



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática:

Interacción Planta-Microorganismo- Insecto

Detección e identificación de especies de *Phytophthora* y *Pythium* en viveros de plantas ornamentales

TESIS QUE PRESENTA

BIOL. MARLENE DÍAZ CELAYA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO
DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Asesora: Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía

Co-asesor: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

Morelia, Michoacán; agosto de 2011

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH, bajo la asesoría de la Doctora Sylvia Patricia Fernández Pavía y co-asesoría del Doctor Gerardo Rodríguez Alvarado. Con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH y del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
La horticultura ornamental y su relación con el vivero.....	5
Plantas ornamentales.....	6
Principales países productores de plantas ornamentales en vivero.....	6
Producción de plantas ornamentales en vivero a nivel nacional.....	8
Problemática de los viveros ornamentales en México.....	9
Patógenos detectados en viveros en México.....	10
Enfermedades causadas por Oomicetes.....	10
Síntomas de enfermedades causadas por <i>Phytophthora</i>	13
Ciclo de vida.....	14
Síntomas de enfermedades causadas por <i>Pythium</i>	15
Ciclo de vida.....	16
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* AISLADAS DE VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES

RESUMEN.....	20
ABSTRACT.....	21
1.1 INTRODUCCIÓN.....	22
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
1.3 RESULTADOS.....	33
1.4 DISCUSIÓN.....	43
1.5 CONCLUSIONES.....	48
1.6 LITERATURA CITADA.....	49

**CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Pythium* AISLADAS
DE PLANTAS ORNAMENTALES PROVENIENTES DE VIVEROS**

RESUMEN.....	53
ABSTRACT.....	54
2.1 INTRODUCCIÓN.....	55
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
2.3 RESULTADOS.....	61
2.4 DISCUSIÓN.....	66
2.5 CONCLUSIONES.....	68
2.6 LITERATURA CITADA.....	69
DISCUSIÓN GENERAL.....	72
PERPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	74
LITERATURA COMPLEMENTARIA.....	75
ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Especies de <i>Phytophthora</i> reportadas en viveros de plantas ornamentales y sus hospederos.....	12
Cuadro 2. Plantas ornamentales con síntomas de marchitez, pudrición o muerte regresiva de las que se obtuvieron aislamientos de <i>Phytophthora</i>	34
Cuadro 3. Especies de <i>Phytophthora</i> identificadas.....	35
Cuadro 4. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Phytophthora</i>	36
Cuadro 5. Tipo de compatibilidad de los aislamientos de <i>Phytophthora</i> obtenidos de plantas ornamentales con síntomas de marchitez, pudrición o muerte regresiva.....	38
Cuadro 6. Plantas ornamentales procedentes de viveros de Morelia, Michoacán de las que se obtuvieron aislamientos de <i>Pythium</i>	61
Cuadro 7. Especies de <i>Pythium</i> identificadas.....	62
Cuadro 8. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Pythium</i>	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vivero “Jardín del Cubilete” ubicado en Uruapan, Michoacán.....	6
Figura 2. Ciclo de la enfermedad causada por <i>Phytophthora infestans</i>	15
Figura 3. Ciclo de enfermedades causadas por <i>Pythium</i> sp., ahogamiento en plántulas y pudrición de semillas.....	17
Figura 4. Genes ribosomales y sus espacios intergénicos. Los iniciadores para amplificar los espacios intergénicos también están indicados.....	24
Figura 5. Instrucciones para el uso de Agdia ImmunoStrip.....	31
Figura 6. Interpretación de resultados de Agdia ImmunoStrip.....	31
Figura 7. Estructuras de especies pertenecientes al género <i>Phytophthora</i>	39
Figura 8. Árbol filogenético de las especies de <i>Phytophthora</i> detectadas en viveros. Las secuencias obtenidas se compararon con las de aislamientos que se encuentran en el GenBank de NCBI (códigos EU y GU). Se utilizó la secuencia FJ415896 de <i>Pythium aphanidermatum</i> como grupo externo.....	40
Figura9. Estructuras de especies pertenecientes al género <i>Pythium</i>	64
Figura 10. Árbol filogenético de las especies de <i>Pythium</i> detectadas en viveros. Las secuencias obtenidas se compararon con las de aislamientos que se encuentran en GenBank de NCBI (códigos AY y FJ). Se utilizó la secuencia FJ217679 de <i>Phytophthora</i> sp. como grupo externo.....	65

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* Y *Pythium* EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES

RESUMEN GENERAL

El uso de ornamentales como elementos decorativos ha tomado gran importancia en todo el mundo, por ello la explotación y producción de plantas de ornato en vivero es una actividad que se está desarrollando exitosamente a nivel mundial. Los principales productores en el mundo han adoptado nuevas técnicas de cultivo y manejo, buscando mejorar la calidad para ser más competitivos, en algunos casos se especializan y exportan el producto. En México la producción se destina al mercado local y solo un 10 % se exporta, ya que la calidad de las flores producidas es baja y no se cumple con los estándares demandados, debido a que las prácticas de manejo en cosecha y postcosecha son inadecuadas. Asimismo, todos los años la industria del vivero sufre pérdidas debidas a problemas causados por plagas o por enfermedades ocasionadas por patógenos.

Debido a las pérdidas económicas producidas por patógenos se han realizado estudios en diferentes viveros a nivel mundial para detectar la presencia de estos. Se ha identificado a *Phytophthora* y a *Pythium* causando daños en plantas ornamentales y en agua de riego. En México los trabajos que existen sobre el estudio de enfermedades en viveros son muy escasos, se ha reportado en viveros ornamentales a *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Alternaria euphorbiicola*, *Cladosporium fulvum*, *Rhizoctonia solani*, *Cercosporidium bougainvilleae* y *Pseudomonas* sp. En Michoacán se ha detectado la presencia de *Phytophthora cinnamomi* en viveros de aguacate. Hasta ahora no existen reportes sobre la presencia de *Pythium*. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue detectar e identificar especies de *Phytophthora* y *Pythium* en tejido vegetal enfermo y suelo de la rizosfera en diferentes viveros ubicados en los municipios de Morelia, Uruapan y Tarímbaro en Michoacán y en el estado de Morelos. Se obtuvieron muestras de suelo y plantas ornamentales que mostraron síntomas de marchitez, pudrición radical, pudrición de corona y tallo o muerte regresiva en cinco viveros de Morelia, uno de Tarímbaro, uno de Uruapan y dos de Morelos.

