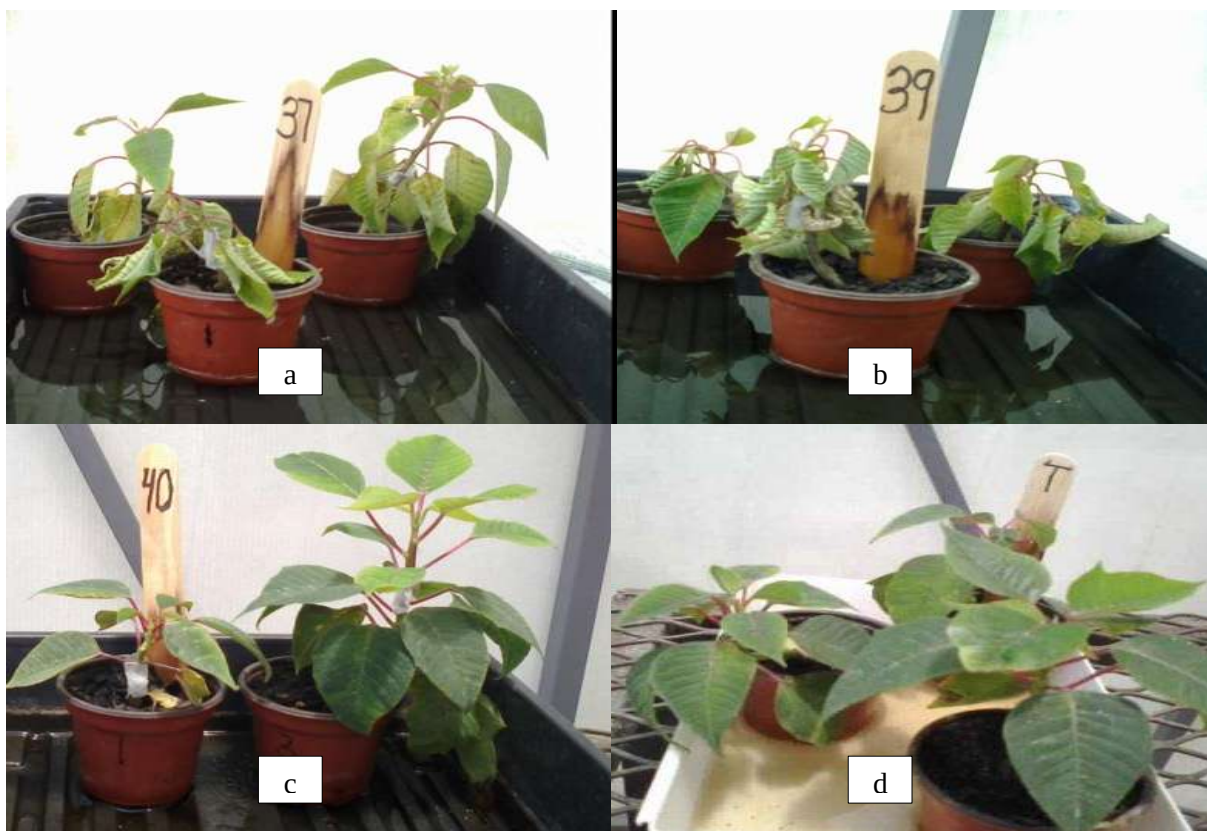


Figura 11. Plantas de nochebuena var. Freedom Red inoculadas con aislados de *P. drechsleri* en ramas: a) y b) Marchitez a los cinco dpi con aislado PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) y con aislado PV-39 de *Arctotis* sp. (margarita africana) respectivamente, c) Plantas sanas a los 13 dpi con aislado PV-40 de *Gazania* sp. (gazania) en donde sólo murió una planta y d) Plantas sanas de testigo a los 13 dpi.

En el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) al final del experimento no se detectaron diferencias significativas entre los aislados por efecto de los dpi. Se observan cambios en el índice de severidad con los aislados PV-27, PV-29, PV-37, PV-39 y PV-47 con respecto al testigo ya que se presentó desde el 67 al 100% de muerte, en el aislado PV-40 no hubo diferencias significativas con respecto al testigo, pero sí con el resto de los aislados (Fig. 12).

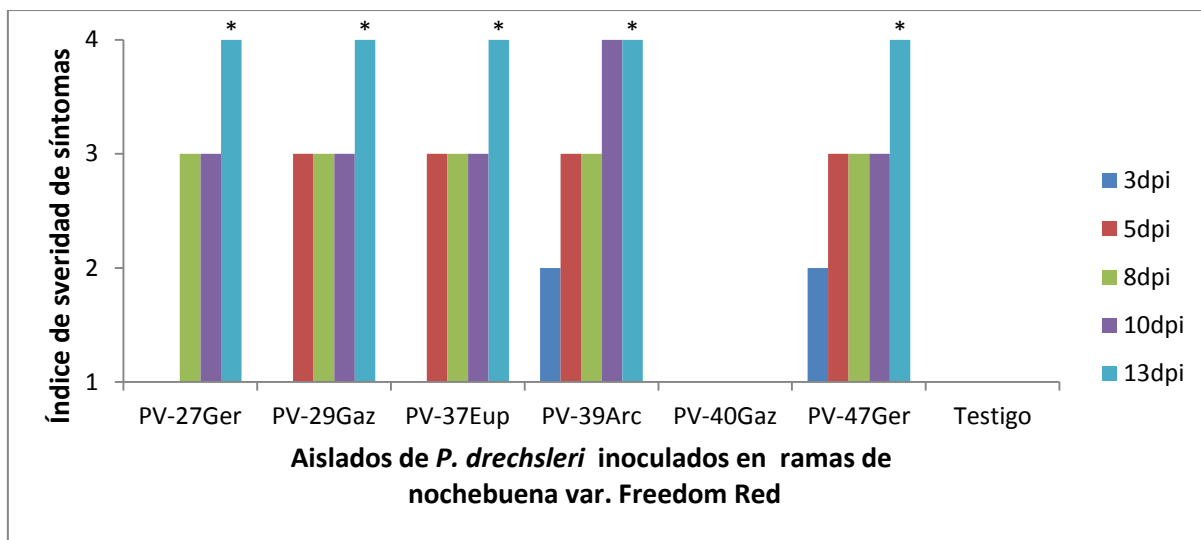


Figura 12. Índice de severidad en plantas de nochebuena var. Freedom Red, en diferentes días post-inoculación (dpi) en ramas con aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp (Ger). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo.

✓ Tratamiento 2 (Suspensión de 6,000 zoosporas/mL de agua en el sustrato)

Cuatro de los seis aislados inoculados fueron virulentos, ya que ocasionaron síntomas de marchitamiento con diferente agresividad. Los primeros síntomas se observaron a los tres dpi con el aislado PV-27 de gerbera, a los cuatro dpi con los aislados PV-37 de nochebuena, PV-39 de margarita africana, PV-40 de gazania y PV-47 de gerbera y a los 20 dpi con PV-29 de gazania. Posteriormente, se observó necrosis en las ramas y por último la muerte de la plantas, cabe señalar que las plantas inoculadas con PV-29 y PV-40 presentaron 17 y 42% de muerte de plantas respectivamente; sin embargo, no fue posible reaislar al patógeno del tejido dañado (Fig. 13).



Figura 13. Plantas de nochebuena var. Freedom Red inoculadas con aislados de *P. drechsleri* en suelo a 20 dpi a) y b) Muerte de plantas con el aislado PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) y PV-47 de *Gerbera* sp. (gerbera).

En el análisis estadístico a partir del día seis y hasta el día 33 dpi, se distinguen diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$), es decir, hay cambios en el índice de severidad con los aislados PV-27, PV-37 y PV-39 con respecto a dpi, en el resto no hay diferencias significativas (Fig. 14).

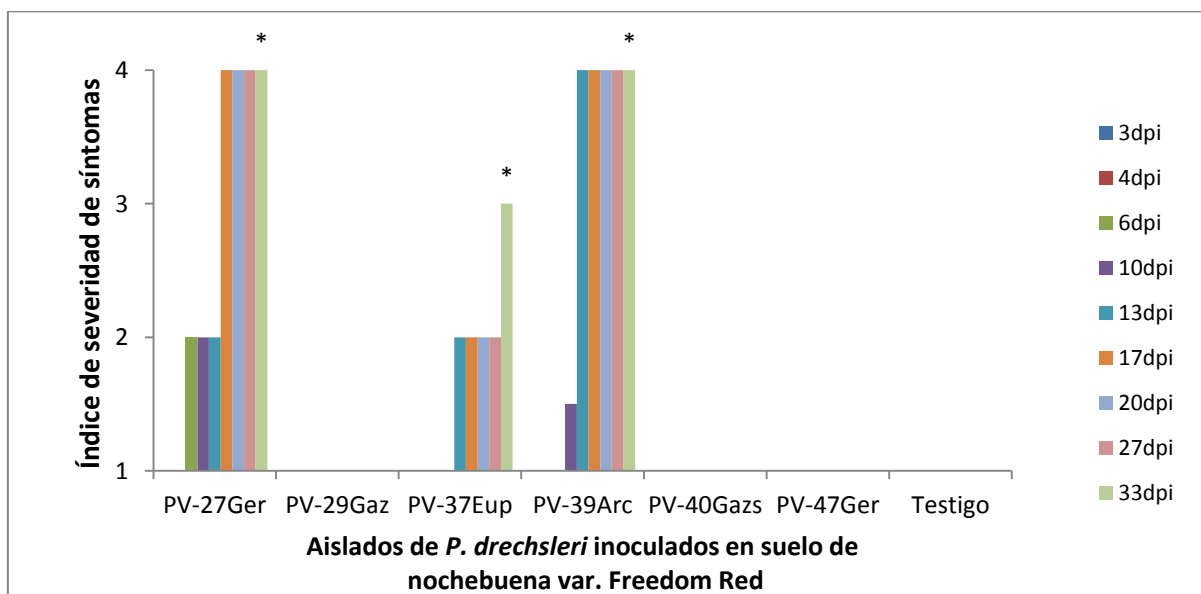


Figura 14. Índice de severidad en plantas de nochebuena var. Freedom Red en diferentes días post-inoculación (dpi) en suelo con aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp (Ger). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al testigo.

c) Petunia

La mayoría de las plantas que se inocularon con los aislados PV-27 gerbera, PV-37 nochebuena y PV-39 margarita africana, comenzaron a marchitarse a los dos dpi, las que se inocularon con los aislados restantes variaron en el tiempo en que se presentó este síntoma, con los aislados PV-29 y PV-40 de gazania y PV-47 gerbera a los cuatro, siete y 16 dpi respectivamente. A los 30 dpi todas las plantas se habían marchitado y solamente con los aislados PV-29 y PV-47 se registraron plantas muertas (Fig. 15). Al realizar el reaislamiento del patógeno del tejido de plantas con síntomas, se recuperó únicamente de las plantas inoculadas con PV-29 y PV-47. No se realizó el análisis del índice de severidad ya que las plantas también fueron afectadas por la mosca negra de los invernaderos, de la cual no se determinó el género.



Figura 15. Plantas de *Petunia* sp. (petunia) 22 días post-inoculación con aislados de *P. drechsleri*: a) Plantas con marchitez ocasionada con el aislado PV-40 de *Gazania* sp. (gazania) y b) Plantas inoculadas con PV-29 de *Gazania* sp. (gazania), en donde se observan plantas muertas.

d) Rango de hospedantes

Cuando se comparó el rango de hospedantes de los aislados de *P. drechsleri*, se observó que en las plantas de gazania ninguno de los aislados fue virulento, en las de petunia sólo los aislados PV-29 y PV-47 ocasionaron el 25% de muerte.

En plantas de nochebuena variedad Valenciana con los aislados PV-27, PV-37 y PV-39 se alcanzó el 100, 60 y 40% de muerte, respectivamente. En la variedad Freedom Red, se observó disimilitud en la virulencia dependiendo del sitio de inoculación. En ramas, todos fueron virulentos aunque con diferente porcentaje de mortalidad. En suelo todos los aislados ocasionaron la muerte de plantas; sin embargo, no se obtuvo el reaislamiento del patógeno en las plantas con los aislados PV-29 y PV-40 por lo que no se consideraron virulentos. (Fig. 16).

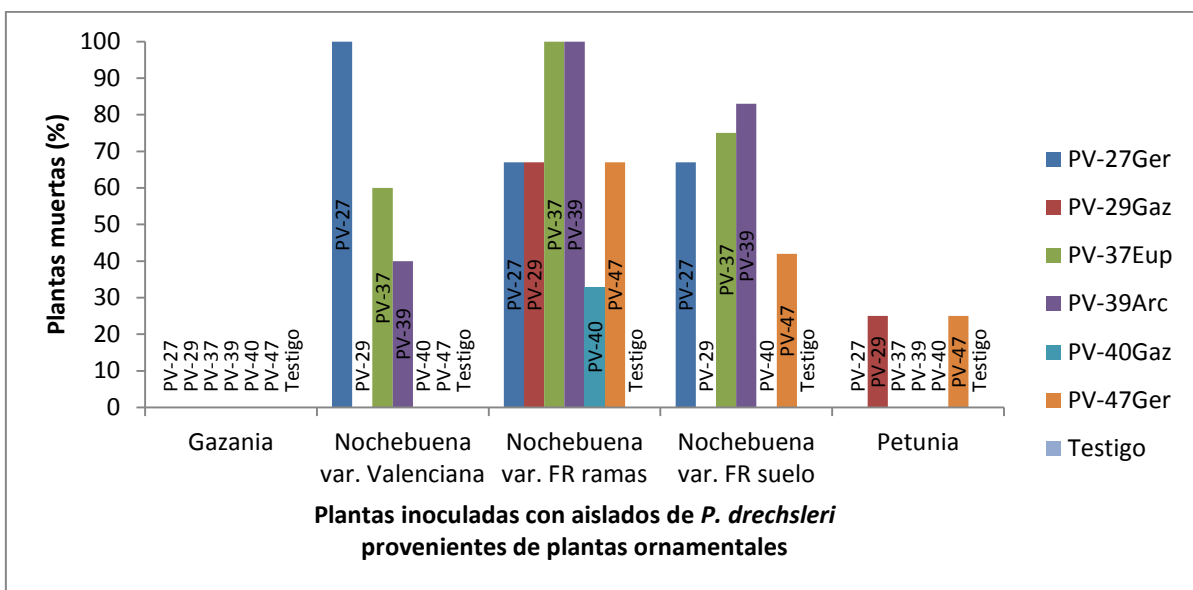


Figura 16. Porcentaje de plantas muertas inoculadas en cinco hospedantes con aislados de *P. drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales: *Arctotis* sp. (Arc), *Euphorbia pulcherrima* (Eup), *Gazania* sp. (Gaz) y *Gerbera* sp (Ger).

1.4 DISCUSIÓN

Los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* utilizados en este trabajo, obtenidos de plantas ornamentales, fueron caracterizados utilizando marcadores como virulencia, tipo de compatibilidad y resistencia a mefenoxam. Se detectó variabilidad en la agresividad y virulencia en los aislados de *P. capsici* esto coincide con otros estudios (Ristaino, 1990; Lamour *et al.*, 2003; Fernández-Pavía *et al.*, 2004; Sylvar *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2008; Foster y Hausbeck, 2010; Yin *et al.*, 2012; Olson y Benson, 2013).

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Fernández-Pavía *et al.* (2004), quienes indican que la virulencia de aislados obtenidos de Chile varió al inocularlos en diferentes hospedantes. En otro estudio realizado con aislados obtenidos de calabaza y pepino, inoculados en plantas de Chile (*Capsicum annuum*), se observó que solo algunos fueron virulentos (Ristaino, 1990). Yin *et al.* (2012) señalan que la variación en la virulencia podría relacionarse con el hospedante de donde el aislado fue obtenido ya que con cepas de *P. capsici* que provenían de diferentes hortalizas al inocularlas en Chile observaron diferencias en la agresividad por lo que agruparon a los aislados en 10 patotipos.

En el presente estudio, el aislado PV-44 obtenido de *Solanum ovigerum* (planta de huevo) presentó una clara diferencia en la virulencia con respecto al aislado PV-46 de *Capsicum annuum* (Chile ornamental) cuando se inocularon en *Capsicum annuum* (Chile serrano var. Camino Real), al obtener 8 y 100% de plantas muertas, respectivamente. El aislado PV-41 de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) mostró especificidad ya que solo fue virulento en plantas de teléfono. Una caracterización genética preliminar de este aislado indica que podría ser una cepa intermedia entre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora tropicalis*. *P. tropicalis* fue aislada en Polonia por Orlikowski *et al.* (2006) de este mismo hospedante con síntomas similares a los observados en este estudio. Sin embargo, Orlikowski *et al.* (2006) reportan que fue capaz de infectar plántulas de jitomate mientras que el aislado PV-41 no infectó Chile. Los aislados de *P. capsici* obtenidos de planta de huevo y de Chile ornamental sí fueron virulentos en plantas de Chile serrano, esto concuerda con lo observado por Hong *et al.* (2008) que reportan que diferentes especies del género *Phytophthora* que actualmente se conocen por ser patógenos solo en ornamentales también pueden ser virulentos en otros

cultivos, como el complejo de tres cepas de *P. drechsleri* que se aislaron de agua de irrigación de ornamentales y que al inocularlos en pepino, berenjena y tomate fueron virulentos. Bowers *et al.* (2007) señalan que el hospedante puede actuar como seleccionador de variabilidad genética ya que selecciona y separa poblaciones. Gil *et al.* (1992), proponen la existencia de dos patotipos (P0 y PI) de *P. capsici* dependiendo de la virulencia, en donde P0 son aislados que pueden infectar a dos genotipos con resistencia y PI solamente a uno.