Se aislaron 26 cepas de *Phytophthora* a partir de 16 especies de plantas ornamentales que mostraron síntomas de marchitez, pudrición radical, pudrición de corona y tallo o muerte regresiva. En base a las características morfológicas y a las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, se identificaron tres aislamientos como *P. cinnamomi*, un aislamiento como *P. nicotianae* x *P. cactorum*, dos aislamientos como *P. nicotianae*, diez aislamientos como *P. capsici*, ocho aislamientos como *P. drechsleri*, un aislamiento como *P. cactorum* y un aislamiento como *P. tropicalis*. De *Pythium* se obtuvieron 19 aislamientos a partir de 17 especies de plantas ornamentales con síntomas de marchitez procedentes de cuatro viveros de Morelia, Michoacán; de los cuales 14 fueron patogénicos en plántulas de pepino. La caracterización morfológica y la secuenciación de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr de 13 aislamientos permitió su identificación, las especies de *Pythium* encontradas fueron: un aislamiento de *P. aphanidermatum*, tres aislamientos de *P. cylindrosporum*, un aislamiento de *P. dissotocum*, dos aislamientos de *P. irregulare*, tres aislamientos de *P. splendens*, dos aislamientos de *P. ultimum* var. *ultimum* y un aislamiento *Pythium* sp. nov.

DETECTION AND IDENTIFICATION OF SPECIES OF *Phytophthora* and *Pythium* FROM ORNAMENTAL PLANT NURSERIES

GENERAL ABSTRACT

The use of ornamental plants as decorative elements has become very important throughout the world therefore, the exploitation and production of ornamental plants in nurseries is an activity that is developing successfully worldwide. The major producers in the world have adopted new techniques of cultivation and management to improve quality to be more competitive and export the products. In Mexico the production goes to local markets and only 10 % is exported, since the quality of the flowers produced is low and does not fulfill the standards demanded, due to the inadequate management practices during harvest and post harvest stages. Also every year the nursery industry suffers losses due to problems caused by pests or diseases caused by pathogens.

Due to the economic losses caused by pathogens studies have been conducted in different nurseries worldwide to detect their presence. *Phytophthora* and *Pythium* have been identified damaging ornamental plants and in irrigation water. In Mexico, the studies of diseases in nurseries are very rare, in some ornamental nurseries several pathogens have been reported such as *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp. *Euphorbiicola*, *Alternaria*, *Cladosporium fulvum*, *Rhizoctonia solani*, *Cercosporidium bougainvilleae* and *Pseudomonas* sp. In Michoacan *Phytophthora cinnamomi* has been detected in avocado nurseries. So far there are no reports of the presence of *Pythium*. Therefore, the objective of this study was to detect and identify the presence of *Phytophthora* and *Pythium* on diseased tissue and rhizosphere soil from different nurseries located in Morelia, Uruapan and Tarímbaro in Michoacan and from the state of Morelos. The samples of soil and diseased ornamental plants that showed symptoms of wilt, root rot, crown and stem rot or dieback were obtained from five nurseries of Morelia, one from Tarímbaro, one from Uruapan and two from Morelos.

Twenty six *Phytophthora* isolates were obtained from 16 different hosts that showed symptoms of wilt, root rot, crown rot or stem dieback. Based on morphological characteristics and ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA sequences, three isolates were identified as *P. cinnamomi*, one isolate as *P. nicotianae* x *P. cactorum*, one as *P. cactorum*, two isolates

as *P. nicotianae*, ten isolates as *P. capsici*, eight isolates as *P. drechsleri* and one isolate as *P. tropicalis*. Nineteen *Pythium* isolates were obtained from 17 ornamental plants species with wilt symptoms, from four nurseries of Morelia, Michoacán, of which 14 were pathogenic on cucumber seedlings. Morphological characterization and sequencing of the ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA of 13 isolates allowed the identification of seven *Pythium* species: one isolate as *P. aphanidermatum*, three isolates as *P. cylindrosporum*, one isolate as *P. dissotocum*, two isolates as *P. irregulare*, three isolates as *P. splendens*, two isolates as *P. ultimum* var. *ultimum* and one isolate as *Pythium* sp. nov.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La horticultura ornamental y su relación con el vivero

La horticultura ornamental comprende todas aquellas actividades encaminadas a la producción masiva de plantas ornamentales en lugares protegidos donde se aplican las mejores tecnologías de producción (Mundo-Ocampo, 2006). El viverismo es una actividad originada de la horticultura ornamental, la cual abarca en términos generales la producción de flores y plantas ornamentales (FIRA 1985; citado en Mundo-Ocampo, 2006).

El vivero es el terreno que puede estar bajo cubierta o a cielo abierto, destinado a la producción y multiplicación de árboles, arbustos, plantas de sombra, flores de corte, follajes, pastos, entre otros, en diferentes presentaciones (contenedores, recipientes, jardineras) con la finalidad de proporcionarle al consumidor un producto terminado o para trasplante; a un precio accesible, en la cantidad requerida y de alta calidad (Mundo-Ocampo, 2006). En concordancia con el término vivero, también se origina la palabra viverista que es la persona encargada de sembrar, injertar o propagar en el vivero, asimismo de cuidar el crecimiento y desarrollo de las plantas ornamentales hasta que lleguen al tamaño apropiado para su comercialización (Mundo-Ocampo, 2006).

El viverismo se ha practicado en México desde la época prehispánica, como actividad empresarial es relativamente nueva puesto que empezó a desarrollarse después de la segunda guerra mundial (INIFAP, 2009). Esta actividad en la actualidad representa una de las mejores oportunidades y alternativas para el sector agropecuario, ya que ofrece una alta rentabilidad por unidad de superficie y de generación de empleos permanentes (Mundo-Ocampo, 2006).

Actualmente en México, existen viveros forestales, donde se producen plántulas de diversas especies de árboles como jacaranda, pino, casuarina, entre otros, destinados a la plantación en áreas deforestadas; además existen viveros de plántulas de hortalizas y agroindustriales. También hay viveros dirigidos a la producción de plántulas ornamentales principalmente petunia, ciclamen y cempaxúchitl; recientemente se han establecido viveros dedicados a la producción de plántulas aromáticas y/o medicinales entre las que se puede mencionar la albahaca, salvia y menta que se trasplantan a campo. En términos generales los viveros

concentran actividades como son: la propagación de plantas anuales, semiperennes y perennes (Mundo-Ocampo, 2006) (Fig. 1).