Los aislados de *P. drechsleri* analizados en este trabajo también mostraron variabilidad. Los aislados PV-29 y PV-40 de *P. drechsleri* obtenidos de *Gazania rigens* y *Gazania* sp. (*gazania*) respectivamente, no fueron virulentos al inocularlos en este hospedante, esto podría deberse a que posiblemente no eran iguales los cultivares de donde se aislaron y donde se inocularon, ya que no se cuenta con esta información, debido a que los viveristas no la poseen. Esto fue detectado también por Olson y Benson (2013) ya que no observaron síntomas en *Gerbera jamesonii* (gerbera) al inocular un aislado de *P. drechsleri*, el cual fue obtenido del mismo hospedante y mencionan que esto podría deberse a la diferencia en la susceptibilidad del cultivar dentro del hospedante ya que el aislado no se inoculó en el mismo cultivar de donde fue obtenido, asimismo esto ha sido reportado también en interacciones cultivar-aislado en girasol resistentes a *P. drechsleri* por Zimmer e Urie (1967), citados por Olson y Benson (2013).

Con respecto a diferencias entre variedades, los resultados de las pruebas de virulencia en *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) variedades Freedom Red y Valenciana, mostraron que ésta última es resistente a pudrición de raíz, ya que al inocular zoosporas en el suelo (datos no mostrados) no se observaron síntomas. Sin embargo, cuando se realizaron inoculaciones en ramas sí se observó virulencia de algunos aislados en la variedad Valenciana. Esto coincide con lo observado por Oelke *et al.* (2013) en *Capsicum annuum* (chile) ya que se ha visto que la genética de la resistencia a tizón foliar y pudrición de raíz ocasionados por *P. capsici* están dadas por diferentes genes. Asimismo se puede considerar que la variedad Valenciana se puede usar como un portainjerto para evitar pudrición de raíz en variedades de nochebuena susceptibles. En la variedad Freedom Red se observó variabilidad entre los aislados inoculados ya que no todos fueron virulentos en raíz, pero si en ramas. Esto coincide con lo reportado por Hong *et al.* (2008) en donde refieren que la presencia de síntomas

depende del método de inoculación, asimismo Foster y Hausbeck (2010) observaron diferencias en la agresividad dependiendo de la parte de la planta que fue inoculada con *P. capsici*, siendo más susceptible el fruto que la corona y el tallo.

Por otra parte, la determinación del rango de hospedantes de los aislados es indicativo del potencial que tienen de infectar otros géneros de plantas ornamentales dentro de un vivero, por lo que es indispensable que los productores realicen un buen manejo de las plantas enfermas. Una práctica común en algunos viveros es la reutilización de suelo, por lo que se sugiere que este se descarte si proviene de plantas enfermas porque es muy probable que se vuelvan a infectar, asimismo se sugiere separar las plantas que presenten marchitamiento, ya que por medio del riego se pueden contaminar plantas sanas.

La presencia de los tipos de compatibilidad A1 y A2 en estos aislados como lo reporta Díaz-Celaya (2011) puede jugar un papel importante en la variabilidad de los aislados ya que se puede presentar recombinación sexual entre éstos como lo señala Goodwin (1997), que indica que tanto aislados de *P. capsici* como de *P. infestans* y *P. nicotianae* varían en rango de hospedantes, patogenicidad y virulencia. Al realizar las cruces del aislado PV-29 con aislados de la misma especie con tipo A1 y A2 conocidos, no fue posible observar la formación de oosporas por lo que se determinó que fue estéril, lo que concuerda con lo señalado por Martin *et al.* (2012) en donde mencionan que pocas especies no papiladas como *P. litoralis* y *P. pinifolia*, *P. machrochlamydospora*, *P. quininea*, *P. gallica*, y *P. gemini*, son estériles. Esto representa una ventaja para el productor ya que no se cruzará con otros aislados y no será una fuente de variabilidad.

La mayoría de los aislados fueron sensibles al mefenoxam, es posible que esto suceda porque este fungicida se utiliza ocasionalmente porque no representa una opción costosa para la mayoría de los productores. Diferentes reportes señalan que la mayoría de los aislados son sensibles a este fungicida. Olson *et al.* (2013) encontraron que de 1483 aislados de 27 especies de *Phytophthora* solo el 6% de aislados obtenidos de plantas enfermas y 9% de los recuperados del agua de riego de ornamentales, fueron sensibles a este fungicida. Silvar *et al.* (2006) determinaron que el 87.5% de los aislados de *P. capsici* estudiados en España fueron sensibles, Dunn *et al.* (2010), refieren que en la población del mismo patógeno la mayoría fueron sensibles por lo que este producto podría ser usado en rotación con otros fungicidas

con diferente modo de acción para evitar la resistencia. En México Silva-Rojas *et al.* (2009) señalan que aislados de *P. capsici* que se obtuvieron en Chihuahua, fueron sensibles a este fungicida. Esto contrasta con los resultados de Hwang y Benson (2005) y Olson y Benson (2011) que determinaron que todos los aislados de *P. drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales, fueron resistentes a este producto.

En el presente estudio, los aislados PV-15 de *P. capsici* obtenido de chile ornamental y el PV-37 de *P. drechsleri* de nochebuena, fueron medianamente sensibles, lo que concuerda con los resultados de Olson *et al.* (2013) que determinaron un aislado de *P. capsici* obtenido de plantas ornamentales enfermas como sensible. En particular concuerda con el reporte de Lamour *et al.* (2003) que encontraron un aislado con resistencia intermedia que provenía de nochebuena. Este fungicida sigue siendo una opción efectiva en plantas ornamentales en las que su uso sea costeable.

1.5 CONCLUSIONES

El 87% de los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* fueron sensibles a mefenoxam por lo que este fungicida representa una opción en el control de estos patógenos en plantas ornamentales

Se observaron diferencias en el rango de hospedantes así como en la severidad de síntomas de los aislados de *P. capsici* en chile ornamental, chile serrano y planta de teléfono y en los aislados de *P. drechsleri* en gazania, nochebuena variedades Freedom Red y Valenciana, y petunia.

Se reporta por primera vez la presencia de un aislado estéril en *P. drechsleri*.

El análisis de marcadores como virulencia y resistencia a mefenoxam muestran que existe variabilidad entre los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* provenientes de plantas ornamentales.

1.6 LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. United States of America. 922 p.

Alvaréz, L.A., Pérez-Sierra, A., Vincent, A., Armengol, J., García-Jiménez, J. 2005. *Phytophthora ramorum*, patógeno de plantas ornamentales y forestales. Revista Horticultura. 186:12-19.

Bowers, J.H., Martin, F.N., Tooley, P.W., Luz, E.D.M.N. 2007. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. Phytopathology 97:492-503.

Cundom, M., Cabrera M., 2004. Primera determinación de *Phytophthora capsici* patógeno del filodendro (*Philodendron scandens*) en Argentina. Agricultura Técnica 64:421-425.

Chalate, M. H., San Juan, H. R., Diego, L. G., y Pérez Hernández, P. 2008. Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología de la cadena productiva horticultura ornamental en el Estado de Veracruz. México. Disponible en: <http://www.funprover.org/formatos/PLANES%20ESTRATEGICOS/Cadena%20horticultura%20ornamental.pdf>. (Consultada abril 2012).

De la Madrid, E. La floricultura en México. El Sol de México. México. 11 de julio de 2009 Disponible en: <http://www.oem.com.mx/oem/notas/n1240139.htm>. (Consultada abril 2012).

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, Morelia, Mich, México. 82 p.

Dunn, A.R., Milgroom, M.G., Meitz, J.C., McLeod, A., Fry, W.E., McGrath, M.T., Dillard, H.R., Smart, C.D. 2010. Population structure and resistance to mefenoxam of *Phytophthora capsici* in New York. Plant Disease 94:1461-1468.

Erwin, D. C. y Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. United States. 562 p.

Fernández-Pavía, S.P., Biles, C.L., Waugh, M.E., Onzures-Waugh, K., Rodríguez, A.C., Liddell, C.M. 2004. Characterization of Southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 22:82-89.

Foster, J.M., Hausbeck, M.K. 2010. Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot, is affected by isolate virulence. Plant Disease 94:24-30.

Franco, T.L., Hidalgo, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín Técnico IPGR No 8. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGR). Colombia, 89 p.

Gil, O.R., Palazone, E.C., Cuartero, Z.J. 1992. Genetic relationships among four pepper genotypes resistant to *Phytophthora capsici*. Plant Breeding 108:118-125.

Gisi, U., Cohen, Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicide: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annual Review of Phytopathology 34:204-208.

Givens, A.J., Donahoo, R.S., Lamour, K.H., Hausbeck, M.K. 2008. Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. Plant Disease 92:201-209.

González-Chavira M.M., Simpson, W.J. 2008. Diversidad genética en hongos (origen y análisis). In: Martínez, S. J.P., Martínez, E. (eds) Tópicos selectos de fitopatología: genética molecular. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Unidad Irapuato, Guanajuato, México. p. 4-23.

Goodwin, S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. Phytopathology 87:462-463.

Hurtado-González, O., Aragón-Caballero, L., Apazia-Tapia, W., Donahoo, R., Lamour, K. 2008. Survival and spread of *Phytophthora capsici* in coastal Peru. Phytopathology 98:688-694.

Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops; Research, progress and management challenges. Plant Disease 88:1292-1303.

Hong, Ch., Richardson, P.A., Kong, P. 2008. Patogenicity to ornamental plants of some existing species and new taxon of *Phytophthora* from irrigation water. Plant Disease 92:1201-1207.

Hoover, B.K. 2012. Fungicide efficacy in prevention of root rot incited by *Phytophthora cactorum* and *P. drechsleri* in fraser fir seedlings. Hort Technology 4: 470-475

Hu, J.H., Hong, C.X., Stromberg, E.L., Moorman, G. 2008. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. Plant Pathology 57:728-736.

Hurtado-González, O., Aragón-Caballero, L., Apazia-Tapia, W., Donahoo, R., Lamour, K. 2008. Survival and spread of *Phytophthora capsici* in coastal Peru. Phytopathology 98:688-694.

Hwang, J., Benson, D.M. 2005. Identification mefenoxam sensitivity and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 89:185-190.

Jaramillo, V. S. 2003. Monografía de *Phytophthora infestans*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 137 p. Disponible en: <http://www.reuna.unalmed.edu.co/temporales/memorias/Monografia.pdf>. (Consultada abril 2012).

Keinath, A.P., 2007. Sensitivity of populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to mefenoxam dimethomorph, zoxamide and cymoxanil. Plant Disease 91:743-748.

Lamour, K.H., Hausbeck, M.K. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. Phytopathology 90:396-400.

Lamour, K.H., Hausbeck, M.K., 2001. Investigating the spatio temporal genetic structure of *P. capsici* in Michigan. Phytopathology 91:973-980.

Lamour, K.H., Hausbeck, M.K., 2003. Susceptibility of mefenoxam-treated cucurbits to isolates of *Phytophthora capsici* sensitive and insensitive to mefenoxam. Plant Disease 87:920-922.

Lamour, K.H., Daughtrey, M.L., Benson, D.M., Hwang, J., Hausbeck, M.K. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. Plant Disease 87:854-858.

Lamour, K.H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-González, D.P., Schmutz, J. Kuo, A., Miller, N.A., Rice, B.J., Raffaele, S., Cano, L.M., Bharti, A., Donahoo, R.S., Finley, S., Huitema, E., Hulvey, S., Platt, D., Salamov, A., Savidor, A., Sharma, R., Stam, R., Storey, D., Thines, M., Win, J., Hass, B.J., Dinwidie, D.L., Jenkins, J., Kinght, J.R., Affourtit, J.P., Han, C.S., Chertkov, O., Lindquist, E.A., Detter, C., Grigoriev, I.V., Kamoun, S., Fingsmore, S.F., 2012. Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. Molecular Plant-Microbe Interactions 25:1350-1360.

Li, P., Cao, S., Dai, Y.L., Li, X.L., Xu, D.F., Guo, M., Pan, Y.M., Gao, Z.M. 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* (Pythiaceae) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. Genetic Molecular Research 11:4285-4296.

McDonald, B.A., Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annual Reviews 40:349-379.

Macias, F.O.L., Delgado, C.Y., Peña, M.E., Betancourt, R.L., Barreto, R.E. s.f. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. Disponible en: <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH01d2/441186ed.dir/doc.pdf>. (Consultada enero 2013).

Martin, F.N., Abad, G.Z., Balci, Y., Ivors, K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. Plant Disease 96:1080-1102.

Moorman, G.W., Kim, S.H. 2004. Species of *Pythium* from greenhouse in Pensilvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. Plant Disease 88: 630-632.

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: 100-110.

Oelke, L., Bosland, P.W., Steiner, R. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. Journal of the American Society of Horticultural Science 28:213-218.

Olson, H.A., Benson, D.M. 2011. Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 95:1013-1020.

Olson, H.A., Benson, D.M. 2013. Host specificity and variations in aggressiveness of North Carolina isolates of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* in greenhouse ornamental plants. Plant Disease 97:74-80.

Olson, H.A., Ivors, K.L., Steddom, K.C., Williams-Woodward, J.L., Mmbaga, M.T., Benson, D.M., Hong, C.X. 2013. Diversity and mefenoxam sensitivity of *Phytophthora* spp. associated with the ornamental horticulture industry in the southeastern United States. *Plant Disease* 97:86-92.

Orlikowski, L.B., Tzrewik, A., Wiejacha, K., Szkuta, G. 2006. *Phytophthora tropicalis* a new pathogen of ornamental plants in Poland. *Journal of Plant Protection Research* 46:103-109.

Pérez-Moreno, L. Durán-Ortíz, L.J., Ramírez-Malagón, R, Sánchez-Pale, J.R. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:19-25.

Pérez, W., Forbes, G. 2008. Manual Técnico del tizón tardío de la papa. Centro Internacional de la papa. Perú. 41 p. Disponible en <http://cipotato.org/es/resources/publications/manual/manual-ta-c-nico-el-tiza3n-tardao-de-la-papa/>. (Consultada abril 2012).

Quesada-Ocampo, L.M., Fulbrigh, D.W., Hausbeck, M.K. 2009. Susceptibility of fraser fir to *Phytophthora capsici*. *Plant Disease* 2009:135-141.

Rahman, M.Z., Uematsu, S., Coffey, M.D., Uzuhashi, S., Suga, H., Kageyama, K. 2013. Re-evaluation of Japanese *Phytophthora* isolates based on molecular phylogenetic analyses. *Mycoscience* 1-14.

Ristaino, J.B. 1990. Intraespecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Caroline. *Phytopathology* 80:1253-1259.

Silvar, C., Merino, F., Díaz, J. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in northwest Spain: Analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease* 90:1135-1142.

Valderrama, F.A.M., Cristancho, A.M.A., Chavéz, C.B. 2000. Análisis de variabilidad genética del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con marcadores RAPD. Revista Colombiana de Entomología 26: 25-29.

Villeda, E.O. Mal explotada la floricultura estatal, no general ni el 2% de la producción nacional. La Jornada Michoacán 6 de mayo de 2006. Disponible en: <http://archivo.lajornadamichoacan.com.mx/2006/05/06/12n1mun.html>. (Consultada abril 2012).

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: 883-890.

Yin, J., Jackson, K.L., Candole, B.L., Csinos, A.S., Langston, D.B., Ji, P. 2012. Agressivness and diversity of *Phytophthora capsici* in Georgia. Annals of Applied Biology 160:191-200.

CAPÍTULO 2. VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora capsici* Y *Phytophthora drechsleri* PROVENIENTES DE PLANTAS ORNAMENTALES CON EL USO DE MARCADORES MOLECULARES

RESUMEN

La variabilidad genética se debe a cambios heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie, el conocimiento de estas variaciones puede ayudar a generar estrategias de control adecuadas de los patógenos. En la identificación de fitopatógenos, el uso de los marcadores moleculares, ha logrado disminuir el tiempo para la identificación cuando ésta se realiza a través de características morfológicas. En este trabajo se realizó la amplificación y secuenciación de los genes citocromo oxidasa (Cox I y II) y 60S (proteína LS10) a través de PCR para poder determinar si existe variabilidad genética entre los aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales. En la amplificación del gen 60S para *P. capsici* se encontró similitud desde un 99 a 100% en diez aislados de *P. capsici* a diferencia de la amplificación de Cox II en donde se determinó que nueve aislados coinciden con *P. capsici* en porcentajes del 99 al 100% y uno en 100% con *Phytophthora tropicalis*. En la amplificación de los tres genes de los aislados de *P. drechsleri*, se encontró que solo cuatro de los seis identificados en un estudio previo como *P. drechsleri* tuvieron porcentajes de similitud del 99 al 100% en las bases de datos con esta especie y que los dos restantes coincidieron desde un 99 hasta el 100% con *Phytophthora* sp. “*kelmania*”. Por otra parte, se encontraron polimorfismos en las secuencias de nucleótidos de la mayoría los aislados de las dos especies investigadas, excepto en PV-34, PV-35, PV-36 y PV-46 obtenidos de *Capsicum annuum* (chile ornamental).

CHAPTER 2. GENETIC VARIABILITY OF *Phytophthora capsici* AND *Phytophthora drechsleri* FROM ORNAMENTAL PLANTS WITH THE USE OF MOLECULAR MARKERS.

ABSTRACT

Genetic variability is due to inheritable changes that occur in every organism, between the individuals of a population and between the populations of specie, the knowledge of this variations can help to generate the right strategies of pathogen control. In the identification of phytopathogens, the use of the molecular markers, has decreased the time when this is achieved compared from the one made through morphologic characteristics. In this work the amplification and sequencing of the genes cytochrome oxidase (Cox I and II) and 60S (protein LS10) through PCR were used to determine if genetic variability exists among the isolates of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* obtained from ornamental plants. The gen Cox I was not amplified for *P. capsici*. In the amplification of the gen 60S for *P. capsici* similarity from a 99% to a 100% was found with ten isolates of *P. capsici*, unlike the amplification with Cox II in which it was determined that nine isolates match with *P. capsici* in percentages from 99% to 100% and one in 100% with *P. tropicalis*. On the amplification of the three genes of the isolates of *P. dreschleri*, it was found that only four of the six identified on a previous study as *P. dreschleri* had percentages of similarity from 99% to 100% on the database with this specie and that the other two matched from 99% to the 100% with *Phytophthora* sp. “*kelfmania*”. On the other hand, polymorphisms were found on the nucleotide sequences of most of the isolates of the two researched species, except in PV-34, PV-35, PV-36 and PV-46 obtained from *Capsicum annuum* (ornamental pepper).