Fig. 1. Vivero “Jardín del Cubilete” ubicado en Uruapan, Michoacán

Plantas ornamentales

Las plantas ornamentales son todas aquellas que el hombre ha tomado de la naturaleza para decorar un lugar o espacio ya sea en una casa, en un edificio o al aire libre. Las plantas ornamentales embellecen un lugar y le dan color, forma y armonía con el medio. Con la finalidad de obtener un beneficio de ellas, el hombre las comercializa, les da forma y estructura de acuerdo a la necesidad del lugar en que se desean utilizar. Por lo tanto su uso como elementos decorativos ha tomado gran importancia en todo el mundo; al igual que su explotación y producción. La producción de plantas ornamentales se ha incrementado notablemente en volumen y valor de producción así como en la comercialización. Los principales productores de plantas de ornato a nivel mundial han adoptado nuevas técnicas de cultivo y manejo, buscando mejorar la calidad para ser más competitivos y en algunos casos se especializan para poder exportar el producto (Chalate, *et al.*, 2008).

Principales países productores de plantas ornamentales en vivero

En Europa los principales países productores de plantas en vivero son: Holanda, Francia, Gran Bretaña y Alemania; en este último país las plantas ornamentales figuran en primer lugar con más de 50 % de la superficie total, sus productos se exportan principalmente a

Suecia, Holanda y Francia. Los viveros son de grandes dimensiones, muchas veces especializados en un tipo exclusivo de plantas, son altamente tecnificados y las plantas son de excelente calidad; la producción francesa se sitúa en segundo lugar (Mundo-Ocampo, 2006).

En Holanda 62 % de la superficie está dedicada al cultivo de plantas ornamentales, la cual va en aumento constante, este país es el principal exportador mundial de plantas de vivero y genera cerca de 50 % de la producción mundial (Foucard, 1997; citado en Mundo-Ocampo, 2006; Chalate *et al.*, 2008); además las flores producidas son de alta calidad y es el mercado central de flores del mundo puesto que posee un buen sistema de distribución apoyado por el excelente transporte terrestre y aéreo (Chalate *et al.*, 2008).

En Gran Bretaña existen unos 2, 000 viveros en los que se destina más de 50 % de la superficie a la producción de ornamentales (Foucard, 1997; citado en Mundo-Ocampo, 2006). En Norte América y en particular en Estados Unidos el sector productivo de flores ha venido adquiriendo importancia, el cultivo de plantas ornamentales en vivero es una actividad próspera y en desarrollo constante; en Centro y Sudamérica destacan Costa Rica, Honduras, Colombia y Brasil (Mundo-Ocampo, 2006). Otros países como Kenia, Israel, Italia y Tailandia están tomando importancia puesto que tienen buenas perspectivas de desarrollo para esta actividad, en especial por la diversificación de especies con las que cuentan, incorporación de tecnología y nuevas técnicas de manejo, que han sido estimuladas por un mercado mundial con demanda creciente conforme los niveles de ingreso mejoran y el consumo se diversifica (Chalate *et al.*, 2008).

Las plantas ornamentales de mayor consumo en el ámbito internacional corresponden a plantas con flor como las rosas, crisantemos, tulipanes, claveles, lirios, violetas y begonias, mientras que las plantas de follaje siguen siendo las más importantes al poseer mayor valor (Mundo-Ocampo, 2006; Chalate *et al.*, 2008). Los principales consumidores de plantas de vivero son Estados Unidos, Japón, Alemania, Francia y Gran Bretaña (Chalate *et al.*, 2008).

Producción de plantas ornamentales en vivero a nivel nacional

México es un país con fuerte tradición florícola y en general ornamental, cuenta con un abundante registro de especies nativas entre las que se encuentran la dalia (*Dahlia* sp.), begonia (*Begonia* sp.), nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), zinia (*Zinnia* sp.), cactus y diversas especies de orquídeas (Estrada 1987; citado en Mundo-Ocampo, 2006). Asimismo tiene un amplio potencial para producir plantas de ornato, por la diversidad de climas que permiten concentrar más de 349 variedades de flores de corte, plantas para macetas y hojas para follajes con usos ornamentales (Mundo-Ocampo, 2006).

Los principales estados productores de plantas ornamentales en el país son: Estado de México (5990.80 has), Puebla (3687.78 has), Morelos (1634.40 has), Jalisco (928.18 has), Michoacán (753.00 has) y San Luis Potosí (732.50 has) (Technical Working Party for Ornamentals, 2010).

Se calcula que existen cerca de 10, 000 productores, de los cuales el 95 % son pequeños y medianos productores. Las especies que tienen mayor importancia son las flores de corte que destacan por el valor de la producción e importancia socioeconómica que tienen en la región donde se producen como la gladiola, crisantemo, palma de ornato, pastos, cempaxúchitl y rosas (Chalate *et al.*, 2008). La producción de plantas de ornato tiene gran importancia, ya que se encuentran entre los cultivos de más alta rentabilidad, (Cortes, 2001; citado en Mundo-Ocampo, 2006) la producción de anturios en vivero es un ejemplo evidente (Mundo-Ocampo, 2006).

El cultivo de plantas ornamentales es una alternativa viable y rentable, debido a la demanda nacional e internacional de flores de corte en maceta, palmas y follajes. Según el Sistema de Información Agropecuaria México tuvo en el año 2005 una producción con valor de 2, 201.8 millones de pesos. El país ocupa el tercer lugar a nivel mundial en superficie dedicada a esta actividad; sin embargo, no figura dentro de los países más importantes, porque la producción se destina al mercado local y solo un 10 % se exporta (SAGARPA, 2006; Guiaverdeméxico, 2007; SIAP, 2006 citado en Chalate *et al.*, 2008).

La participación de México en el mercado internacional de plantas ornamentales es menor al 1 % del total mundial, pese al potencial productivo con que cuenta: climas, suelos, costos

de producción y mano de obra bajos y la cercanía a uno de los mercados más importantes como es Estados Unidos. La exportación de flores mexicanas se realiza principalmente a Estados Unidos, a partir del año 2000 México empezó a exportar a los Países Bajos. Otros países a los que México exporta flores son Canadá, Japón y Panamá. Durante los últimos años, la exportación de plantas ornamentales a Estados Unidos, China y Europa ha aumentado, lo cual provocó mayores controles de calidad en dichos países, y obligó a los productores y exportadores a ser más competitivos para mantener estos mercados (Chalate *et al.*, 2008).

Problemática de los viveros ornamentales en México

La floricultura en México es un sector con bajos niveles de productividad, baja calidad y volumen que no es constante, tiene poca innovación, falta capital para inversión y desconocimiento de los requisitos para exportar. Adicionalmente tiene problemas por el uso ilegal de semillas y falta de infraestructura para transporte (Wassenaar, 2003; citado en Chalate *et al.*, 2008). En los últimos años en la producción de plantas ornamentales se han desarrollado estrategias para mejorar la calidad del producto y aprovechar las ventajas competitivas con respecto a otros países. Sin embargo, a pesar de la gran variedad de flores producidas en México, el comercio exterior está limitado a un número muy reducido de especies, entre las que destacan la rosa, gladiola, statice, margarita y clavel. Además la calidad de las plantas producidas en el país en general es baja puesto que no se cumple con los estándares demandados, debido a que las prácticas de manejo en cosecha y postcosecha no son adecuadas (Chalate *et al.*, 2008). La producción de plantas ornamentales se enfrenta con una serie de dificultades debido a la falta de conocimientos técnicos, como propagación, fertilización, manejo de agua o comercialización (Mendoza, 1993 citado en Mundo-Ocampo, 2006). Aunado a lo anterior todos los años la industria del vivero sufre pérdidas debidas principalmente a problemas causados por plagas, al deficiente manejo nutrimental durante el desarrollo de las plantas y a enfermedades causadas por patógenos (Fritz, 1992; citado en Mundo-Ocampo, 2006), estas enfermedades se presentan principalmente en la producción de flor de corte y maceta (Mundo-Ocampo, 2006).

Patógenos detectados en viveros en México

En México los trabajos que existen sobre el estudio de enfermedades en viveros son muy escasos, se ha reportado en viveros forestales la presencia de varios patógenos entre los que se encuentran *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* causando ahogamiento en coníferas; pudriciones de raíz en latifoliadas causadas por *Rhizoctonia*, *Verticillium albo-atrum* y *Cylindrocladium*; muerte de follaje y brotes en coníferas por *Botrytis cinerea*; manchas y antracnosis en latifoliadas por *Septoria*, *Phyllosticta*, *Alternaria* y *Colletotrichum gloeosporoides*; mancha grasienta por *Phyllachora swietenia*; muerte apical y cuello en tallo por *Phomopsis*; muerte de tallo por *Phoma* y canchros por *Cytospora* (García-Díaz *et al.*, 2009).

En viveros ornamentales del estado de Morelos se han identificado varios patógenos, en nochebuena se ha reportado a *Fusarium* spp., causando pudrición de raíz, a *Botrytis cinerea* causando mancha gris, a *Oidium* sp. ocasionando cenicienta, a *Alternaria euphorbiicola* ocasionando la mancha de la hoja, a *Cladosporium fulvum* ocasionando el moho de la hoja, a *Rhizoctonia solani* causando pudrición en tallo y al virus mosaico del tabaco; en bugambilia se ha identificado a *Cercosporidium bougainvilleae* causando la peca de la hoja y al virus mosaico del tabaco; en tulipán se ha identificado a *Pseudomonas* sp., causando manchas foliares y en cedro limón se ha identificado a *Alternaria solani* causando manchas foliares (García *et al.*, 2009).

En Michoacán se ha detectado a *Phytophthora cinnamomi* en viveros de aguacate (Badillo *et al.*, 2005) y hasta ahora no existen reportes sobre la presencia de *Pythium*.

Enfermedades causadas por Oomicetes

Los oomicetes fitopatógenos más importantes pertenecen a los órdenes Saprolegniales y Peronosporales. Con lo que respecta a Saprolegniales, únicamente el género *Aphanomyces* tiene importancia como organismo fitopatógeno, ya que causa pudrición de raíz en muchas plantas anuales. El orden Peronosporales incluye algunos de los oomicetes fitopatógenos más importantes que se conocen, entre los que se encuentran los géneros *Pythium* y *Phytophthora* (Agrios, 2005).

Debido al crecimiento del cultivo de plantas ornamentales en vivero y a las pérdidas económicas producidas por patógenos se han realizado estudios en diferentes viveros a nivel mundial para detectar la presencia de éstos. Se ha FJ217679identificado a *Phytophthora* y a *Pythium* causando daños en plantas ornamentales y en agua de riego. En Estados Unidos, Alemania, Argentina y España entre las especies de *Phytophthora* que se han reportado se encuentran: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. foliorum*, *P. gonapodyides*, *P. hedraiandra*, *P. hibernalis*, *P. hydropathica*, *P. irrigata*, *P. “kelmania”*, *P. megasperma*, *P. nemorasa*, *P. nicotianae*, *P. “niederhauserii”*, *P. palmivora*, *P. “taxón Pgchlamydo”*, *P. pseudosyringae*, *P. ramorum*, *P. richardie*, *P. syringae*, *P. tentaculata*, *P. tropicalis* y *P. undulata* (Zitko *et al.*, 1987; MacDonald *et al.*, 1994; Ferguson y Jeffers 1999; Themann *et al.*, 2002; Warfield *et al.*, 2003; Cúndom *et al.*, 2004; Dart *et al.*, 2007; Schwingle *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008; Moralejo *et al.*, 2009; Yakabe *et al.*, 2009) (Cuadro 1).

Con respecto a las especies de *Pythium* se ha reportado a: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. intermedium*, *P. irregulare*, *P. pachycaule*, *P. paroecandrum*, *P. splendens*, *P. spinosum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* var. *ultimum* y *P. vexans* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Spies *et al.*, 2006; Al-Sa’di *et al.*, 2007); en agua de riego se ha identificado a *P. dissotocum*, *P. porphyrae*, *P. sulcatum* y *P. torulosum* (Kong *et al.*, 2004). En ocasiones se han detectado un mayor número de especies de *Pythium* que de *Phytophthora* como es el caso de Australia en donde se detectaron cuatro especies de *Phytophthora* y 13 de *Pythium* (Duff, 1993).

Cuadro 1. Especies de *Phytophthora* reportadas en viveros de plantas ornamentales y sus hospederos