2.1 INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) de dos individuos diferentes es la misma, el 0.1% de la variación se conoce como polimorfismo genético, lo que representa diferentes formas en las secuencias de ADN (Checa, 2007). Algunas de las variaciones en la secuencia hacen referencia a cambios en la posición de uno de los cuatro nucleótidos que pueden alterar la composición de aminoácidos de las proteínas. Cuando un cambio en un nucleótido es muy raro y no está presente en varios individuos se llama mutación, ésta es una fuerza evolutiva capaz de proporcionar variabilidad. Existen dos tipos de mutaciones: por cambio de base o por formación de *indels* (mutaciones de inserción y/o delección), contrario a las mutaciones, los polimorfismos genéticos son considerados variaciones normales de la población y pueden dar lugar o no a variaciones en el fenotipo (Martínez y González, s.f.). El polimorfismo en la longitud del ADN y la variación en la secuencia de las bases se han utilizado para agrupar organismos de acuerdo con su origen y relación evolutiva. La identificación de secuencias de ADN desconocidas puede realizarse comparándolas con bases de datos de secuencias de nucleótidos de taxones conocidos (Pfenning y Magalhaes, sf). Una de las finalidades de los estudios en donde se realiza la amplificación de una parte o del total de un gen, es para realizar un alineamiento de secuencias homólogas de nucleótidos o aminoácidos y verificar en donde existen delecciones, inserciones o cambios puntuales de los nucleótidos, que se hayan producido en el proceso de divergencia del ancestro común y que son de utilidad para los análisis filogenéticos. Por otra parte las no coincidencias pueden interpretarse como mutaciones puntuales (sustituciones) y los huecos como *indels*, introducidas en los linajes en el tiempo que transcurrió desde que divergieron (Martínez y González, sf).

Los principales mecanismos para la generación de variabilidad en los organismos fitopatógenos son las mutaciones del cromosoma, que se generan por inserción o delección de fragmentos de ADN o transposones y en oomicetes es el principal factor de variabilidad (Goodwin, 1997 citado por Silvar *et al.*, 2006). La variabilidad también se presenta por el flujo de genes en las poblaciones de manera local o a grandes distancias y la recombinación sexual o asexual. Por ejemplo, se reporta que las posibles fuentes de variación génica de *P. infestans* son: la reproducción sexual, las mutaciones, la recombinación mitótica, la

parasexualidad, la migración y la selección natural (Araya, 2003). Cuando no se tiene un conocimiento claro de la diversidad genética de un patógeno, no se puede explicar claramente porqué algunos métodos de control integrado como la rotación de cultivos y la aplicación de fungicidas no son efectivos para controlar a estos organismos, como sucedió en Michigan, E.U. en donde las pérdidas en los cultivos susceptibles a *P. capsici* continuaban y no se explicaban la causa, ya que no tenían aún conocimiento de lo extenso que era la recombinación sexual y por lo tanto de la variabilidad genética en el patógeno (Hausbeck y Lamour, 2004).

El uso de los marcadores moleculares basados en el ADN son una excelente herramienta para estudios de taxonomía, estimación de relaciones evolutivas y variabilidad genética e identificación de diferentes especies, apoyados con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, utilizada por su alta especificidad y sensibilidad (Rodríguez *et al.*, 2004). Se utiliza el ADN mitocondrial (ADNm) y nuclear (ADNn). El ADNm contiene genes que codifican para enzimas involucradas en la transportación de electrones de la cadena respiratoria, entre las que se encuentran Citocromo Oxidasa I y II, (Cox I y Cox II), NadI, Nad9, rps10, secY. El gen Cox I está aprobado para ser utilizado en la secuencia del código de barras en la huella genética por el Consorcio del Código de Barras para la vida (CBOL), diversos investigadores han utilizado este gen que tiene una longitud aproximada de 640 pares de bases (pb) para estudios filogenéticos de oomicetes como *Phytophthora* spp. (Fernández, 2005; Robideau *et al.*, 2011; Tarqui, 2012). Por otra parte, en el ADNn, las regiones más utilizadas para la identificación de hongos a nivel de especie son la subunidad pequeña del ribosoma (SSU), la subunidad grande (LSU), β -tubulina, enolasa, proteínas de choque térmico (HSP 90), factor de elongación 1α , y la región del espacio intergénico transcrito (ITS) (Tarqui, 2012), esta última fue la región más frecuentemente secuenciada en hongos y es utilizada para estudios de sistemática, filogenia e identificación de cepas a nivel de especie (Begerow *et al.*, 2010 citados por Tarqui, 2012).

La amplificación de estas regiones se ha realizado a través de PCR, el objetivo es amplificar *in vitro* fragmentos específicos de ADN, para detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un organismo y que consiste en una serie de ciclos con cambios de temperatura. Cuando la temperatura se eleva, se separan las cadenas de ADN, el ciclo de temperatura fría

permite que se unan las sondas y la enzima Taq ADN polimerasa reproduce una copia exacta del material de interés. La especificidad dependerá de la temperatura empleada para separar las cadenas de ADN y de los iones divalentes adicionados a la reacción, además de las sondas que están formadas por oligonucleótidos formados por 13-27 nucleótidos. Los productos de la reacción son analizados e identificados por la electroforesis del gel (Torres *et al.*, 2006; Rodríguez y Barrera, 2004). El proceso se lleva a cabo en tres pasos:

- a) Desnaturalización. Separación de las cadenas de ADN al aumentar la temperatura a 94⁰C.
- b) Hibridación. Unión de los oligonucleótidos por complementariedad a la cadena molde de ADN, sucede al reducir la temperatura de 35-60⁰C.
- c) Elongación o extensión. La enzima polimerasa incorpora nucleótidos a la cadena 3' libre de la región en que han hibridado los oligonucleótidos. La temperatura depende de la enzima, si se usa Taq-polimerasa, la temperatura suele ser de 72⁰C.

Diversos investigadores han utilizado la técnica de PCR para la identificación de especies del género *Phytophthora*, así como para estudios filogenéticos. A través de la amplificación de las secuencias ITS del ADN ribosomal (ADNr) y con la finalidad de identificar las relaciones filogenéticas entre 50 especies de este género con otros oomicetes. Cooke *et al.* (2000) utilizaron oligonucleótidos de los ITS, y encontraron 8 clados donde se reclasificaron a las especies del género *Phytophthora*. Lamour *et al.* (2003) así como Olson y Benson (2011), identificaron especies de *Phytophthora* con el uso de los oligonucleótidos ITS6 e ITS4, entre ellas a *P. drechsleri* que infectan plantas de nochebuena. Por otra parte Hwang y Benson (2005) y Díaz-Celaya (2011) utilizaron los oligonucleótidos ITS5 e ITS4 para amplificar los genes 18S ADNr y 28S ADNr para la identificación de diversas especies de patógenos de plantas ornamentales, en donde identificaron entre otros patógenos, a diferentes especies del género *Phytophthora* entre ellos a *P. capsici* y *P. drechsleri*. Yakabe *et al.* (2009) utilizaron también PCR e identificaron 13 especies de *Phytophthora* de aislados obtenidos de plantas ornamentales con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Sin embargo, con la amplificación de la región ITS no se ha podido identificar adecuadamente la relación filogenética entre algunos aislados de patógenos importantes (Schena y Cooke, 2006), por ejemplo *P. nemorosa*, *P. ilicis*, *P. psychrophila* y *P. pseudosyringae* que tienen similar secuencia en la región ITS

(Martín y Tooley, 2003), por lo que este loci no es el más adecuado para la diferenciación entre especies del mismo género como por ejemplo *P. fragarie* y *P. rubi*, por lo que se han utilizado otros genes como 60S ribosomal, enolasa, Tig A, β -tubulina, factor de elongación, Cox I y Cox II, Nad9, Nad I, entre otros (Martin *et al.*, 2012).

La utilización de PCR y de los genes antes señalados han ayudado, además de separar especies muy parecidas entre sí, a encontrar las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Phytophthora*. En el estudio realizado con los genes Cox I, NADH, factor de elongación y β -tubulina se encontró que los grupos taxonómicos clásicos descritos por Waterhouse en 1963 que se basan en características fenotípicas, no reflejan necesariamente una evolución relacionada (Kroon *et al.*, 2004). Asimismo el uso de otros genes como 28S ribosomal, 60S ribosomal, enolasa, Tig A, β -tubulina, factor de elongación, y HSP90 ha dado como resultado que las especies en el género *Phytophthora*, se agrupen en 10 clados en lugar de 6 cuando solamente se consideraban las características morfológicas (Blair *et al.*, 2008). Robideau *et al.* (2011) utilizaron las secuencias generadas con Cox I e ITS para identificar especies del género *Pythium* y *Phytophthora*, encontraron que en algunos casos Cox I fue más discriminativo que ITS a nivel de especie. Con la amplificación de la región en el ADNn que codifica para la enzima enolasa, que está ampliamente conservada en células eucariotas, se observaron polimorfismos en aislados de *P. capsici* en Estados Unidos, lo que contribuyó junto con la amplificación de otros cinco genes a la determinación de cuatro clusters y de la distribución espacio temporal de este patógeno (Quesada-Ocampo *et al.*, 2011). Este gen también fue amplificado junto con otros para determinar las relaciones filogenéticas de diversos aislados del género *Phytophthora* (Blair *et al.*, 2008).

Las técnicas de identificación de patógenos a través de métodos moleculares, tienen ventajas con respecto a la caracterización morfológica, como lo señalan las investigaciones de Rahman *et al.* (2013), ya que reidentificaron patógenos de *Phytophthora* spp. con la amplificación de los genes LSU, ITS y Cox I. La mayor parte de las investigaciones se han realizado con organismos patógenos de cultivos agrícolas, sin embargo, en Estados Unidos de América, en donde los cultivos ornamentales alcanzan ventas de hasta \$17,000 millones de dólares (Jerardo, 2007, citado por Olson *et al.*, 2013), se han realizado diversos estudios para caracterizar a diferentes especies de *Phytophthora* spp. En nuestro país, la horticultura

ornamental, se encuentra sustituyendo a cultivos agrícolas (Hernández *et al.* 2012), por lo que es importante determinar los patógenos que los pueden dañar. Sin embargo, existen pocos reportes como el de Díaz-Celaya (2011) en donde identificó a diversos patógenos de plantas ornamentales a través de características morfológicas y moleculares.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Aislados y extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados de *Phytophthora drechsleri* provenientes de plantas ornamentales PV-27 y PV-47 de *Gerbera* sp. (gerbera), PV-29 y PV-40 de *Gazania rigens* y *Gazania* sp. (gazania), PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) y PV-39 de *Arctotis* sp. (margarita africana). Así como de los aislados de *P. capsici* PV-15, PV-30, PV-33, PV-34, PV-35, PV-36 y PV46 de *Capsicum annuum* (chile ornamental), PV-31 de *Cestrum nocturnum* (huele de noche), PV-41 de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono) y PV-44 de *Solanum oviegerum* (planta de huevo), fue realizada anteriormente por Díaz-Celaya (2011) y se encuentra almacenado en microtubos refrigerados a -20°C en el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Para verificar que la calidad del ADN de los aislados se encontrara en condiciones adecuadas para su uso, se realizó PCR, utilizando los oligonucleótidos ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) con las siguientes condiciones: 4 minutos a 95 °C, 34 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min. Posteriormente, los fragmentos de ADN_r que se amplificaron, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y se visualizaron con luz ultravioleta. Al observarse que la amplificación correspondió con la realizada por Díaz-Celaya (2011), se procedió a utilizar este ADN en los demás análisis.

2.2.2 Amplificación de ADN

Para determinar si existe polimorfismo en los aislados de las dos especies de *Phytophthora*, se realizó la técnica de PCR para amplificar la región 60S ribosomal (Proteína L10) y los genes mitocondriales Cox I y Cox II (Cuadro 9).

Cuadro 9. Oligonucleótidos para la amplificación del ADN de los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* mediante PCR.

Oligonu- cleótidos	Secuencia de oligonucleótidos	Nombre	Referencia
60SL10F	GCTAAGTGTTACCGTTTCCAG	Proteína ribosomal L10	Blair <i>et al.</i> , 2008
60SL10R	ACTTCTTGGAGCCCAGCAC	Proteína ribosomal L10	Blair <i>et al.</i> , 2008
CoxF4N	GTATTTCTTCTTTATTAGGTGC	Citocromo oxidasa I	Kroon <i>et al.</i> , 2004
CoxR4N	CGTGAACCTAATGTTACATATAC	Citocromo oxidasa I	Kroon <i>et al.</i> , 2004
CoxFM35	CAGAACCTTGGCAATTAGG	Citocromo oxidasa II	Martín, 2000
CoxFMPhy- 10b	GCAAAAGCACTAAAAATTAAA TATAA	Citocromo oxidasa II	Martín <i>et. al.</i> , 2004

En el Anexo IV se indican los reactivos, cantidades y condiciones utilizadas para la realización de PCR para cada uno de los genes utilizados, es importante señalar que se realizaron modificaciones en las condiciones de PCR para la amplificación de los genes.

Al terminar la reacción de PCR se retiraron los microtubos del termociclador y se realizó electroforesis en geles de agarosa con los amplicones al 1.5 % en TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio. Se visualizaron las bandas con luz ultravioleta para posteriormente realizar la purificación del ADN de cada uno de los amplicones con el kit Wizard[®] SV Gel y PCR Clean-Up System de Promega y los microtubos conteniendo el ADN purificado, se enviaron a la compañía Macrogen en Seúl, Corea del Sur, para obtener las secuencias. Con estas se generaron las secuencias consenso con los programas PreGap 4 y Gap 4.

2.2.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos

La secuencia consenso de cada uno de los aislados, se comparó con las secuencias que se encuentran en las bases de datos de Phytophthora Database (<http://www.phytophthoradb.org/>) y/o en Barcode of Life Data Systems (<http://www.boldsystems.org/>) para determinar el porcentaje de identidad con secuencias de nucleótidos de especies conocidas.

2.2.4 Polimorfismos en la secuencia de nucleótidos.

Con la finalidad de determinar en qué posición del amplicón se observaban diferencias en la secuencia de los nucleótidos, se utilizó el programa MEGA 6. realizando una alineación de los nucleótidos de los aislados con el programa Clustal W. Se adicionó para cada alineación de cada especie por gen amplificado, la secuencia de un aislado de la base de datos del GenBank con el que los aislados tuvieron mayor porcentaje de similitud para alinear y comparar los codones a través del programa Bioedit 7.1.

2.3 RESULTADOS

2.3.1. Amplificación por PCR

2.3.1.1 Gen 60S ribosomal

Con este gen se obtuvo una amplificación adecuada, el resultado de la electroforesis de las amplificaciones del ADN obtenidas mediante PCR del gen 60S, se observa claramente (Fig. 17).

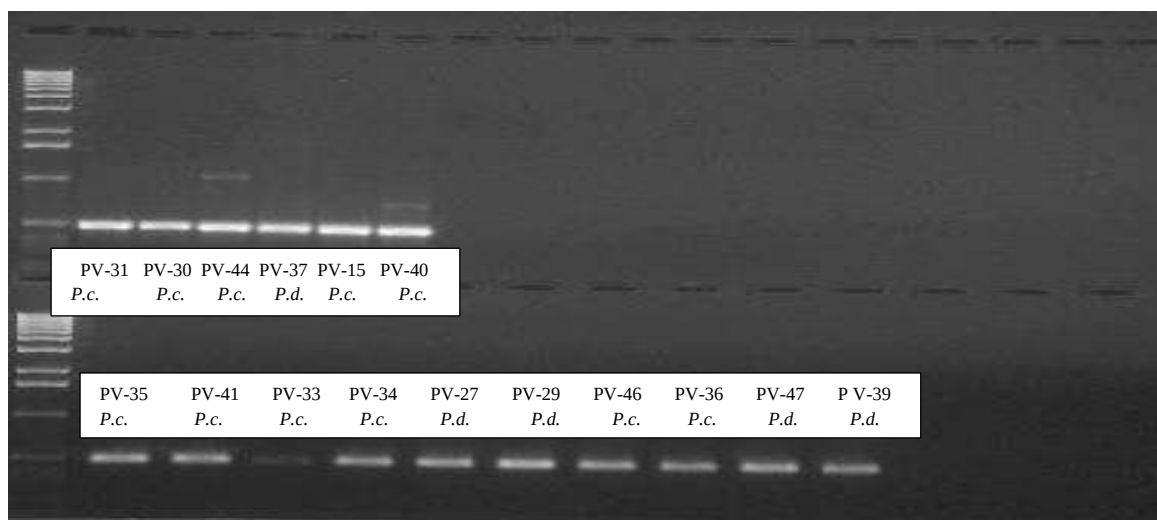


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de *Phytophthora capsici* (P.c.) y *Phytophthora drechsleri* (P.d.) amplificados con el gen 60S ribosomal por PCR.

2.3.1.2 Gen Citocromo oxidasa (Cox I)

Cuando se realizó la amplificación de este gen con las condiciones de PCR señaladas por Kroon *et al.* (2004), no se logró obtener bandas definidas por lo que fue necesario realizar correcciones en la temperatura y en la concentración de los iones de la reacción, con lo cual se obtuvo una adecuada amplificación pero sólo para los aislados de *P. drechsleri*, ya que los aislados de *P. capsici* continuaron generando bandas indefinidas (Fig 18).