Especies	Hospederos
<i>P. cactorum</i>	<i>Fragaria</i> x <i>ananassa</i> , <i>Acer rubrum</i> , <i>Acer taticum</i> , <i>Calycanthus floridus</i> , <i>Lonicera</i> sp., <i>Malus</i> sp., <i>Myrica pensylvanica</i> , <i>Prunus maackii</i> , <i>Pyrus calleryana</i> , <i>Rhododendron</i> sp., <i>Ribes alpinum</i> , <i>Viburnum prunifolium</i> , <i>Archostaphylous</i> sp., <i>Eucalyptus</i> sp., <i>Photinia</i> sp., <i>Pyracantha</i> sp., <i>Rhamnus</i> sp., <i>Sequoia</i> sp., <i>Toyon</i> sp. Agua de riego.
<i>P. capsici</i>	<i>Philodendron scadens</i> .
<i>P. cambivora</i>	<i>Quercus</i> sp., <i>Rhododendron</i> sp., <i>Pieris japonica</i> , <i>Quercus macrocarpa</i> , <i>Areca</i> sp. Agua de riego.
<i>P. cinnamomi</i>	<i>Quercus ilex</i> . Agua de riego.
<i>P. citrícola</i>	<i>Rhododendron</i> sp., <i>Quercus ilex</i> , <i>Cistus canariensis</i> , <i>Acer</i> sp., <i>Pieris japonica</i> , <i>Pieris</i> sp., <i>Verbena hybrida</i> , <i>Ceanothus</i> sp., <i>Viburnum tinus</i> , <i>Acer taticum</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Lonicera</i> spp., <i>Magnolia stellata</i> , <i>Pyrus calleryana</i> , <i>Quercus rubra</i> , <i>Rhus aromatic</i> , <i>Spiraea</i> × <i>bum</i> , <i>Syringa vulgaris</i> , <i>Tilia americana</i> , <i>Viburnum prunifolium</i> , <i>Arbutus</i> sp., <i>Archostaphylous</i> sp., <i>Ardisia</i> sp., <i>Magnolia</i> sp., <i>Myrtus</i> sp., <i>Photinia</i> sp., <i>Pyracantha</i> sp., <i>Ribes</i> sp., <i>Rhamnus</i> sp., <i>Sequoia</i> sp., <i>Syringa</i> sp., <i>Tristania</i> sp. Agua de riego.
<i>P. citrophthora</i>	<i>Arbutus unedo</i> , <i>Syringa</i> spp., <i>Rhododendron</i> spp., <i>Citrus sinensis</i> , <i>Salvia splendens</i> , <i>Dictamnus alba-purpureus</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Myrica pensylvanica</i> , <i>Rhus aromatica</i> , <i>Rhus</i> spp., <i>Rosa</i> sp., <i>Syringa vulgaris</i> , <i>Taxus</i> sp., <i>Archostaphylous</i> sp., <i>Camellia</i> sp., <i>Ficus</i> sp., <i>Laurus</i> sp., <i>Pieris</i> sp. Agua de riego.
<i>P. cryptogea</i>	<i>Pinus</i> sp., <i>Quercus ilex</i> , <i>Arbutus</i> sp. Agua de riego.
<i>P. drechsleri</i>	<i>Polygala myrtifolia</i> . Agua de riego.
<i>P. foliorum</i>	<i>Rhododendron</i> sp. Agua de riego.
<i>P. gonapodyides</i>	<i>Arbutus</i> sp., <i>Laurus</i> sp., <i>Sequoia</i> sp. Agua de riego.
<i>P. hedraiandra</i>	<i>Viburnum tinus</i> , <i>Viburnum trilobum</i> , <i>Rhododendron catawbiense</i> .
<i>P. hydropathica</i>	Agua de riego.
<i>P. irrigate</i>	Agua de riego.
<i>P. “kelmania”</i>	<i>Gerbera</i> sp., <i>Coleus</i> sp.
<i>P. megasperma</i>	<i>Hibiscus</i> sp., <i>Pieris</i> sp.

Cuadro 1. Continuación

Especies	Hospederos
<i>P. nemorosa</i>	<i>Camellia</i> sp., <i>Laurus</i> sp., <i>Osmanthus</i> sp., <i>Pieris</i> sp., <i>Rhododendron</i> sp.
<i>P. nicotianae</i>	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Rhododendron</i> sp., <i>Arbutus unedo</i> , <i>Cyclamen persicum</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Citrus sinensis</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Convolvulus</i> sp., <i>Ceanothus</i> sp., <i>Cistus canariensis</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Euphorbia</i> sp., <i>Magnolia stellata</i> , <i>Rhus aromatica</i> .
<i>P. "niederhauserii"</i>	<i>Cistus monspeliensis</i> , <i>Cistus salvifolius</i> y <i>Hedera</i> sp., <i>Laurus nobilis</i> .
<i>P. palmivora</i>	<i>Pittosporum</i> sp.
<i>P. "taxón Pgchlamydo"</i>	<i>Rhododendron</i> sp., <i>Taxus</i> sp., <i>Persea indica</i> , <i>Arbutus</i> sp., <i>Buxus</i> sp., <i>Camellia</i> sp., <i>Laurus</i> sp., <i>Magnolia</i> sp., <i>Pyrus</i> sp., <i>Rhamnus</i> sp., <i>Sequoia</i> sp., <i>Tristania</i> sp., <i>Viburnum</i> sp.
<i>P. pseudosyringae</i>	<i>Rhododendron</i> sp., <i>Camellia</i> sp., <i>Laurus</i> sp., <i>Pieris</i> sp.
<i>P. ramorum</i>	<i>Rhododendron</i> sp., <i>Camellia japonica</i> , <i>Viburnum tinus</i> , <i>Arbutus unedo</i> . Agua de riego.
<i>P. richardiae</i>	Agua de riego.
<i>P. syringae</i>	<i>Arbutus unedo</i> , <i>Rhododendron</i> sp., <i>Crataegus laevigata</i> , <i>Arbutus</i> sp., <i>Archtoostaphylos</i> sp., <i>Ardisia</i> sp., <i>Brachychiton</i> sp., <i>Camellia</i> sp., <i>Ceanothus</i> sp., <i>Escalonia</i> sp., <i>Ficus</i> sp., <i>Laurus</i> sp., <i>Lonicera</i> sp., <i>Magnolia</i> sp., <i>Osmanthus</i> sp., <i>Photinia</i> sp., <i>Pieris</i> sp., <i>Pyracantha</i> sp., <i>Rhamnus</i> sp., <i>Syringa</i> sp., <i>Tristania</i> sp., <i>Viburnum</i> sp. Agua de riego.
<i>P. tentaculata</i>	<i>Verbena</i> sp., y <i>Santolina chamaecyparissus</i> .
<i>P. tropicalis</i>	<i>Arbutus unedo</i> , <i>Allamanda</i> sp., y <i>Camellia</i> sp.
<i>P. undulata</i>	Agua de riego.

Síntomas de enfermedades causadas por *Phytophthora*

Este patógeno causa enfermedades en diversos tipos de plantas, incluyendo las ornamentales. La mayoría de las especies de este oomicete producen pudriciones radicales, marchitez, pudriciones en la base del tallo, ahogamiento de plántulas; otras especies ocasionan tizones en follaje o en ramas inmaduras. Algunas especies del patógeno son específicas de ciertos hospederos, pero otras tienen una amplia gama de hospedantes. En

unos cuantos días, semanas o meses la enfermedad puede destruir plántulas; en plantas adultas la muerte de las raíces depende de la cantidad de inóculo presente en el suelo, y de las condiciones ambientales. Los árboles viejos muestran follaje disperso, hojas más pequeñas y amarillentas o muerte regresiva de las ramas. Dichos árboles muestran un menor diámetro en el tronco y crecen muy poco. En todos los hospederos afectados por *Phytophthora* las raíces más pequeñas mueren y con frecuencia aparecen lesiones necróticas en las raíces más grandes. En plantas jóvenes todo el sistema radical puede podrirse y dar como resultado la muerte relativamente rápida de la planta (Agrios, 2005).