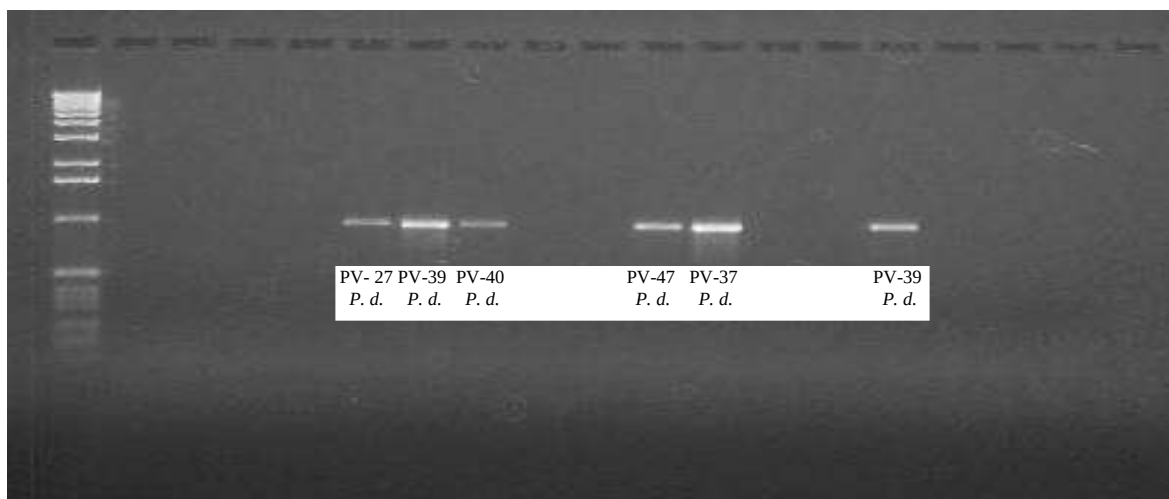


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de *Phytophthora drechsleri* (P.d.) amplificado con el gen Cox I por PCR.

2.3.1.3 Gen Citocromo oxidasa (Cox II)

No fue posible la correcta amplificación de este gen con las condiciones señaladas por Martin (2000) y Martin *et al.* (2004), sin embargo, al realizar modificaciones en la temperatura y la aplicación de 3mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), así como una PCR anidada, se lograron obtener bandas definidas para las dos especies con un peso molecular de 1018pb (Fig.19 y 20).

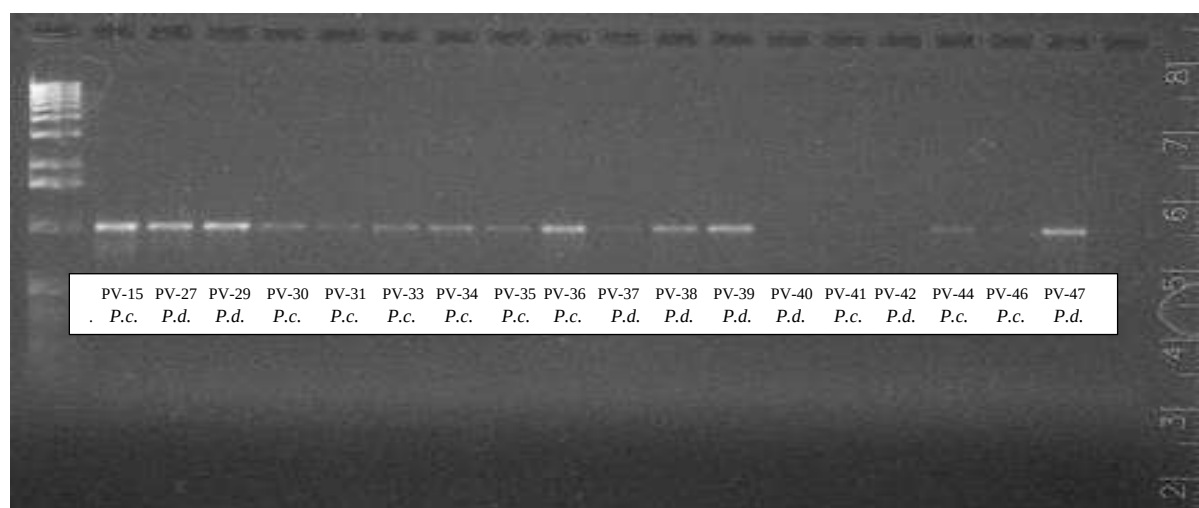


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de *Phytophthora capsici* (P.c.) y *Phytophthora drechsleri* (P.d.) amplificados con el gen Cox II por PCR.

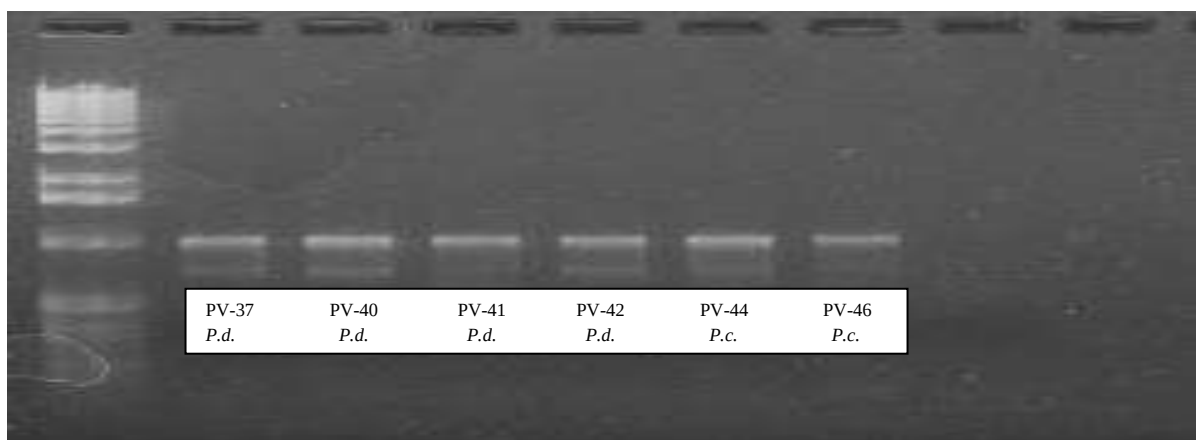


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN de aislados de *Phytophthora capsici* (*P.c.*) y *Phytophthora drechsleri* (*P.d.*) amplificados con el gen Cox II por PCR.

2.3.2 Secuencia consenso

2.3.2.1 Gen 60S ribosomal

Se compararon las secuencias obtenidas del gen 60S ribosomal de los aislados con secuencias depositadas en la base de datos de Phytophthora Database. Diez aislados presentaron identidad con *Phytophthora capsici*, tres de éstos con identidad de 99 (PV-15, PV-30, PV-31) mientras que siete mostraron porcentaje de identidad de 100 (PV-33, PV-34, PV-35, PV-36, PV-41, PV-44 y PV-46) con esta especie (Cuadro 10). Estos aislados también mantienen identidad con otras especies entre las que se encuentran *P. mexicana*, *P. glovera*, *P. sp. "brasiliensis"*, *P. tropicalis*, *P. cryptogea*, *P. citricola* y *P. botryosa*. Se formaron dos grupos de aislados en donde coincide el porcentaje de identidad con otras especies, un grupo formado por los aislados PV-34, PV-35, PV-36 y PV-46 y el otro grupo por los aislados PV-41 y PV-44.

Cuadro 10. Porcentaje de identidad de los aislados de *Phytophthora* analizados utilizando secuencias del gen 60S ribosomal *P. capsici*.

Aislado	Hospedante	Identidad (%)	Especie
PV-15	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	99	<i>P. capsici</i>
PV-30	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	99	<i>P. capsici</i>
PV-31	<i>Cestrum nocturnum</i> (huele de noche)	99	<i>P. capsici</i>
PV-33,PV-34,PV-35,PV-36, PV-46	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	100	<i>P. capsici</i>
PV-41	<i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono)	100	<i>P. capsici</i>
PV-44	<i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo)	100	<i>P. capsici</i>

Un segundo grupo de cuatro aislados analizados presentó identidad del 99 al 100% con *P. drechsleri* (PV-27, PV-37, PV-39 y PV-40), en cambio los aislados PV-29 y PV-47 mostraron identidad desde el 99 al 100% con *P. sp. "kelmania"*, *P. richardie*, *P. drechsleri*, *P. sansomea* y *P. erythroseptica* (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de identidad de los aislados de *Phytophthora* analizados utilizando secuencias del gen 60S ribosomal *P. drechsleri*.

Aislado	Hospedante	Identidad (%)	Especie
PV-27	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-29	<i>Gazania rigens</i> (gazania)	99	<i>P. sp. "kelmania"</i>
PV-37	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-39	<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-40	<i>Gazania</i> sp. (gazania)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-47	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	100	<i>P. sp. "kelmania"</i>

2.3.2.2 Gen Citocromo oxidasa (Cox I)

Se compararon las secuencias del gen Cox I de los aislados con secuencias depositadas en la base de datos Barcode of Life Data Systems. Las amplificaciones por PCR utilizando ADN genómico de los aislados identificados como *P. capsici* resultaron negativas. Por otra parte, se encontró similitud con los resultados para el gen 60S ribosomal, con los mismos cuatro aislados identificados como *P. drechsleri* y dos aislados identificados como *Phytophthora* sp. “*kelfmania*” (Cuadro 12).

Cuadro 12. Porcentaje de identidad de los aislados de *Phytophthora* analizados utilizando secuencias del gen Cox I *P. drechsleri*.

Aislado	Hospedante	Identidad (%)	Especie
PV-27	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	100	<i>P. drechsleri</i>
PV-29	<i>Gazania rigens</i> (gazania)	99	<i>P. sp. “kelfmania”</i>
PV-37	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	100	<i>P. drechsleri</i>
PV-39	<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-40	<i>Gazania</i> sp. (gazania)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-47	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	100	<i>P. sp. “kelfmania”</i>

2.3.2.3 Gen Citocromo oxidasa (Cox II)

Se compararon las secuencias obtenidas del gen Cox II de los aislados con secuencias depositadas en la base de datos de *Phytophthora* Database. Nueve aislados presentaron porcentajes de identidad desde 99 hasta 100% con *Phytophthora capsici*, PV-41 tuvo un porcentaje de 99 con *P. capsici* y de 100% con *P. tropicalis* (Cuadro 13).

Cuadro13. Porcentaje de identidad de los aislados de *Phytophthora* analizados utilizando secuencias del gen Cox II *P. capsici*.

Aislado	Hospedante	Identidad (%)	Especie
PV-15, PV-33, PV-30, PV-34, PV-35	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	100	<i>P. capsici</i>
PV-36 y PV-46	<i>Capsicum annuum</i> (chile ornamental)	99	<i>P. capsici</i>
PV-31	<i>Cestrum nocturnum</i> (huele de noche)	99	<i>P. capsici</i>
PV-41	<i>Epipremnum aureum</i> (planta de teléfono)	100	<i>P. tropicalis</i>
PV-44	<i>Solanum ovigerum</i> (planta de huevo)	100	<i>P. capsici</i>

En los aislados identificados como *P. drechsleri* se observaron porcentajes de identidad de 99, mientras que los aislados identificados como *Phytophthora* sp. “*kelmania*” presentaron porcentajes de identidad del 99 (Cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentaje de identidad de los aislados de *Phytophthora* analizados utilizando secuencias del gen Cox II *P. drechsleri*.

Aislado	Hospedante	Identidad (%)	Especie
PV-27	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-29	<i>Gazania rigens</i> (gazania)	99	<i>P. sp. “kelmania”</i>
PV-37	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (nochebuena)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-39	<i>Arctotis</i> sp. (margarita africana)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-40	<i>Gazania</i> sp. (gazania)	99	<i>P. drechsleri</i>
PV-47	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	99	<i>P. sp. “kelmania”</i>

2.3.3 Polimorfismo en la secuencia de nucleótidos

2.3.3.1 Gen 60S ribosomal

Para los aislados de *P. capsici*, se observó que existe polimorfismo en seis sitios. El mayor número de cambios se presentó en la posición 112. Las secuencias de los aislados que contienen el nucleótido adenina (A), corresponden a los obtenidos de chile ornamental y los que presentan el nucleótido guanina (G) pertenecen a los hospedantes huelle de noche, planta de huevo y teléfono. El aislado PV-31 corresponde a huelle de noche y tiene el nucleótido timina (T) en la posición 337, a diferencia del resto de los aislados presentan el nucleótido citosina (C). El aislado PV-15 muestra un nucleótido T en la posición 389, mientras que el resto de los aislados tienen el nucleótido C (Cuadro 15).

Cuadro 15. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen 60S de aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias					
	1	12	82	112	337	388
PV-15		TTC	CGC	TCA	CAC	CCT
PV-30			CGT	TCA	CAC	CCC
PV-31	T	TAC	CGC	TCG	CAT	CCC
PV-33	T	TAC	CGC	TCA	CAC	CCC
PV-34			CGC	TCA	CAC	CCC
PV-35			CGC	TCA	CAC	CCC
PV-36			CGC	TCA	CAC	CCC
PV-41			CGC	TCG	CAC	CCC
PV-44	T	TAC	CGC	TCG	CAC	CCC
PV-46			CGC	TCA	CAC	CCC
EU079618 ^b	GGC	TAC	CGC	TCA	CAC	CCC

^a Origen de los aislados: PV-15, PV-30, PV-31, PV-33, PV-34, PV-35, PV-36 y PV-46 de *Capsicum annuum* (chile ornamental), PV-31 de *Cestrum nocturnum* (huelle de noche), PV-41 de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono), PV-44 de *Solanum ovigerum* (planta de huevo). ^b Número de accesión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias.

Los aislados de *P. drechsleri* presentaron ambigüedad en seis posiciones, ya que no se determinó con precisión si el nucleótido era C ó T. En general, las secuencias del gen 60S de estos aislados son muy similares (Cuadro 16).

Cuadro 16. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen 60S de aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias					
	54	60	72	221	309	378
PV-27	TGC	GGT	CCG	TTC	GCC	ATC
PV-37	TGY ^c	GGY	CCC	TTC	GCY	ATC
PV-39	TGY	GGT	CCC	TTC	GCC	ATC
PV-40	TGC	GGT	CCG	TTC	GCT	ATC
EU080862 ^b	TGC	GGT	CCC	TWC ^d	GCT	ATT

^a Origen de los aislados: PV-27 de *Gerbera* sp. (gerbera), PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena), PV-39 de *Arctotis* sp. (margarita africana), PV-40 de *Gazania* sp. (gazania). ^b Número de accesión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias.. ^c Y=T ó C. ^d W=A ó T.

Los aislados de *P. sp. "kelmania"* mostraron ambigüedad en una posición, ya que no se determinó con precisión si el nucleótido era C ó T. Al igual que con *P. drechsleri*, estas secuencias son muy similares (Cuadro 17).

Cuadro 17. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen 60S de aislados de *Phytophthora* sp. "*kelmania*" obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias	
	264	
PV-29	CCC	
PV-47	CCY ^c	
EU079605 ^b	CCC	

^a Origen de los aislados: PV-29 de *Gazania rigens* (gazania), PV-47 de *Gerbera* sp. (gerbera). ^b Número de accesión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias. ^c Y=T ó C.

2.3.3.2 Gen Citocromo Oxidasa (Cox I)

No se logró obtener la amplificación del gen Cox I de los aislados de *P. capsici*. Los aislados de *P. drechsleri* presentaron seis polimorfismos (Cuadro 18).

Cuadro 18. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox I de aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias					
	23	385	397	742	826	847
PV-27	-	TAT	ATA	CTG	CAG	CTG
PV-37	T	TAT	ATA	CTG	CAG	CTG
PV-39	T	TAT	ATA	CTG	CAG	CTG
PV-40	T	TTT	ACA	CCG	CCG	CCG
AY659597.1 ^b	-	TAT	ATA	CTG	CAG	CTG

^a Origen de los aislados: PV-27 de *Gerbera* sp. (gerbera), PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena), PV-39 de *Arctotis* sp. (margarita africana), PV-40 de *Gazania* sp. (gazania). ^b Número de accesoión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias. ^c Y=T ó C. ^d W=A ó T.

Los aislados de *Phytophthora* sp. “*kelfmania*” mostraron siete posiciones con diferentes nucleótidos (Cuadro 19).

Cuadro 19. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox I de aislados de *Phytophthora* sp. “*kelfmania*” obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias						
	15	128	146	233	503	578	692
PV-29	T	T	AGG	ATT	GTG	ACC	GGA
PV-47	A	-	CGG	GTT	GCG	ACT	GGT
HQ455745.1 ^b							

^a Origen de los aislados: PV-29 de *Gazania rigens* (gazania), PV-47 de *Gerbera* sp. (gerbera). ^b Número de accesoión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias.

2.3.3.3 Gen Citocromo Oxidasa (Cox II)

Los aislados de *P. capsici* presentaron seis sitios polimórficos. El aislado PV-41 presentó el mayor número de polimorfismos (Cuadro 20).

Cuadro 20. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox II de aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias					
	32	173	266	353	545	547
PV-15	TGT	TGG	CGA	AGA	AGG	TCG
PV-30	TGT	TGG	CGA	AGA	TGG	CCG
PV-31	TGT	TGG	CGA	GGA	TGG	CCG
PV-33	TGT	TGG	CGA	AGA	AGG	TCG
PV-34	TGT	TGG	CGA	AGA	TGG	CCG
PV-35	TGT	TGG	CGA	AGA	TGG	CCG
PV-36	TGT	TGG	CGA	AGA	TGG	CCG
PV-41	AGT	CGG	TGA	AGA	AGG	TCG
PV-44	TGT	TGG	CGA	AGA	AGG	TCG
PV-46	TGT	TGG	CGA	AGA	TGG	CCG
EU079618 ^b	TGT	TGG	CGA	AGA	TGG	CCG

^a Origen de los aislados: PV-15, PV-30, PV-31, PV-33, PV-34, PV-35, PV-36 y PV-46 de *Capsicum annuum* (chile ornamental), PV-31 de *Cestrum nocturnum* (huele de noche), PV-41 de *Epipremnum aureum* (planta de teléfono), PV-44 de *Solanum ovigerum* (planta de huevo). ^b Número de accesión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias.

El aislado PV-40 de *P. drechsleri* fue el único en el que se detectaron polimorfismos, T por C en dos posiciones y G en lugar de T en una posición (Cuadro 21).

Cuadro 21. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox II de aislados de *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias		
	58	150	335
PV27	CCC	TGC	CTA
PV37	CCC	TGC	CTA
PV39	CCC	TGC	CTA
PV40	TCC	TGT	CGA
HQ455745.1 ^b	TCC	TAT	CTA

^a Origen de los aislados: PV-27 de *Gerbera* sp. (gerbera), PV-37 de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena), PV-39 de *Arctotis* sp. (margarita africana), PV-40 de *Gazania* sp. (gazania). ^b Número de accesión GenBank del aislado proveniente de gerbera.

Los aislados de *Phytophthora* sp. “*kelmania*” presentaron siete sitios polimórficos. En la posición 589 no se determinó si la base era A ó C (Cuadro 21).

Cuadro 22. Polimorfismos en la secuencias amplificadas del gen Cox II de aislados de *Phytophthora* sp. “*kelmania*” obtenidos de plantas ornamentales.

Aislado ^a	Número de posición en las secuencias						
	66	151	174	243	342	552	589.
PV29	CAC	AAA	GTC	GTT	TCA	CCA	AAA
PV47	CAT	AAA	GTA	GTA	TCC	CCT	RAA ^c
GU222052 ^b	CAT	GAA	GTA	GTA	TCC	CCT	GAA

^a Origen de los aislados: PV-29 de *Gazania rigens* (gazania), PV-47 de *Gerbera* sp. (gerbera). ^b Número de accesión GenBank del aislado con el que se realizó la alineación de las secuencias. ^c R=T ó C.

2.4 DISCUSION

En este trabajo se determinó la variabilidad entre los aislados de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales. Para realizar lo anterior se obtuvieron las secuencias de los genes 60S ribosomal, así como de dos genes mitocondriales Cox I y Cox II. Este estudio permitió complementar los resultados de variabilidad obtenidos a través de los análisis de virulencia, rango de hospedantes, tipo de compatibilidad y resistencia a mefenoxam (Capítulo I).

Phytophthora capsici

Las secuencias obtenidas con el gen 60S presentaron similitudes de 99 al 100% con *P. capsici*, lo que coincide con lo reportado por Díaz-Celaya (2011) quien utilizó la región ITS para identificar a los mismos aislados. Blair *et al.* (2008) señalan que este gen fue amplificado de forma consistente, pero que provee poca resolución filogenética entre especies.

En los aislados utilizados en este trabajo no se logró obtener la amplificación de la secuencia del gen Cox I con los oligonucleótidos F4N y R4N. Martin y Tooley (2003) tampoco lograron amplificar este gen utilizando el oligonucleótido Fm77, pero sí cuando usaron los oligonucleótidos Fm83 y Fm85. Existen diferentes razones por las que la amplificación de este gen se dificulta. Schena y Cooke (2006) indican que al utilizar cuatro regiones intergénicas mitocondriales (mt-IGS) para la caracterización de especies de *Phytophthora*, algunas se amplifican adecuadamente y otras no, por lo que requirieron modificar las condiciones de PCR como la concentración de $MgCl_2$ y la temperatura. Por otra parte, Martin *et al.* (2012) señalan la falta de amplificación de algunos genes puede ser debido al alto número de mutaciones alrededor de los sitios en que se une el oligonucleótido, así como por la heterocigosidad de los aislados.

Para amplificar adecuadamente Cox II, fue necesario realizar cambios en las condiciones de PCR y la concentración de $MgCl_2$, así como realizar una PCR anidada. Kroon *et al.* (2012)

señalan que los intrones tienen un alto nivel de polimorfismo comparado con los exones; sin embargo, en algunos genes que se utilizan para caracterizar a especies del género *Phytophthora*, faltan intrones y por lo tanto, es necesario tener largos tramos de exones para tener una buena resolución. Lo antes señalado coincide con lo reportado por Schena y Cooke (2006) quienes mencionan que los intrones y porciones intergénicas de los genes nucleares y mitocondriales pueden dar mayor variabilidad y por lo tanto ser una opción para la identificación de especie. El análisis del Blast de las secuencias mostró similitud de 99 al 100% de nueve aislados con *P. capsici*. Los aislados PV-15 de *Capsicum annuum* (chile ornamental), PV-31 de *Cestrum nocturnum* (huele de noche) y PV-44 de *Solanum ovigerum* (planta de huevo) presentaron polimorfismos que generan diferentes aminoácidos (datos no mostrados).

Por otra parte con el gen Cox II el aislado PV-41 obtenido de planta de teléfono (*Epipremnum aureum*) mostró un 100% de identidad con *P. tropicalis*. Estos resultados coinciden con las investigaciones realizadas por Orliwoski, *et al.* (2006) quienes aislaron a esta especie del mismo hospedante. Agaraki y Uchida, (2001), citados por Bowers *et al.*, (2007) analizaron 100 aislados de *P. capsici*. Algunos de estos aislados presentaban clamidosporas y eran poco o no patogénicos en Chile, por lo cual los designaron como *P. tropicalis*. Las características de este aislado como son presencia de clamidosporas, no patogenicidad en Chile y alta similitud de la secuencia Cox II indican que esta especie es *P. tropicalis*. Sin embargo, el análisis Blast de 60S e ITS (Díaz-Celaya, 2011) mostraron alta similitud con secuencias de aislados de *P. capsici*. Por lo anteriormente señalado, consideramos a este aislado intermedio entre *P. tropicalis* y *P. capsici*, esto coincide con lo reportado por Quesada-Ocampo *et. al.*, (2011) que mencionan la existencia de genotipos intermedios entre estas dos especies.

Por otra parte, este aislado presentó durante la alineación de nucleótidos, codones que codificaron para aminoácidos diferentes a los del resto de los aislados (datos no mostrados).

Phytophthora drechsleri

En la amplificación con Cox I, Cox II y 60S, se encontró que los aislados PV-27 de gerbera (*Gerbera* sp.), PV-37 de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), PV-39 de margarita africana (*Arctotis* sp.) y PV-40 de gazania (*Gazania* sp.), tuvieron porcentajes de identidad desde el 99 al 100% con *P. drechsleri*. Estos datos coinciden con los resultados de Díaz-Celaya (2011) quien identificó a éstos aislados como *P. drechsleri* con la región ITS. Sin embargo, los aislados PV-29 de gazania y PV-47 de gerbera, mostraron 99 y 100% de similitud respectivamente con *Phytophthora* sp. “*kelmania*”, a diferencia de lo determinado por Díaz-Celaya (2011) para la región ITS, quien los identificó como *P. drechsleri*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rahman *et al.* (2013) quienes identificaron en Japón aislados como *P. drechsleri* a través de características morfológicas; sin embargo, al amplificar los genes LSU, Cox I e ITS se observó 100% de identidad con *P. niederhauserii*.

En la actualidad es común encontrar que con características morfológicas y técnicas moleculares se reconozcan nuevas especies que antes se consideraban como complejos de especies. Hong *et al.* (2008) detectaron un complejo de tres especies en aislados de *P. drechsleri* (I, II y III), obtenidos en el agua de riego de ornamentales. Los autores denominaron provisionalmente a la especie I como *P. irrigata* y la especie II como *P. hydrophatica*.

Los resultados obtenidos con 60S difieren con los de Robideau *et al.* (2011). Estos autores indican que la amplificación con LSU carece de suficiente exactitud para separar oomicetes a nivel de especie y que es mejor situarlo para género y familia. Un estudio realizado por Rahman *et al.* (2013) también muestran diferencias con nuestros resultados, ya que señalan que al amplificar LSU no se separaron dos aislados de *P. drechsleri* de *Phytophthora* spp., lo que sí lograron con secuencias del gen Cox I.

En los alineamientos de las secuencias de los aislados de *P. drechsleri* se observaron seis, seis y tres cambios de posición de nucleótidos con 60S, Cox I y Cox II respectivamente. Los polimorfismos observados en el gen 60S y Cox II no resultan en cambios en la codificación de aminoácidos en ningún aislado (datos no mostrados). Mientras que los polimorfismos observados con Cox I si presentaron cambios (datos no mostrados).

Phytophthora sp. “*kelmania*”

En los aislados de esta especie se observaron polimorfismos con los tres genes amplificados; sin embargo, no se encontraron cambios en la codificación de aminoácidos (datos no mostrados). Este polimorfismo se detecta por primera vez ya que no existe información de esta especie que está en proceso de descripción.

2.5 CONCLUSIONES

Análisis Blast de las secuencias de los genes 60S, Cox I, Cox II, identificó a los aislados PV-29 (gazania) y PV-47 (gerbera), como *Phytophthora* sp “*kelmania*”. Los cuales anteriormente habían sido reportados como *Phytophthora drechsleri*.

El aislado PV-41 presentó características genéticas y morfológicas intermedias entre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora tropicalis*.

La presencia de polimorfismos en los aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* corroboran que existe variabilidad genética dentro de la especie.

2.6 LITERATURA CITADA

Araya, C.M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatologia Brasileira* 28:221-228.

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.

Bowers, J.H., Martin, F.N., Tooley, P.W., Luz, E.D.M.N. 2007. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 97:492-503.

Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan J. M., Wagels, G., and Brasier C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17-32.

Checa, C.M.A. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 20:213-221.

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, Morelia, Mich, México. 82 p.

Fernández, D.E., 2005. Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/795/01.TESIS_EFD_INTRODUCCION.pdf;jsessionid=56663E84D85762E15288BA51E67C50CE.tdx2?sequence=2 (Consultada junio 2012).

González-Chavira M.M., Simpson, W.J. 2008. Diversidad genética en hongos (origen y análisis). *In*: Martínez, S. J.P., Martínez, E. (eds) Tópicos selectos de fitopatología: genética molecular. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Unidad Irapuato, Guanajuato, México. p. 4-23.

Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops; Research, progress and management challenges. *Plant Disease* 88:1292-1303.

Hernández, M-F., Licona, V.A.L., Pérez, P.E., Cisneros, S.V.M., Díaz, C.S. 2012. Diversificación productiva café-plantas ornamentales en La Sidra, Atzacan, Veracruz. *Revista de Geografía Agrícola* 48:39-50.

Hong, Ch., Richardson, P.A., Kong, P. 2008. Pathogenicity to ornamental plants of some existing species and new taxon of *Phytophthora* from irrigation water. *Plant Disease* 92:1201-1207.

Hwang, J., Benson, D.M. 2005. Identification mefenoxam sensitivity and compatibility type of *Phytophthora* spp attacking floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease* 89:185-190.

Kroon, L.P.N.M., Bakker, F.T., Van den Bosch, G.B.M., Bonants, P.J.M., Flier, W.G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41:766-782.

Lamour, K.H., Daughtrey, M.L., Benson, D.M., Hwang, J., Hausbeck, M.K. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Disease* 87:854-858.

Li, P., Cao, S., Dai, Y.L., Li, X.L., Xu, D.F., Guo, M., Pan, Y.M., Gao, Z.M. 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* (Pythiaceae) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. *Genetic Molecular Research* 11:4285-4296.

McDonald, B.A., Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.

Martin, F.N. y 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.

Martin, F.N., Abad, G.Z., Balci, Y., Ivors, K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease* 96:1080-1102.

Martínez, L.A., González, T.A. s.f. Aplicaciones de la bioinformática en la elaboración de filogenias moleculares. Disponible en: <http://www.udc.es/grupos/gibe/uploads/gibe/andres%20ana/filogenias.pdf> (Consultada marzo 2014).

Olson, H.A., Benson, D.M. 2011. Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 95:1013-1020.

Olson, H.A., Ivors, K.L., Steddom, K.C., Williams-Woodward, J.L., Mmbaga, M.T., Benson, D.M., Hong, C.X. 2013. Diversity and mefenoxam sensitivity of *Phytophthora* spp. associated with the ornamental horticulture industry in the southeastern United States. Plant Disease 97:86-92.

Orlikowski, L.B., Tzrewik, A., Wiejacha, K., Szkuta, G. 2006. *Phytophthora tropicalis* a new pathogen of ornamental plants in Poland. Journal of Plant Protection Research 46:103-109.

Pfening, L.H., Magalhaes de Abreu, L. s.f. Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas In: Manual de Biología de suelos tropicales. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/667/cap8.pdf> (Consultada marzo 2014)

Quesada-Ocampo, L.M., Granke, L.L., Hausbeck, M.K., 2011. Temporal genetic structure of *Phytophthora capsici* populations from a creek used for irrigation in Michigan. Plant Disease 95:1358-1369.

Rahman, M.Z., Uematsu, S., Coffey, M.D., Uzuhashi, S., Suga, H., Kageyama, K. 2013. Re-evaluation of Japanese *Phytophthora* isolates based on molecular phylogenetic analyses. Mycoscience 1-14.

Robideau, G.P., De Cook, A.W., Coffey, M.D., Shermann, V., Browwer, H. Bala, K., Chitty, D.W., Désalveniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, Ch., Küper, F.C., Rintoul, T., Sels, E., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B., Lévesque, C.A. 2011. ADN barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources 11:1002-1011.

Rodríguez, S.I.P., Barrera, S.H.A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia (UANL)* 3:323-335.

Rodríguez, A., B. Xoconostle, B., Valdés, M. 2004. Ecología molecular de hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3: 267-278.

Schena, L., Cooke, D.E.L., 2006. Assessing the potencial of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* 67:70-85.

Silvar, C., Merino, F., Díaz, J. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in northwest Spain: Analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease* 90:1135-1142.

Tarqui C.N.I., 2012. Implementación de un sistema de código de barras para la sistematización del cepario de hongos del laboratorio de biotecnología industrial. Avances y perspectivas del código de barras de hongos. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México. 82 p.

Torres, P.I., González-Chavira, M.M., González, G.R.G. 2006. Las herramientas biotecnológicas para el diagnóstico de enfermedades de las plantas y para su mejoramiento genético. Disponible en: http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/1038967/22_c18.pdf . (Consultada marzo 2013).

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: 883-890.

DISCUSIÓN GENERAL

La horticultura ornamental es un sector productivo de gran importancia en nuestro país, los principales estados productores son el Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Michoacán y Puebla (Tecpan, 2011). En el estado de Michoacán dentro de los principales cultivos se encuentra la nochebuena con una producción en toneladas de 3,111,900 plantas (SIAP, 2013). La producción de ornamentales comprende siete líneas: planta de flor, césped, palmas, nochebuenas, árboles, orquídeas y las flores de corte (Tecpan, 2011). Los sistemas de producción se realizan en campo, en viveros y en invernaderos (Benitez *et al.*, 2002). La producción debe estar orientada a producir plantas de calidad, es decir, sanas y vigorosas (Nicolas y Roche-Hamon, 1988, citados por Benítez *et al.*, 2002); sin embargo, existen diferentes aspectos que demeritan la calidad, entre los que destacan las enfermedades.

Díaz-Celaya (2011) reportó la presencia de patógenos como *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri*, en diferentes especies de ornamentales de viveros en México. Sin embargo, se desconoce si existe variabilidad en estos aislados, como la que se ha reportado en Estados Unidos de América para estas especies de *Phytophthora* (Lamour *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2011; Olson y Benson 2013; Olson *et al.*, 2013). Por lo anterior, se planteó el presente estudio para determinar la diversidad de aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* utilizando marcadores como el tipo de compatibilidad, sensibilidad a mefenoxam *in vitro*, virulencia y agresividad. Asimismo se determinó el rango de hospedantes de los aislados y si existía polimorfismo en genes nucleares y mitocondriales mediante PCR.

El mefenoxam es uno de los fungicidas más utilizados en el manejo de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* spp. en ornamentales en Estados Unidos de América, entre las que se encuentran las ocasionadas por *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* (Hu *et al.*, 2008). Estudios sobre resistencia a fungicidas son indispensables para determinar si se pueden utilizar en programas de manejo integrado de estos patógenos. Se ha reportado que algunos aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* provenientes de ornamentales, presentan resistencia a este producto (Lamour *et al.* 2003; Olson y Benson 2011; Olson *et al.* 2011).

Los aislados analizados en este trabajo presentaron sensibilidad a mefenoxam, por lo cual este fungicida puede ser utilizado como parte del manejo integrado de estos patógenos.

En este estudio se detectó variabilidad en el rango de hospedantes entre los aislados analizados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri*. Algunos de los aislados presentaron la capacidad de infectar otras especies ornamentales así como a cultivos agrícolas, lo cual coincide con otros estudios (Hong *et al.*, 2008; Orlikowski *et al.*, 2006). La importancia de conocer el rango de hospedantes radica en que se puede recomendar a los productores, el evitar tener plantas susceptibles en la misma área. Otra estrategia de control recomendable es la utilización de plantas como portainjertos, como las plantas de nochebuena variedad Valenciana que no mostraron síntomas durante la inoculación de *P. drechsleri* a la raíz. Galindo-García *et al.* (2012) señalan que no se ha detectado a especies de *Phytophthora* infectando a esta planta en el estado de Morelos.

La utilización del análisis Blast con secuencias de varios genes, fue útil para confirmar la identidad de algunos aislados y reubicar dentro de otra especie a otros aislados, los cuales habían sido identificados utilizando secuencias de la región ITS (Díaz-Celaya, 2000). Así, se determinó que los aislados PV-29 de gazania y PV-47 de gerbera, presentaron mayor porcentaje de similitud con *Phytophthora* sp. “*kelmania*” que con *Phytophthora drechsleri*. Asimismo, el aislado PV-41 de planta de teléfono se determinó como una especie intermedia entre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora tropicalis*. Lo anterior confirma que para una correcta identificación es necesario utilizar más de un gen (Kupczok *et al.* 2010; Martin *et al.* 2012).

Los análisis de tipo de compatibilidad, resistencia a mefenoxam, severidad de síntomas y rango de hospedantes, así como la detección de polimorfismos en las secuencias de los genes 60S, Cox I y Cox II, permitió determinar la variabilidad que existe en aislados de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* obtenidos de plantas ornamentales con síntomas de marchitez. Los resultados de esta investigación ayudarán a sugerir mejores estrategias en el control de estos patógenos en cultivos de plantas ornamentales.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

La horticultura ornamental está teniendo cada vez más auge en el campo agrícola mexicano, pero aún tiene mucho potencial de desarrollo. Un ejemplo en donde este sector productivo se está desarrollando es el estado de Veracruz, en donde ha crecido en tal magnitud que ya se considera una actividad agrícola más importante que el cultivo de caña de azúcar y la ganadería y en donde la producción de ornamentales se ha convertido en una actividad tan rentable que ha desplazado al cultivo de café. Existen viveros ornamentales en donde antes se cultivaba café que ocupan hasta el 63% de la superficie anteriormente destinada a este cultivo.