Ciclo de vida

La fase somática de *Phytophthora* la conforma el micelio el cual está constituido por hifas hialinas, ramificadas y cenocíticas. Los esporangios son esporas asexuales que se producen sobre pedicelos llamados esporangióforos. Los esporangios son de formas variables (Erwin y Ribeiro, 1996) y algunas veces presentan un engrosamiento apical que se denomina papila (Erwin y Ribeiro, 1996; Agrios, 2005). Ciertas especies de *Phytophthora* producen estructuras asexuales de resistencia llamadas clamidosporas de paredes gruesas. La reproducción asexual ocurre cuando los esporangios germinan de forma indirecta por medio de zoosporas o por medio de germinación directa produciendo un tubo germinal que después formará micelio o bien otro esporangio (Agrios, 2005). Las zoosporas poseen dos flagelos.

Las esporas sexuales características de este género son llamadas oosporas. Existen especies homotálicas y heterotálicas, en las primeras un solo talo puede formar oosporas, o bien involucra la unión de dos individuos con diferente tipo de compatibilidad llamados A1 y A2, en las especies heterotálicas (Erwin y Ribeiro, 1996). El gametangio femenino u oogonio es fertilizado por el gametangio masculino o anteridio por contacto gametangial desarrollándose una oospora de doble pared. *Phytophthora* puede permanecer en el suelo o en las raíces de las plantas que infecta en forma de oosporas, clamidosporas y/o micelio. El ciclo de la enfermedad puede variar dependiendo de la especie, se muestra el ciclo de una especie heterotálica (Fig. 2).

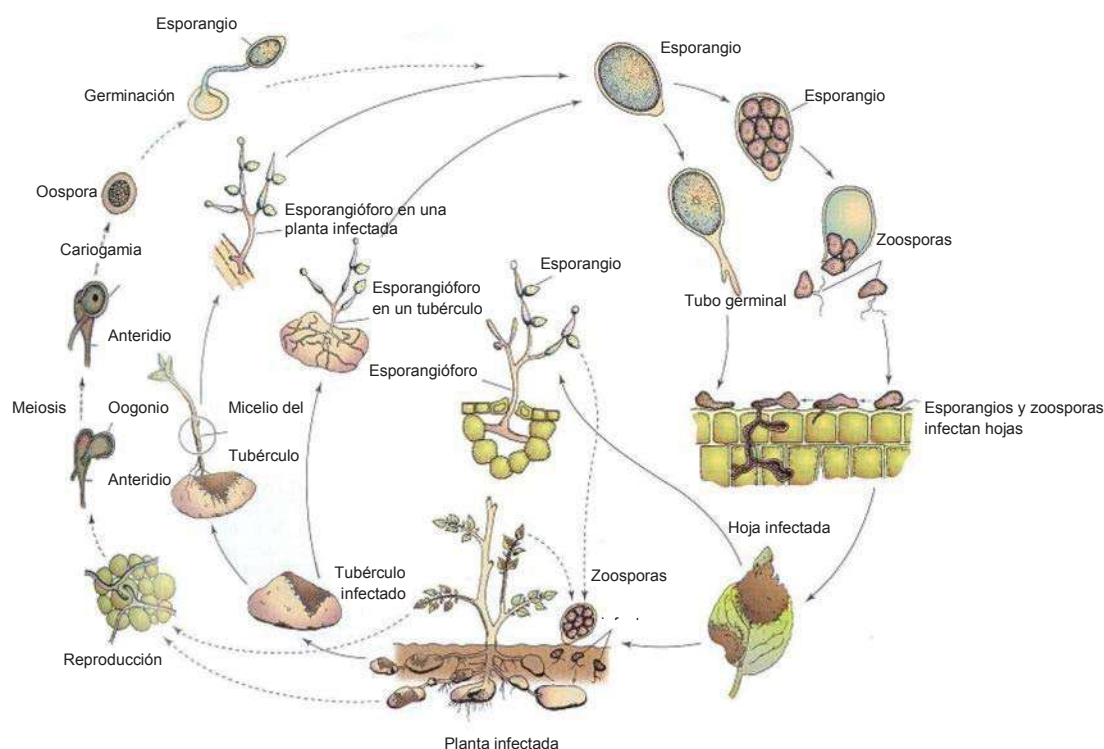


Fig.2. Ciclo de la enfermedad causada por *Phytophthora infestans* (Agrios, 2005)

Síntomas de enfermedades causadas por *Pythium*

Las especies de *Pythium* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y agua de todo el mundo. Pueden vivir como organismos saprófitos sobre restos de plantas muertas, causar daños en bosques o en cultivos agrícolas, en invernaderos y en viveros (MacDonald *et al.*, 1994; Agrios, 2005). Infecta semillas, plántulas y plantas adultas de hortalizas, árboles forestales y árboles frutales, entre otros. Sin embargo, en cualquiera de los casos los daños más importantes son los que sufren las semillas durante su germinación y las raíces de las plántulas ya sea antes o después de que emerjen del suelo. Las pérdidas debidas a enfermedades causadas por este patógeno varían considerablemente de acuerdo con la temperatura y la humedad del suelo. Cuando las semillas de plantas susceptibles se siembran en suelos infestados por este oomicete se ablandan, se tornan de color café, se contraen y finalmente se desintegran. Es difícil observar las infecciones de las semillas que se producen en el suelo y los únicos síntomas de la enfermedad consisten en una baja emergencia de plántulas. Sin embargo, las infecciones que produce *Pythium* sobre las plántulas pueden ocurrir después de que las semillas han emergido del suelo. Los tejidos de esas plántulas pueden ser atacados en cualquier punto. La infección inicial toma la

aparición de una mancha húmeda y ligeramente ennegrecida. La zona afectada se extiende con rapidez, las células invadidas se colapsan, toda la plántula es invadida por el oomicete y muere poco después de que se ha iniciado la infección. La porción basal del tallo de la plántula es mucho más delgada y blanda que las porciones aún no infectadas, lo cual hace que la plántula pierda firmeza y capacidad de soporte, dando como resultado que la plántula caiga al suelo. El patógeno continúa invadiendo a la plántula después de que ha caído sobre la tierra hasta producir su marchitamiento y muerte. Cuando plantas adultas son atacadas por *Pythium* casi siempre presentan pequeñas lesiones en el tallo, con frecuencia estas lesiones se limitan a las raíces secundarias, esto da como resultado el marchitamiento y muerte de los órganos aéreos de la planta (Agrios, 2005).

Ciclo de vida

Este oomicete forma un micelio constituido por hifas hialinas cenocíticas, filamentosas, profusamente ramificado y de rápido crecimiento. Los esporangios son esporas asexuales que presentan formas variadas. La reproducción asexual ocurre cuando los esporangios germinan directamente y producen uno o varios tubos germinales, o bien forman una hifa corta en el extremo a partir de la cual se forma una vesícula, dentro de la misma se forman hasta 100 zoosporas que al ser liberadas pueden permanecer en el suelo durante unos minutos, posteriormente se enquistan y luego germinan formando un tubo germinal. Por lo general, el tubo germinal penetra en los tejidos del hospedante para producir una nueva infección. La reproducción sexual implica la formación de oosporas, el gametangio femenino u oogonio es fertilizado por el gametangio masculino o anteridio por contacto gametangial desarrollándose una oospora de doble pared, las oosporas germinan ya sea produciendo tubos germinales o vesículas en las cuales se forman zoosporas. La forma de germinación está determinada principalmente por la temperatura del medio (Fig. 3), (Agrios, 2005). La mayoría de las especies son homotáticas (Dick, 1990).

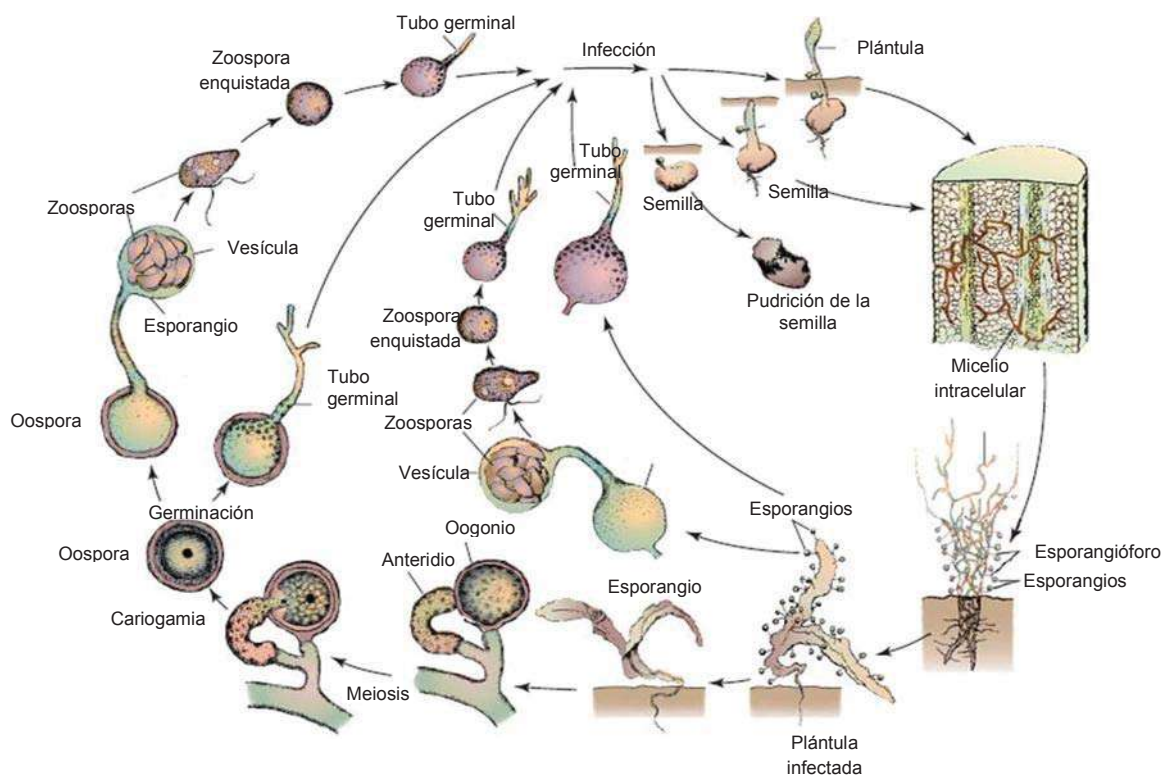


Fig 3. Ciclo de enfermedades causadas por *Pythium* sp., ahogamiento en plántulas y pudrición de semillas (Agrios, 2005)

Los estados de Michoacán y Morelos figuran dentro de los principales productores de plantas de ornato en el país (Technical Working Party for Ornamentals, 2010), en ambos estados el cultivo de plantas ornamentales en vivero es una actividad económica importante, sin embargo, las pérdidas económicas debidas a patógenos vegetales entre los que podrían encontrarse *Phytophthora* y *Pythium* son considerables. La pudrición de raíz, pudrición de la corona, marchitez y tizones foliares causados por especies de *Phytophthora* y *Pythium* son algunos de los síntomas más comunes en una amplia gama de cultivos ornamentales (MacDonald *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 2000; Moralejo *et al.*, 2009). Por lo tanto las enfermedades causadas por estos oomicetes son un problema constante en viveros debido a las dificultades en la detección y manejo. Por lo que es necesario detectar e identificar a las especies de *Phytophthora* y *Pythium* en viveros dedicados a la producción y venta de plantas ornamentales para mejorar las estrategias de manejo y reducir las pérdidas.

HIPÓTESIS

Los síntomas de marchitamiento en plantas ornamentales de vivero son causados principalmente por *Pythium* o *Phytophthora*.

Las especies de *Pythium* y *Phytophthora* que ocasionan el marchitamiento varían en los diferentes hospedantes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar e identificar especies de *Phytophthora* y *Pythium* en muestras de tejido vegetal enfermo y suelo procedentes de viveros de plantas ornamentales.

Objetivos específicos

1. Detectar a *Phytophthora* y *Pythium* en tejido vegetal enfermo y suelo de la rizosfera en diferentes viveros ubicados en los municipios de Morelia, Uruapan y Tarímbaro en Michoacán y en el estado de Morelos.
2. Caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Phytophthora* y *Pythium* obtenidos de viveros, con base en las estructuras sexuales y asexuales.
3. Determinar la secuencia de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal de los aislamientos obtenidos.
4. Identificar las especies de *Phytophthora* y *Pythium* de acuerdo con sus características morfológicas y con la secuenciación de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal.
5. Detectar a *Phytophthora* por medio de immunoStrips en tejido vegetal enfermo.