Siendo Michoacán un estado de gran importancia agrícola, el tener conocimiento del rango de hospedantes de un patógeno tan destructivo como *Phytophthora* es imprescindible ya que pueden infectarse diversos hospedantes de un vivero. Asimismo, debido a que se detectó que *P. capsici* proveniente de plantas ornamentales fue capaz de infectar a chile serrano, esto es indicativo de que se puede transmitir de plantas ornamentales a plantas cultivadas, lo que representa un gran riesgo para otros cultivos que pudieran ser susceptibles.

Por otra parte, se considera que la variedad Valenciana de nochebuena, presenta características adecuadas para ser utilizada como portainjerto para variedades susceptibles a *P. drechsleri*, lo que podría ser una parte del manejo integrado de enfermedades causadas por *Phytophthora* en esta ornamental. Se sugiere que se realicen estudios para confirmar esta resistencia y realizar injertos con otras variedades de nochebuena en las que se ha detectado *Phytophthora*.

En este estudio se determinó que al ser los aislados susceptibles al fungicida mefenoxam, es adecuado utilizar este producto como parte del manejo integrado de estos patógenos siempre y cuando la rentabilidad del cultivo de las plantas ornamentales así lo permita.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se demuestra que deben usarse herramientas moleculares así como estudios de virulencia, rango de hospedantes, tipo de

compatibilidad y resistencia a mefenoxam, ya que se complementan y servirán para sugerir al agricultor como llevar a cabo un manejo adecuado.

LITERATURA COMPLEMENTARIA

Benitez, G., Equihua, E., Pulido-Salas, M.T. 2002. Diagnóstico de la situación de los viveros oficiales de Veracruz y su papel para apoyar programas de reforestación y restauración. *Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. (1):5-12.

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, Morelia, Mich, México. 82 p.

Galindo-García, D.V., Alia-Tejacal, I. Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M.T., Canul-Ku, J., Sainz Aispuro, M.J. 2012. Producción de nochebuena de sol en Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (4):751-763.

Hong, Ch., Richardson, P.A., Kong, P. 2008. Pathogenicity to ornamental plants of some existing species and new taxon of *Phytophthora* from irrigation water. *Plant Disease* 92:1201-1207.

Hu, J.H., Hong, C.X., Stromberg, E.L., Moorman, G. 2008. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* 57:728-736.

Kupczok, A., Schmidt, H.A., Haeser V. A. 2010. Accuracy of phylogeny reconstruction methods combining overlapping gene data sets. *Algorithms for Molecular Biology* 5:1-17.

Lamour, K.H., Daughtrey, M.L., Benson, D.M., Hwang, J., Hausbeck, M.K. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Disease* 87:854-858.

Olson, H.A., Benson, D.M. 2011. Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease* 95:1013-1020.

Olson, H.A., Ivors, K.L., Steddom, K.C., Williams-Woodward, J.L., Mmbaga, M.T., Benson, D.M., Hong, C.X. 2013. Diversity and mefenoxam sensitivity of *Phytophthora* spp. associated with the ornamental horticulture industry in the southeastern United States. Plant Disease 97:86-92.

Olson, H.A., Benson, D.M. 2013. Host specificity and variations in aggressiveness of North Carolina isolates of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* in greenhouse ornamental plants. Plant Disease 97:74-80.

Orlikowski, L.B., Tzrewik, A., Wiejacha, K., Szkuta, G. 2006. *Phytophthora tropicalis* a new pathogen of ornamental plants in Poland. Journal of Plant Protection Research 46:103-109.

SIAP 2014.
www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351.
(Consultada Mayo 2014).

Tecpan, M.E. 2011. Propuesta de comercialización de plantas ornamentales en la Delegación Xochimilco. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. D.F., México p 95. Disponible en: <http://www.virtual.sepi.upiicsa.ipn.mx/tesis/1309388600696tesiserick.pdf> (Consultada agosto 2014)

ANEXOS

- ANEXO I Medios de cultivo**
- ANEXO II Prueba Luria-Bertoni**
- ANEXO I Medios de cultivo**
- ANEXO III Aislamiento de tejido vegetal**
- ANEXO IV Condiciones de PCR**
- ANEXO V Secuencia del amplicón obtenido con el gen 60S**
- ANEXO VI Secuencia del amplicón obtenido con el gen Cox I**
- ANEXO VII Secuencia del amplicón obtenido con el gen Cox II**

ANEXO I Medios de cultivo

Cantidades para preparar 1 litro de medio de cultivo

- **Agar harina de maíz (AHM)**

17 g de agar harina de maíz

1000 mL de agua destilada

Mezclar y esterilizar 20 minutos a 121 °C

- **Agar-V8 (AV8)**

20 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

Mezclar y esterilizar 20 minutos a 121 °C

- **Agar-harina de maíz selectivo (NARPH)**

1 L de medio de agar harina de maíz estéril

2.5 mL de cada uno de los siguientes fungicidas y antibióticos:

Natamicina (0.02 g L^{-1}) [(Delvocid Instant- 50 % natamicina, 50 % lactosa)]

Ampicilina (0.27 g L^{-1})

Rifampicina (0.01 g L^{-1})

Pentacloronitrobenzeno o PCNB (0.10 g L^{-1})

Himexazol (0.075 g L^{-1})

Al finalizar y vaciar en cajas Petri, se envuelve el medio en papel aluminio para evitar la degradación de la rifampicina que es sensible a la luz.

ANEXO II Prueba Luria-Bertoni

- **Preparación de medio.**

20 g de agar

1 L de agua destilada.

Agregar 2 mL a un tubo de ensaye.

Esterilizar a 121°C por 20 minutos.

Enfriar y almacenar en refrigeración hasta su utilización.

- **Elaboración de la prueba**

Cortar tres cubos del medio de cultivo con micelio de aproximadamente 0.5 cm.

Agregar al tubo de ensaye conteniendo el medio Luria-Bertoni, mantener a temperatura ambiente.

Revisar después de 24-48 hrs.

Si se observa turbio el medio es positivo, es decir está contaminado con bacterias.

ANEXO III Aislamiento de tejido vegetal

Realizar con un bisturí estéril cortes pequeños (5 x 5 mm) del área del tejido con síntomas, considerar que el corte debe tener parte de tejido enfermo y parte de tejido sano.

Lavar con agua de la llave y enjuagar con agua destilada estéril.

Introducir los cortes en hipoclorito de sodio al 10% (Clorox®) durante 30 segundos. Este paso se puede obviar ya que algunas especies de *Phytophthora* son sensibles al cloro.

Enjuagar con agua destilada estéril y secar con papel estéril.

Colocar los cortes en medio selectivo de agar harina de maíz (NARPH) e incubar a temperatura ambiente durante 72 horas.

ANEXO IV Condiciones de PCR

Loci:

Gen 60S (Proteína ribosomal L10)

Oligonucleótidos (Blair *et al.*, 2008):

60SL10F CTAAGTGTTACCGTTTCCAG

60SL10R ACTTCTTGGAGCCCAGCAC

Mezcla (Reacción final de 25µl):

60SL10F 0.125µl

60SL10R 0.125µl

Master Mix Promega

Go Taq® Hot Start 12.5 µl

Agua 7.25 µl

ADN 5.0 µl

Programa del Termociclador:

(condiciones diferentes a las de la referencia)

2 min 95°C

34 ciclos

1 min 95°C

1 min 55°C

2 min 72°C

Extensión final 10 min 72°C

Loci:

Gen Cox I (Citocromo oxidasa I)

Oligonucleótidos (Kroon *et al.*, 2004):

CoxF4N TATTTCTTCTTTATTAGGTGC

CoxR4N CGTGAACATAATGTTACATATAC

Mezcla (Reacción final de 25µl):

CoxF4N 0.125µl

CoxR4N 0.125µl

Master Mix Promega

Go Taq® Hot Start 12.5 µl

Agua 7.25 µl

ADN 5.0 µl

Programa del Termociclador:

(condiciones diferentes a las de la referencia)

2 min 94°C

30 ciclos

30 s 94°C

30 s 52°C

60 s 72°C

Extensión final 5 min 72°C

Loci:

Gen Cox II (Citocromo oxidasa II)

Oligonucleótidos (Martin, 2000 y Martin *et al.*, 2004):

CoxFM35 CAGAACCTTGGCAATTAGG

CoxFMPhy-10b CTTCTTGGAGCCCAGCAC

Con las condiciones de la mezcla que se venía elaborando y las temperaturas de la referencia, se formaron bandas inespecíficas para todos los aislados por lo que se cambiaron condiciones de la mezcla y de temperatura en el Termociclador.

Mezcla (Reacción final de 25µl):

Programa del Termociclador:

CoxFM35	0.125µl	2 min 95°C
CoxFMPhy-10b	0.125µl	30 ciclos
Master Mix Promega		1 min 94°C
Go Taq® Hot Start	12.5 µl	1 min 55°C
Glicerol 2%	1.0 µl	1.5 min 72°C
MgCl ₂ 3mM	0.75 µl	Extensión final 5 min 72°C
Agua	5.5 µl	
ADN	5.0 µl	

No se logró la adecuada amplificación de PV-37, PV-40, PV-41, PV-44 y PV46 por lo que se realizó PCR anidada.

Oligonucleótidos (Cox I):

CoxFM35F CAGAACCTTGGCAATTAGG

CoxFM78R ACTTCTTGGAGCCCAGCAC

Mezcla (Reacción final de 25µl):

Oligonucleótidos:

FM35F 0.125µl

FM78R 0.125µl

Master Mix Promega

Go Taq® Hot Start 12.5 µl

Glicerol 2% 1.0 µl

MgCl₂ 3mM 0.75 µl

Agua 5.5 µl

ADN 5.0 µl

Programa del Termociclador:

2 min 95°C

30 ciclos

1 min 94°C

1 min 55°C

30 seg 72°C

Extensión final 5 min 72°C

ANEXO V Secuencia del amplicón obtenido con el gen 60S

Aislados* de *Phytophthora capsici*

PV-46.60S	-----	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-44.60S	T GCT AAG TGT TAC	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-41.60S	-----	TAC	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC
PV-36.60S	-----	GT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-35.60S	-----	TAC	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC
PV-34.60S	-----	GT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-33.60S	T GCT AAG TGT TAC	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-31.60S	T GCT AAG TGT TAC	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-30.60S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC	
PV-15.60S	-----	TTC	CGT	TTC	CAG	AAC	AAG	AAG	CCG	TTC	ATT	AAG	TCG	CGC	TTC	TGC	CGT	GGT	GTG	CCC	GAC
PV-46.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-44.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCG	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-41.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCG	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-36.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-35.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-34.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-33.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-31.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCG	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-30.60S-	CCG AAG ATC CGT	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-15.60S	CCG AAG ATC CGC	ATC	TAC	GAT	GTC	GGT	AAC	AAG	AAG	GCT	TCA	GTG	GAC	GCC	TTC	CCC	TTC	GTT	GCT	CAC	T
PV-46.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-44.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-41.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-36.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-35.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-34.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-33.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-31.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-30.60S-	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				
PV-15.60S	TG GTG TCC GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCC TCG GAG GCT CTT GAG GCT GCC CGT ATT GCT GCT AAC CGT TA																				

PV-46.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-44.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-41.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-36.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-35.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-34.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-33.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-31.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-30.60S-	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-15.60S	C CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT
PV-46.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-44.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-41.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-36.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-35.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-34.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-33.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-31.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAT GCT TAC GGT AAG C
PV-30.60S-	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-15.60S	ATT AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCC GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACC GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG C
PV-46.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-44.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-41.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-36.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-35.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-34.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-33.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-31.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-30.60S-	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-15.60S	CC GCC GGT GTG GCT GCC CGT GTG GCC ATT GGC CAG CCT ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC TCG TTC GG
PV-46.60S	C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG G-----
PV-44.60S	C CCT TCG CGT GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG G-----
PV-41.60S	C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TC -
PV-36.60S	C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG G -----
PV-35.60S	C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GG ----
PV-34.60S	C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG G -----

PV-33. 60S C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TC -
PV-31. 60S C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG G -----
PV-30. 60S C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TC -
PV-15. 60S C CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG G -----

*Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión EU079618 del GenBank

Aislados** de *Phytophthora drechsleri*

PV-27. 60S ----- -- CGT TTC CAG AAC AAG AAG CCG TTC ATT AAG TCG CGC TTC TGC CGT GGT GTG CCC GAC
PV-37. 60S. ----- TAC CGT TTC CAG AAC AAG AAG CCG TTC ATT AAG TCG CGC TTC TGY CGT GGY GTG CCC GAC
PV-39. 60S ----- - C CGT TTC CAG AAC AAG AAG CCG TTC ATT AAG TCG CGC TTC TGY CGT GGT GTG CCC GAC
PV-40. 60S -CT AAG TGT TAC CGT TTC CAG AAC AAG AAG CCG TTC ATT AAG TCG CGC TTC TGC CGT GGT GTG CCC GAC

PV-27. 60S CCG AAG ATC CGC ATC TAC GAT GTG GGC AAC AAG AAG GCT TCC GTG GAC GCC TTC CCC TTC GTG GCC CAC TT
PV-37. 60S. CCC AAG ATC CGC ATC TAC GAT GTG GGC AAC AAG AAG GCT TCC GTG GAC GCC TTC CCC TTC GTG GCC CAC TT
PV-39. 60S CCC AAG ATC CGC ATC TAC GAT GTG GGC AAC AAG AAG GCT TCC GTG GAC GCC TTC CCC TTC GTG GCC CAC TT
PV-40. 60S CCG AAG ATC CGC ATC TAC GAT GTG GGC AAC AAG AAG GCT TCC GTG GAC GCC TTC CCC TTC GTG GCC CAC TT

PV-27. 60S G GTG TCG GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCG TCG GAG GCG CTC GAG GCC GCC CGT ATC GCT GCT AAC CGT TAC
PV-37. 60S G GTG TCG GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCG TCG GAG GCG CTC GAG GCC GCC CGT ATC GCT GCT AAC CGT TAC
PV-39. 60S G GTG TCG GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCG TCG GAG GCG CTC GAG GCC GCC CGT ATC GCT GCT AAC CGT TAC
PV-40. 60S G GTG TCG GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCG TCG GAG GCG CTC GAG GCC GCC CGT ATC GCT GCT AAC CGT TAC

PV-27. 60S CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT A
PV-37. 60S. CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT A
PV-39. 60S CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT A
PV-40. 60S CTG ACC AAG TTC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCG TTC CAG GTC CTG CGT A

PV-27.60S	TC AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCT GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACG GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG CC
PV-37.60S.	TC AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCT GGT GCY GAT AGA CTG CAG ACG GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG CC
PV-39.60S	TC AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCT GGT GCC GAT AGA CTG CAG ACG GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG CC
PV-40.60S	TC AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCT GGT GCT GAT AGA CTG CAG ACG GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG CC
PV-27.60S	C GCC GGT GTG GCC GCC CGT GTG GCC ATC GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC AAC TTC GGC
PV-37.60S.	C GCC GGT GTG GCC GCC CGT GTG GCC ATC GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC AAC TTC GGC
PV-39.60S	C GCC GGT GTG GCC GCC CGT GTG GCC ATC GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC AAC TTC GGC
PV-40.60S	C GCC GGT GTG GCC GCC CGT GTG GCC ATC GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGT TCC AAG GAC AAC TTC GGC
PV-27.60S	CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TCC A
PV-37.60S.	CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TCC A
PV-39.60S	CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TCC A
PV-40.60S	CCT TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TCC A

**Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión EU080862 del GenBank

Aislados*** de *Phytophthora* sp. “kelmania”

PV-47.60S	-----	----	-	TTC CAG AAC AAG AAG CCG TTC ATT AAG TCG CGC TTC TGC CGT GGT GTG CCC GAC C
PV-29.60S	-----			TAC CGT TTC CAG AAC AAG AAG CCG TTC ATT AAG TCG CGC TTC TGC CGT GGT GTG CCC GAC C
PV-47.60S	CC AAG ATC CGC ATC TAC GAT GTG GGC AAC AAG AAG GCC TCC GTG GAC GCC TTC CCC TTC GTG GCC CAC TT			
PV-29.60S	CC AAG ATC CGC ATC TAC GAT GTG GGC AAC AAG AAG GCC TCC GTG GAC GCC TTC CCC TTC GTG GCC CAC TT			
PV-47.60S	G GTG TCG GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCG TCG GAG GCG CTC GAG GCC GCC CGT ATC GCT GCT AAC CGT TAC			
PV-29.60S	G GTG TCG GAC GAG AAG GAG CAG CTG TCG TCG GAG GCG CTC GAG GCC GCC CGT ATC GCT GCT AAC CGT TAC			
PV-47.60S	CTG ACC AAG TAC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCC TTC CAG GTC CTG CGT A			
PV-29.60S	CTG ACC AAG TAC TGC GGC AAG GAC AAC TTC CAC ATG CGC ATC CGT TGC CAC CCY TTC CAG GTC CTG CGT A			

PV-47.60S	TC AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCT GGC GCC GAT AGA CTG CAG ACG GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG CC
PV-29.60S	TC AAC AAG ATG CTT TCG TGC GCT GGC GCC GAT AGA CTG CAG ACG GGT ATG CGT CAC GCT TAC GGT AAG CC
PV-47.60S	C GCC GGT GTG GCC GCC CGT GTG GCC ATC GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGC TCC AAG GAC AAC TTC GGC
PV-29.60S	C GCC GGT GTG GCC GCC CGT GTG GCC ATC GGC CAG CCC ATT ATC TCG GTG CGC TCC AAG GAC AAC TTC GGC
PV-47.60S	CCC TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TCC A
PV-29.60S	CCC TCG GTC GTG GAG GCT CTG CGT CGT GCC AAG TTC AAA TTC CCT GGT CGC CAG AAA GTG CTG GGC TCC A

***Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión EU079605 del GenBank

Anexo VI Secuencia del amplicón obtenido con el gen Cox I

Aislados* de *Phytophthora drechsleri*

PV-27.CoxI	-----	-----TTTTA	TT-CAACTA	TTT	ATA	ATA	TGA	GAG	CAC	CTG	GTT	TAA	GTT	TTC	ATA	GAT	TA							
PV-37.CoxI	-----GTGCA	ATTAATTTTA	TTTCAACTA	TTT	ATA	ATA	TGA	GAG	CAC	CTG	GTT	TAA	GTT	TTC	ATA	GAT	TA							
PV-39.COXI	CTATAGTGCA	ATTAATTTTA	TTTCAACTA	TTT	ATA	ATA	TGA	GAG	CAC	CTG	GTT	TAA	GTT	TTC	ATA	GAT	TA							
PV-40.CoxI	-----GTGCA	ATTAATTTTA	TTTCAACTA	TTT	ATA	ATA	TGA	GAG	CAC	CTG	GTT	TAA	GTT	TTC	ATA	GAT	TA							
PV-27.CoxI	C	CTT	TAT	TTG	TTT	GGT	CTG	TAT	TAA	TTA	CAG	CTT	TTC	TTT	TAT	TAT	TAA	CCT	TAC	CTG	TAT	TAG	CTG	GAG
PV-37.CoxI	C	CTT	TAT	TTG	TTT	GGT	CTG	TAT	TAA	TTA	CAG	CTT	TTC	TTT	TAT	TAT	TAA	CCT	TAC	CTG	TAT	TAG	CTG	GAG
PV-39.COXI	C	CTT	TAT	TTG	TTT	GGT	CTG	TAT	TAA	TTA	CAG	CTT	TTC	TTT	TAT	TAT	TAA	CCT	TAC	CTG	TAT	TAG	CTG	GAG
PV-40.CoxI	C	CTT	TAT	TTG	TTT	GGT	CTG	TAT	TAA	TTA	CAG	CTT	TTC	TTT	TAT	TAT	TAA	CCT	TAC	CTG	TAT	TAG	CTG	GAG
PV-27.CoxI	CAA	TTA	CTA	TGT	TAT	TAA	CTG	ATA	GAA	ATT	TAA	ATA	CTT	CTT	TTT	ATG	ATC	CAT	CAG	GTG	GGG	GTG	ATC	C
PV-37.CoxI	CAA	TTA	CTA	TGT	TAT	TAA	CTG	ATA	GAA	ATT	TAA	ATA	CTT	CTT	TTT	ATG	ATC	CAT	CAG	GTG	GGG	GTG	ATC	C
PV-39.COXI	CAA	TTA	CTA	TGT	TAT	TAA	CTG	ATA	GAA	ATT	TAA	ATA	CTT	CTT	TTT	ATG	ATC	CAT	CAG	GTG	GGG	GTG	ATC	C
PV-40.CoxI	CAA	TTA	CTA	TGT	TAT	TAA	CTG	ATA	GAA	ATT	TAA	ATA	CTT	CTT	TTT	ATG	ATC	CAT	CAG	GTG	GGG	GTG	ATC	C
PV-27.CoxI	AG	TAT	TAT	ATC	AAC	ATT	TAT	TTT	GGT	TTT	TCG	GTC	ATC	CGG	AAG	TTT	ATA	TTT	TAA	TTT	TAC	CAG	CTT	TT
PV-37.CoxI	AG	TAT	TAT	ATC	AAC	ATT	TAT	TTT	GGT	TTT	TCG	GTC	ATC	CGG	AAG	TTT	ATA	TTT	TAA	TTT	TAC	CAG	CTT	TT
PV-39.COXI	AG	TAT	TAT	ATC	AAC	ATT	TAT	TTT	GGT	TTT	TCG	GTC	ATC	CGG	AAG	TTT	ATA	TTT	TAA	TTT	TAC	CAG	CTT	TT
PV-40.CoxI	AG	TAT	TAT	ATC	AAC	ATT	TAT	TTT	GGT	TTT	TCG	GTC	ATC	CGG	AAG	TTT	ATA	TTT	TAA	TTT	TAC	CAG	CTT	TT
PV-27.CoxI	G	GTA	TTA	TTA	GTC	AAG	TTT	CTG	CGG	CAT	TTG	CAA	AAA	AAA	ATG	TAT	TTG	GTT	ATT	TAG	GTA	TGG	TTT	ATG
PV-37.CoxI	G	GTA	TTA	TTA	GTC	AAG	TTT	CTG	CGG	CAT	TTG	CAA	AAA	AAA	ATG	TAT	TTG	GTT	ATT	TAG	GTA	TGG	TTT	ATG
PV-39.COXI	G	GTA	TTA	TTA	GTC	AAG	TTT	CTG	CGG	CAT	TTG	CAA	AAA	AAA	ATG	TAT	TTG	GTT	ATT	TAG	GTA	TGG	TTT	ATG
PV-40.CoxI	G	GTA	TTA	TTA	GTC	AAG	TTT	CTG	CGG	CAT	TTG	CAA	AAA	AAA	ATG	TAT	TTG	GTT	ATT	TAG	GTA	TGG	TTT	ATG
PV-27.CoxI	CCA	TGT	TAT	CTA	TAG	GTT	TAT	TAG	GTT	CTA	TTG	TAT	GGG	CAC	ATC	ATA	TGT	TTA	CTG	TTG	GTT	TAG	ATG	T
PV-37.CoxI	CCA	TGT	TAT	CTA	TAG	GTT	TAT	TAG	GTT	CTA	TTG	TAT	GGG	CAC	ATC	ATA	TGT	TTA	CTG	TTG	GTT	TAG	ATG	T
PV-39.COXI	CCA	TGT	TAT	CTA	TAG	GTT	TAT	TAG	GTT	CTA	TTG	TAT	GGG	CAC	ATC	ATA	TGT	TTA	CTG	TTG	GTT	TAG	ATG	T
PV-40.CoxI	CCA	TGT	TAT	CTA	TAG	GTT	TAT	TAG	GTT	CTA	TTG	TAT	GGG	CAC	ATC	ACA	TGT	TTA	CTG	TTG	GTT	TAG	ATG	T

PV-27.CoxI	CG ATA CTC GAG CTT ATT TCT CAG CAG CTA CTA TGA TTA TTG CTG TAC CAA CTG GTA TTA AAA TTT TTA GT
PV-37.CoxI	CG ATA CTC GAG CTT ATT TCT CAG CAG CTA CTA TGA TTA TTG CTG TAC CAA CTG GTA TTA AAA TTT TTA GT
PV-39.COXI	CG ATA CTC GAG CTT ATT TCT CAG CAG CTA CTA TGA TTA TTG CTG TAC CAA CTG GTA TTA AAA TTT TTA GT
PV-40.CoxI	CG ATA CTC GAG CTT ATT TCT CAG CAG CTA CTA TGA TTA TTG CTG TAC CAA CTG GTA TTA AAA TTT TTA GT
PV-27.CoxI	T GGT TAG CTA CTT TAT GGG GCG GTT CTT TAA AAT TTG AAA CAC CTT TAT TAT TTA CTT TAG GTT TTA TTT
PV-37.CoxI	T GGT TAG CTA CTT TAT GGG GCG GTT CTT TAA AAT TTG AAA CAC CTT TAT TAT TTA CTT TAG GTT TTA TTT
PV-39.COXI	T GGT TAG CTA CTT TAT GGG GCG GTT CTT TAA AAT TTG AAA CAC CTT TAT TAT TTA CTT TAG GTT TTA TTT
PV-40.CoxI	T GGT TAG CTA CTT TAT GGG GCG GTT CTT TAA AAT TTG AAA CAC CTT TAT TAT TTA CTT TAG GTT TTA TTT
PV-27.CoxI	TAT TAT TTG TAA TGG GTG GTG TAA CTG GTG TTG CTA TGT CTA ATT CAG GCC TAG ATA TCG CTT TAC ATG A
PV-37.CoxI	TAT TAT TTG TAA TGG GTG GTG TAA CTG GTG TTG CTA TGT CTA ATT CAG GCC TAG ATA TCG CTT TAC ATG A
PV-39.COXI	TAT TAT TTG TAA TGG GTG GTG TAA CTG GTG TTG CTA TGT CTA ATT CAG GCC TAG ATA TCG CTT TAC ATG A
PV-40.CoxI	TAT TAT TTG TAA TGG GTG GTG TAA CTG GTG TTG CTA TGT CTA ATT CAG GCC TAG ATA TCG CTT TAC ATG A
PV-27.CoxI	TA CTT ATT ATA TTG TAG GAC ATT TTC ATT ATG TAT TAT CTA TGG GTG CTG TTT TTG GTA TTT TTA CTG GA
PV-37.CoxI	TA CTT ATT ATA TTG TAG GAC ATT TTC ATT ATG TAT TAT CTA TGG GTG CTG TTT TTG GTA TTT TTA CTG GA
PV-39.COXI	TA CTT ATT ATA TTG TAG GAC ATT TTC ATT ATG TAT TAT CTA TGG GTG CTG TTT TTG GTA TTT TTA CTG GA
PV-40.CoxI	TA CTT ATT ATA TTG TAG GAC ATT TTC ATT ATG TAT TAT CTA TGG GTG CTG TTT TTG GTA TTT TTA CTG GA
PV-27.CoxI	T TTT ATT TTT GGA TTG GAA AAA TAT CAG GTC GTA GAT ATC CTG AAG TTT TAG GTC AAA TTC ATT TTT GGT
PV-37.CoxI	T TTT ATT TTT GGA TTG GAA AAA TAT CAG GTC GTA GAT ATC CTG AAG TTT TAG GTC AAA TTC ATT TTT GGT
PV-39.COXI	T TTT ATT TTT GGA TTG GAA AAA TAT CAG GTC GTA GAT ATC CTG AAG TTT TAG GTC AAA TTC ATT TTT GGT
PV-40.CoxI	T TTT ATT TTT GGA TTG GAA AAA TAT CAG GTC GTA GAT ATC CCG AAG TTT TAG GTC AAA TTC ATT TTT GGT
PV-27.CoxI	TAT TCT TTA TTG GTG TAA ATG TAA CCT TTT TTC CAA TGC ATT TCT TAG GTT TAG CAG GTA TGC CTA GAA G
PV-37.CoxI	TAT TCT TTA TTG GTG TAA ATG TAA CCT TTT TTC CAA TGC ATT TCT TAG GTT TAG CAG GTA TGC CTA GAA G
PV-39.COXI	TAT TCT TTA TTG GTG TAA ATG TAA CCT TTT TTC CAA TGC ATT TCT TAG GTT TAG CAG GTA TGC CTA GAA G
PV-40.CoxI	TAT TCT TTA TTG GTG TAA ATG TAA CCT TTT TTC CAA TGC ATT TCT TAG GTT TAG CCG GTA TGC CTA GAA G
PV-27.CoxI	AA TAC CTG ATT TTC CTG ATG CTA TGA GTG GTT GGA ATG CTG TGA GTA GTT TCG --- --- --- --- ---
PV-37.CoxI	AA TAC CTG ATT TTC CTG ATG CTA TGA GTG GTT GGA ATG CTG TGA GTA GTT TCG GTT CAT ATA TTT CAT TT
PV-39.COXI	AA TAC CTG ATT TTC CTG ATG CTA TGA GTG GTT GGA ATG CTG TGA GTA GT- --- --- --- --- ---
PV-40.CoxI	AA TAC CCG ATT TTC CTG ATG CTA TGA GTG GTT GGA ATG CTG TGA GTA GTT TCG GTT CAT ATA TTT CAT TT
PV-27.CoxI	- - - - -
PV-37.CoxI	T TTT CAG CTC TGT
PV-39.COXI	- - - - -
PV-40.CoxI	T TTT CAG CTC TGT

*Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión AY6595 del GenBank

Aislados** de *Phytophthora* sp. “*kelmania*”

PV-29.CoxI	CAATTAAC	TTTAT	TC	AAC	TAT	TTA	TAA	CAT	GAG	AGC	TCC	AGG	TTT	AAG	TTT	TCA	TCG	ATT	ACC	TTT	ATT			
PV-47.CoxI	--AA	TAAC	TTTAT	T	C	AAC	TAT	TTA	TAA	CAT	GAG	AGC	TCC	AGG	TTT	AAG	TTT	TCA	TCG	ATT	ACC	TTT	ATT	
PV-29.CoxI	TGT	TTG	GTC	TGT	ATT	AAT	TAC	AGC	TTT	TCT	TTT	ATT	ATT	AAC	ATT	ACC	TGT	ATT	AGC	AGG	AGC	AAT	TAC	T
PV-47.CoxI	TGT	TTG	GTC	TGT	ATT	AAT	TAC	AGC	TTT	TCT	TTT	ATT	ATT	AAC	ATT	ACC	TGT	ATT	AGC	CGG	AGC	AAT	TAC	T
PV-29.CoxI	AT	GTT	ATT	AAC	TGA	TAG	AAA	TTT	AAA	TAC	TTC	TTT	TTA	TGA	TCC	ATC	TGG	TGG	AGG	TGA	TCC	AGT	ATT	AT
PV-47.CoxI	AT	GTT	GTT	AAC	TGA	TAG	AAA	TTT	AAA	TAC	TTC	TTT	TTA	TGA	TCC	ATC	TGG	TGG	AGG	TGA	TCC	AGT	ATT	AT
PV-29.CoxI	A	TCA	ACA	TTT	ATT	TTG	GTT	TTT	CGG	TCA	TCC	TGA	AGT	TTA	TAT	TTT	AAT	TTT	ACC	AGC	TTT	TGG	TAT	TAT
PV-47.CoxI	A	TCA	ACA	TTT	ATT	TTG	GTT	TTT	CGG	TCA	TCC	TGA	AGT	TTA	TAT	TTT	AAT	TTT	ACC	AGC	TTT	TGG	TAT	TAT
PV-29.CoxI	TAG	TCA	AGT	TTC	TGC	AGC	ATT	TGC	TAA	AAA	AAA	TGT	ATT	TGG	TTA	TTT	AGG	TAT	GGT	TTA	TGC	AAT	GTT	A
PV-47.CoxI	TAG	TCA	AGT	TTC	TGC	AGC	ATT	TGC	TAA	AAA	AAA	TGT	ATT	TGG	TTA	TTT	AGG	TAT	GGT	TTA	TGC	AAT	GTT	A
PV-29.CoxI	TC	TAT	TGG	TTT	ATT	AGG	TTC	TAT	TGT	TTG	GGC	ACA	TCA	TAT	GTT	TAC	TGT	TGG	TTT	AGA	TGT	AGA	TAC	TC
PV-47.CoxI	TC	TAT	TGG	TTT	ATT	AGG	TTC	TAT	TGT	TTG	GGC	ACA	TCA	TAT	GTT	TAC	TGT	TGG	TTT	AGA	TGT	AGA	TAC	TC
PV-29.CoxI	G	GGC	TTA	TTT	TTC	AGC	AGC	TAC	TAT	GAT	TAT	TGC	TGT	ACC	TAC	TGG	TAT	TAA	AAT	TTT	TAG	TTG	GTT	-AG
PV-47.CoxI	G	GGC	TTA	TTT	TTC	AGC	AGC	TAC	TAT	GAT	TAT	TGC	TGT	ACC	TAC	TGG	TAT	TAA	AAT	TTT	TAG	TTG	GTT	-AG
PV-29.CoxI	CTA	CTT	TAT	GGG	GTG	GTT	CTT	TAA	AAT	TTG	AAA	CAC	CTT	TAT	TAT	TTA	CTT	TAG	GTT	TTA	TTT	TA-	TTA	T
PV-47.CoxI	CTA	CTT	TAT	GGG	GCG	GTT	CTT	TAA	AAT	TTG	AAA	CAC	CTT	TAT	TAT	TTA	CTT	TAG	GTT	TTA	TTT	TA-	TTA	T
PV-29.CoxI	TT	GTA	ATG	GGT	GGT	GTA	ACC	GGT	GTT	GCT	ATG	TCT	AAT	TCA	GGA	TTA	GAT	ATT	GCT	TTA	CAT	GAT	ACT	TA
PV-47.CoxI	TT	GTA	ATG	GGT	GGT	GTA	ACT	GGT	GTT	GCT	ATG	TCT	AAT	TCA	GGA	TTA	GAT	ATT	GCT	TTA	CAT	GAT	ACT	TA
PV-29.CoxI	T	TAT	ATT	GTA	GGA	CAT	TTC	CAT	TAT	GTA	TTA	TCT	ATG	GGT	GCT	GTT	TTC	GGT	ATT	TTT	ACT	GGA	TTT	TAT
PV-47.CoxI	T	TAT	ATT	GTA	GGA	CAT	TTC	CAT	TAT	GTA	TTA	TCT	ATG	GGT	GCT	GTT	TTC	GGT	ATT	TTT	ACT	GGT	TTT	TAT

PV-29.CoxI	TTT TGG ATT GGA A-- -AA ATA TCT GGT CGT AGA TAT CCA GAA ATT TTA GGT CAA ATT CAT TTC TG- GTT A
PV-47.CoxI	TTT TGG ATT GGA A-- -AA ATA TCT GGT CGT AGA TAT CCA GAA ATT TTA GGT CAA ATT CAT TTC TG- GTT A
PV-29.CoxI	TT CTT TAT TGG AGT AAA TGT AAC TTT TTT TCC AAT GCA TTT TTT AGG TTT AGC CGG TAT GCC TAG AAG AA
PV-47.CoxI	TT CTT TAT TGG AGT AAA TGT AAC TTT TTT TCC AAT GCA TTT TTT AGG TTT AGC CGG TAT GCC TAG AAG AA
PV-29.CoxI	T ACC TGA TTT TCC TGA TGC TAT GAG TGG TTG GAA TGC TGT AAG TAG TTT CGG TTC ATA TAT TTC ATT TTT
PV-47.CoxI	T ACC TGA TTT TCC TGA TGC TAT GAG TGG TTG GAA TGC TGT AAG TAG TTT CGG TTC ATA TAT TTC ATT TTT
PV-29.CoxI	TTC AGC TAT TTC T-- --
PV-47.CoxI	TTC AGC TAT TTC TCC CT

****Estos aislados no fueron alineados con ningún aislado del GenBank**

ANEXO VII Secuencia del amplicón obtenido con el gen Cox II

Aislados* de *Phytophthora capsici*

PV-15. <i>CoxII</i>	GGCAATTAGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-30. <i>CoxII</i>	-----TAGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-31. <i>CoxII</i>	-----TAGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-33. <i>CoxII</i>	---AATTAGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-34. <i>CoxII</i>	-----TAGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-35. <i>CoxII</i>	---AATTAGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AA			
PV-36. <i>CoxII</i>	-----AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-41. <i>CoxII</i>	-----AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	AGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-44. <i>CoxII</i>	-----AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-46. <i>CoxII</i>	-----AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	TGT	AAT	GGA	AGG	TAT	TAT	AAA	TTT	TCA	TCA	TGA	TTT	AAT			
PV-15. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-30. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-31. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-33. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-34. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-35. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-36. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-41. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-44. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-46. <i>CoxII</i>	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TGT	TGT	ATT	TGT	ATG	TTG	GAT	GTT	ATT	TAG	AGT	TAT	TAC	TCT	TTT	TGA	TGA	A
PV-15. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-30. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-31. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-33. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-34. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-35. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-36. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-41. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	CGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-44. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG
PV-46. <i>CoxII</i>	AA	AAA	AAA	TAA	AAT	TCC	AGC	AAC	TGT	TGT	ACA	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	TCC	AG

PV-15.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-30.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-31.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-33.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-34.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-35.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-36.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-41.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-44.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-46.CoxII	T TTT AGA AGT AGA TAA TCG TGT AGT AGT TCC AAC TAA TAG TCA TAT TAG AGT ATT AAT TAC AGC ATC AGA
PV-15.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC AGG TCG TTT AAA TCA A
PV-30.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC TGG CCG TTT AAA TCA A
PV-31.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC TGG CCG TTT AAA TCA A
PV-33.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC AGG TCG TTT AAA TCA A
PV-34.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC TCG CCG TTT AAA TCA A
PV-35.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC TGG CCG TTT AAA TCA A
PV-36.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC TGG CCG TTT AAA TCA A
PV-41.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC AGG TCG TTT AAA TCA A
PV-44.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC AGG TCG TTT AAA TCA A
PV-46.CoxII	TGT TTT ACA TTC TTG GGC TAT ACC TTC ATT AGG TTT AAA ATT AGA TGC ATG TCC TGG CCG TTT AAA TCA A
PV-15.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA TGT AGT GAA ATT TGT GGA GTA AAT CAT G
PV-30.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-31.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA TG- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-33.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA TG- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-34.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA T-- --- --- --- --- --- --- ---
PV-35.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA TG- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-36.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA T-- --- --- --- --- --- --- ---
PV-41.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-44.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CA- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-46.CoxII	AC TTC AAT GTT TAT TAA AAG AGA AGG TGT TTT TAT GGA CAA T-- --- --- --- --- --- --- ---

*Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión JN618571 del GenBank

Aislados** de *Phytophthora drechsleri*

PV-27.CoxII	-----	-----	-----		GCA	ATT	AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	CCC	GGT	TAT	GGA	G						
PV-37.CoxII	-----	-----	-----	-----			T	AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	CCC	GGT	TAT	GGA	G					
PV-39.CoxII	-----	-----	-----		G	GCA	ATT	AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	CCC	GGT	TAT	GGA	G					
PV-40.CoxII	-----	-----	-----	-----				AGG	TTT	TCA	AGA	TCC	AGC	AAC	TCC	GGT	TAT	GGA	G					
PV-27.CoxII	-G	GTA	TTA	TAA	ACT	TTC	ATC	ATG	ATT	TAA	---	--T	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TAC	TG-	---	TAT	TTG	TT
PV-37.CoxII	-G	GTA	TTA	TAA	ACT	TTC	ATC	ATG	ATT	TAA	---	--T	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TAC	TG-	---	TAT	TTG	TT
PV-39.CoxII	-G	GTA	TTA	TAA	ACT	TTC	ATC	ATG	ATT	TAA	---	--T	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TAC	TG-	---	TAT	TTG	TT
PV-40.CoxII	-G	GTA	TTA	TAA	ACT	TTC	ATC	ATG	ATT	TAA	---	--T	GTT	TTT	TTT	AAT	TAT	GAT	TAC	TG-	---	TAT	TTG	TT
PV-27.CoxII	T	GTT	GGA	TGC	TAT	TTA	GAG	TTA	TTA	CTC	TTT	TTG	ATG	AAA	AAA	AAA	ATA	AAA	TTC	CAG	CAA	CAG	TAG	TAC
PV-37.CoxII	T	GTT	GGA	TGC	TAT	TTA	GAG	TTA	TTA	CTC	TTT	TTG	ATG	AAA	AAA	AAA	ATA	AAA	TTC	CAG	CAA	CAG	TAG	TAC
PV-39.CoxII	T	GTT	GGA	TGC	TAT	TTA	GAG	TTA	TTA	CTC	TTT	TTG	ATG	AAA	AAA	AAA	ATA	AAA	TTC	CAG	CAA	CAG	TAG	TAC
PV-40.CoxII	T	GTT	GGA	TGT	TAT	TTA	GAG	TTA	TTA	CTC	TTT	TTG	ATG	AAA	AAA	AAA	ATA	AAA	TTC	CAG	CAA	CAG	TAG	TAC
PV-27.CoxII	A--	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	T--	-CC	AGC	TTT	AAT	TTT	ATT	AAC	TG-	--T	TGC	A
PV-37.CoxII	A--	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	T--	-CC	AGC	TTT	AAT	TTT	ATT	AAC	TG-	--T	TGC	A
PV-39.CoxII	A--	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	T--	-CC	AGC	TTT	AAT	TTT	ATT	AAC	TG-	--T	TGC	A
PV-40.CoxII	A--	TGG	TGC	AAC	TAT	TGA	AAT	TAT	TTG	GAC	TTC	TAT	T--	-CC	AGC	TTT	AAT	TTT	ATT	AAC	TG-	--T	TGC	A
PV-27.CoxII	GT	TCC	TTC	TTT	TGC	TTT	ATT	ATA	TTC	TAT	GG-	---	---	ATG	AAG	TAA	TTG	ACC	CTA	TTA	TTA	CTT	TAA	AA
PV-37.CoxII	GT	TCC	TTC	TTT	TGC	TTT	ATT	ATA	TTC	TAT	GG-	---	---	ATG	AAG	TAA	TTG	ACC	CTA	TTA	TTA	CTT	TAA	AA
PV-39.CoxII	GT	TCC	TTC	TTT	TGC	TTT	ATT	ATA	TTC	TAT	GG-	---	---	ATG	AAG	TAA	TTG	ACC	CTA	TTA	TTA	CTT	TAA	AA
PV-40.CoxII	GT	TCC	TTC	TTT	TGC	TTT	ATT	ATA	TTC	TAT	GG-	---	---	ATG	AAG	TAA	TTG	ACC	CGA	TTA	TTA	CTT	TAA	AA
PV-27.CoxII	G	TAA	TTG	GTA	GTC	AAT	GGT	ATT	GGA	GTT	ATG	AAT	ATT	CAG	ATA	ATT	TAG	AAT	TTT	CTG	ATG	AAC	CTT	TAA
PV-37.CoxII	G	TAA	TTG	GTA	GTC	AAT	GGT	ATT	GGA	GTT	ATG	AAT	ATT	CAG	ATA	ATT	TAG	AAT	TTT	CTG	ATG	AAC	CTT	TAA
PV-39.CoxII	G	TAA	TTG	GTA	GTC	AAT	GGT	ATT	GGA	GTT	ATG	AAT	ATT	CAG	ATA	ATT	TAG	AAT	TTT	CTG	ATG	AAC	CTT	TAA
PV-40.CoxII	G	TAA	TTG	GTA	GTC	AAT	GGT	ATT	GGA	GTT	ATG	AAT	ATT	CAG	ATA	ATT	TAG	AAT	TTT	CTG	ATG	AAC	CTT	TAA
PV-27.CoxII	TTT	TTG	AT-	AGT	TAT	ATG	GTA	CAA	GAG	GAT	GAT	TTA	GCT	ATA	GGT	CAA	TTT	AGA	GTA	TTA	GAA	-GT	AGA	T
PV-37.CoxII	TTT	TTG	AT-	AGT	TAT	ATG	GTA	CAA	GAG	GAT	GAT	TTA	GCT	ATA	GGT	CAA	TTT	AGA	GTA	TTA	GAA	-GT	AGA	T
PV-39.CoxII	TTT	TTG	AT-	AGT	TAT	ATG	GTA	CAA	GAG	GAT	GAT	TTA	GCT	ATA	GGT	CAA	TTT	AGA	GTA	TTA	GAA	-GT	AGA	T
PV-40.CoxII	TTT	TTG	AT-	AGT	TAT	ATG	GTA	CAA	GAG	GAT	GAT	TTA	GCT	ATA	GGT	CAA	TTT	AGA	GTA	TTA	GAA	-GT	AGA	T

PV-27.CoxII	AA TCG --T GTT GTA GT- -GC CCA CTA ATA GTC ATA TTA GGG TAT TAA TTA CAG CAT CTG ATG TTT TAC AT
PV-37.CoxII	AA TCG --T GTT GTA GT- -GC CCA CTA ATA GTC ATA TTA GGG TAT TAA TTA CAG CAT CTG ATG TTT TAC AT
PV-39.CoxII	AA TCG --T GTT GTA GT- -GC CCA CTA ATA GTC ATA TTA GGG TAT TAA TTA CAG CAT CTG ATG TTT TAC AT
PV-40.CoxII	AA TCG --T GTT GTA GT- -GC CCA CTA ATA GTC ATA TTA GGG TAT TAA TTA CAG CAT CTG ATG TTT TAC AT
PV-27.CoxII	T CTT GGG CTA TTC CTT CAT TAG GTA TTA AAT TAG ATG CGT GTC CAG GTC GTT TAA ATC AAA CTT CAA TGT
PV-37.CoxII	T CTT GGG CTA TTC CTT CAT TAG GTA TTA AAT TAG ATG CGT GTC CAG GTC GTT TAA ATC AAA CTT CAA TGT
PV-39.CoxII	T CTT GGG CTA TTC CTT CAT TAG GTA TTA AAT TAG ATG CGT GTC CAG GTC GTT TAA ATC AAA CTT CAA TGT
PV-40.CoxII	T CTT GGG CTA TTC CTT CAT TAG GTA TTA AAT TAG ATG CGT GTC CAG GTC GTT TAA ATC AAA CTT CAA TGT
PV-27.CoxII	TTA TTA AAA GAG --- AAG GTG TTT TT- TAT GGA CAA TGT AGT GAA ATT TGT GGA GTA AAT CAT GGA TTT A
PV-37.CoxII	TTA TTA AAA GAG --- AAG GTG TTT TT- TAT GGA CAA TG- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-39.CoxII	TTA TTA AAA GAG --- AAG GTG TTT TT- TAT GGA CAA TGT AGT GAA ATT TGT GGA GTA AAT CAT GGA TTT A
PV-40.CoxII	TTA TTA AAA GAG --- AAG GTG TTT TT- TAT GGA CA- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-27.CoxII	TG CCT ATT GTA GTT GAA GCT GTT TCA TTA GAA GAC TAT TTA ACT TGG TTA AAA AAT AAA ATC AAT TTT GA
PV-37.CoxII	-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-39.CoxII	TG CCT ATT GTA GTT GAA GCT GTT TCA TTA GAA GAC TAT TTA ACT TGG TTA AAA AAT AAA ATC AAT TTT GA
PV-40.CoxII	-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-27.CoxII	T TTT AAT GTA TAA TAA TTA AAT TAA TT- -TT ATG ATA TTT AAA ATA ATT GGT ATA ATT TTT TTA ATA TTA
PV-37.CoxII	- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-39.CoxII	T TTT AAT GTA TAA TAA TTA AAT TAA TT- -TT ATG ATA TTT AAA ATA ATT GGT ATA ATT TTT TTA ATA TTA
PV-40.CoxII	- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-27.CoxII	TTA TTA TTT ACT GAT CTT AAA CAA CTA ATT AAT AAA ATA AAA CAA TTT TTT AAT AAA TAA ACA AAA AAC T
PV-37.CoxII	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-39.CoxII	TTA TTA TTT ACT GAT CTT AAA CAA CTA ATT AAT AAA ATA A-- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
PV-40.CoxII	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

****Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión HO455745.1 del GenBank**

Aislados*** de *Phytophthora* sp. “kelmania”

PV-29.CoxI	GAACCTTGGC AATTAGGTTT TCAAGATCCA GCAACTCCAG TTA TG GAA GGT ATT ATA AAC TTT CAC CAT G
PV-47.CoxI	----- -G GAA GGT ATT ATA AAC TTT CAT CAT G
PV-29.CoxI	AT TTA ATG TTT TTT TTA ATT ATG ATT ACT GTA TTT GTT TGT TGG ATG TTA TTT AGA GTT ATT ACT CTT TT
PV-47.CoxI	AT TTA ATG TTT TTT TTA ATT ATG ATT ACT GTA TTT GTT TGT TGG ATG TTA TTT AGA GTT ATT ACT CTT TT
PV-29.CoxI	T GAT GAA AAA AAA AAT AAA ATT CCT GCA ACA GTC GTA CAT GGT GCA ACT ATT GAA ATT ATT TGG ACT TCT
PV-47.CoxI	T GAT GAA AAA AAA AAT AAA ATT CCT GCA ACA GTA GTA CAT GGT GCA ACT ATT GAA ATT ATT TGG ACT TCT
PV-29.CoxI	ATT CCA GCT TTA ATT TTA TTA ACT GTT GCT GTT CCT TCT TTT GCT TTA TTA TAT TCT ATG GAT GAA GTA A
PV-47.CoxI	ATT CCA GCT TTA ATT TTA TTA ACT GTT GCT GTA CCT TCT TTT GCT TTA TTA TAT TCT ATG GAT GAA GTA A
PV-29.CoxI	TT GAC CCA ATT ATT ACT TTA AAA GTA ATC GGT AGT CAA TGG TAT TGG AGT TAT GAA TAT TCA GAT AAT TT
PV-47.CoxI	TT GAC CCA ATT ATT ACT TTA AAA GTA ATC GGT AGT CAA TGG TAT TGG AGT TAT GAA TAT TCC GAT AAT TT
PV-29.CoxI	A GAA TTT TCT GAT GAA CCT TTA ATT TTT GAT AGT TAT ATG GTA CAA GAA GAT GAT TTA GCT ATA GGT CAA
PV-47.CoxI	A GAA TTT TCT GAT GAA CCT TTA ATT TTT GAT AGT TAT ATG GTA CAA GAA GAT GAT TTA GCT ATA GGT CAA
PV-29.CoxI	TTT AGA GTA TTA GAA GTA GAT AAT CGT GTT GTA GTT CCA ACT AAT AGT CAT ATT CGA GTA TTA ATT ACA G
PV-47.CoxI	TTT AGA GTA TTA GAA GTA GAT AAT CGT GTT GTA GTT CCA ACT AAT AGT CAT ATT CGA GTA TTA ATT ACA G
PV-29.CoxI	CA TCA GAT GTT TTA CAT TCT TGG GCT ATA CCT TCA TTA GGT ATT AAA TTA GAT GCT TGT CCA GGT CGT TT
PV-47.CoxI	CA TCA GAT GTT TTA CAT TCT TGG GCT ATA CCT TCA TTA GGT ATT AAA TTA GAT GCT TGT CCT GGT CGT TT
PV-29.CoxI	A AAT CAA ACT TCA ATG TTT ATT AAA AGA AAA GGT GTT TTT TAT GGA CAA TGT AGT GAA ATT TGT GGA GTA
PV-47.CoxI	A AAT CAA ACT TCA ATG TTT ATT AAA AGA RAA GGT GTT TTT TAT GGA CAA TGT AGT GAA ATT TGT GGA GTA
PV-29.CoxI	AAT CAT GGA TTT ATG CCT ATT GTA GTT GAA GCT GTT TCA TTA GAA GAC TAC TTA ACT TGG TTA AAA AAT A
PV-47.CoxI	AAT CAT GGA TTT ATG CCT ATT GTA GTT GAA GCT GTT TCA TTA GAA GAC TAC TTA ACT TGG TTA AAA AAT A
PV-29.CoxI	AA ATC AAT TTT GAT TTT AAT GTA TAA GAA TTA AAT TAA TTT TAT GAT ATT TAA AAT AAT TGG TAT AAT TT
PV-47.CoxI	AA ATC AAT TTT GAT TTT AAT GTA TAA GAA TTA AAT TAA TTT TAT GAT ATT TAA AAT AAT TGG TAT AAT TT


```

PV-29.CoxI   T TTT AAT ATT ATT ATT ATT TAC TGA TCT TAA ACA AGT AAT TAA TAA AAT AAA ACA ATT TTT TAA
PV-47.CoxI   T TTT AAT ATT ATT ATT ATT TAC TGA TCT TAA ACA AGT AAT TAA TAA AAT AAA ACA ATT TTT TAA --- ---

PV-29.CoxI   AAC AAT AAA TTA TTA TTT TTA ATA ATA AAA ATT AAA AAA ACC AAC GCT TTT TTT AAT TTA AAA ACA GAT A
PV-47.CoxI   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

PV-29.CoxI   AT TTT GCA TTT AAA TTG AAT TTA ATA AAT ATT CAA AAA TGA ATT TTC AAA ATA TAA ATA AAT GGT CAA CA
PV-47.CoxI   -- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

PV-29.CoxI   A GAT GGC TTT TTT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG GGA CTT TAT ATT TAA TTT TTA G--
PV-47.CoxI   - --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

***Estos aislados fueron alineados con el aislado que se encuentra en la accesión GU222052 del GenBank