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* AISLADAS DE VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES

RESUMEN

La calidad de las plantas ornamentales producidas en México en general es baja puesto que no se cumple con los estándares demandados, ya que las prácticas de manejo en cosecha y postcosecha son inadecuadas. Aunado a lo anterior todos los años la industria del vivero sufre pérdidas debidas a problemas causados por plagas, al deficiente manejo nutrimental durante el desarrollo de las plantas y a enfermedades causadas por patógenos. Debido a las pérdidas económicas producidas por patógenos se han realizado estudios en viveros de varios países para detectar la presencia de estos. Se han identificado diversas especies de *Phytophthora* causando daños en plantas ornamentales y en agua de riego de viveros. No obstante en México los estudios realizados sobre problemas fitosanitarios son escasos y los estados de Michoacán y Morelos no son la excepción. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue detectar a *Phytophthora* en tejido vegetal enfermo y suelo de la rizosfera en diferentes viveros ubicados en los municipios de Morelia, Uruapan y Tarímbaro en Michoacán y Morelos. De muestras de cinco viveros de Morelia, uno de Tarímbaro, uno de Uruapan y dos de Morelos se obtuvieron 26 aislamientos de *Phytophthora* a partir de 16 especies de plantas ornamentales que mostraron síntomas de marchitez, pudrición radical, pudrición de corona y tallo o muerte regresiva. En base a las características morfológicas y a las secuencias de la regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, los aislamientos fueron identificados como *P. cinnamomi*, *P. nicotianae* x *P. cactorum*, *P. nicotianae*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. cactorum* y *P. tropicalis*.

CHAPTER I. IDENTIFICATION OF SPECIES OF *Phytophthora* ISOLATED FROM ORNAMENTAL PLANT NURSERIES

ABSTRACT

The quality of ornamental plants in Mexico in general is low since they do not fulfill the standards demanded, because the practices during harvest and post harvest stages are inadequate. In addition, every year the nursery industry suffers losses due to pest problems, the poor nutritional management during plant growth and to diseases caused by pathogens. Due to economic losses caused by pathogens some studies have been conducted in nurseries in several countries to detect their presence. Several species of *Phytophthora* have been identified causing damage on ornamental plants and from irrigation water of nurseries. However, in Mexico, studies conducted on plant health problems are rare and Michoacan and Morelos are not the exception. Therefore, the objective of this study was to detect *Phytophthora* on diseased tissue and rhizosphere soil from different nurseries located in the counties of Morelia, Tarimbaro and Uruapan in Michoacan and Morelos. From samples of five nurseries of Morelia, one from Tarimbaro, one from Uruapan and two from Morelos, 26 isolates were obtained from 16 different ornamental hosts that showed symptoms of wilt, root rot, crown rot or stem dieback. Based on morphological characteristics and of ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA sequences, the isolates were identified as *P. cinnamomi*, *P. nicotianae* x *P. cactorum*, *P. nicotianae*, *P. capsici*, *P. cactorum*, *P. drechsleri* and *P. tropicalis*.

1.1 INTRODUCCIÓN

El uso de plantas ornamentales como elementos decorativos en jardines e interiores ha tomado gran importancia en todo el mundo. A nivel internacional la demanda de estas plantas se concentra principalmente en Europa, América del Norte y Asia. En la actualidad aproximadamente 75 % del comercio internacional de flores se registra en Europa, el país con mayor participación es Holanda, seguido de Colombia (Chalate *et al.*, 2008).

El comercio de plantas ornamentales ha sido reconocido como una de las principales fuentes de introducción de patógenos exóticos (Jones y Baker, 2007; citado en Moralejo *et al.*, 2009), no obstante existen pocos estudios acerca de la diversidad de patógenos que acompañan a las especies vegetales que son transportadas de una región a otra. Oomicetes como *Phytophthora* son patógenos vegetales que pueden ser introducidos en un vivero a través de plantas, esquejes contaminados o por medio del agua de riego (MacDonald *et al.*, 1994; Yakabe *et al.*, 2009). Una vez en el vivero, el inóculo se dispersa comúnmente a través de gotas de agua que salpican de una planta a otra, a las malas prácticas culturales de poda o el movimiento de las plantas de un lugar a otro (Schwingle *et al.*, 2007).

Phytophthora causa daños en viveros ornamentales de todo el mundo, ocasionando grandes pérdidas económicas debido a que afecta todas las etapas del ciclo de producción (MacDonald *et al.*, 1994; Themann *et al.*, 2002a y 2002b) ya que es capaz de sobrevivir en suelo, residuos de plantas y agua. Las enfermedades causadas por éste patógeno incluyen entre otros síntomas pudriciones de tallo y raíz, muerte regresiva, marchitez, así como tizones foliares (Erwin y Ribeiro, 1996). El género *Phytophthora* incluye alrededor de 108 especies (Phytophthora database, 2010), todas patogénicas (Olsen, 2010); algunas presentan un amplio rango de hospedantes entre los que se incluyen plantas de ornato (Moralejo *et al.*, 2009).

Recientemente han sido detectadas algunas especies nuevas de *Phytophthora* aisladas de plantas ornamentales de viveros, lo que indica que el conocimiento del género es incompleto y que aún hay muchas especies sin identificar (Schwingle *et al.*, 2007).

En los últimos años las técnicas de inmunodetección han sido usadas de manera rutinaria en la detección de microorganismos fitopatógenos, principalmente virus y bacterias y en

menor escala para hongos. Una aplicación importante se ha encontrado en los estudios de taxonomía de microorganismos, la fisiología de la enfermedad y la ecología de los patógenos. Con el empleo de estas técnicas se pueden establecer estrategias de manejo de patógenos (Macías *et al.*, 2006). Sin embargo, se requieren métodos rápidos, que se puedan aplicar en campo; los ImmunoStrips (Phytophthora ImmunoStrip® Agdia) permiten identificar infecciones causadas por *Phytophthora* en un amplio rango de cultivos incluyendo plantas de vivero. Los ImmunoStrips están diseñados para realizar pruebas en campo o laboratorio a partir de muestras de tejido vegetal que presenten síntomas de enfermedades causadas por *Phytophthora* son extraordinarias por su rapidez y precisión, no se requiere de equipo especial para realizar la prueba, además esta se puede llevar a cabo en 30 minutos. El uso de los immunoStrips se recomienda como una herramienta preliminar en programas de control y detección del patógeno (Agdia Online Catalog, 2011).

La detección de *Phytophthora* mediante esta técnica ha permitido detectar algunas especies: *P. alni*, *P. boehmeriae*, *P. cactorum*, *P. cajani*, *P. cambivora*, *P. canalensis*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. erythroseptica*, *P. europaea*, *P. fragariae*, *P. gonapodyides*, *P. heveae*, *P. hibernalis*, *P. infestans*, *P. kernoviae*, *P. meadii*, *P. medicaginis*, *P. megasperma*, *P. melonis*, *P. nemorosa*, *P. nicotianae*, *P. "niederhauserii"*, *P. palmivora*, *P. parvispora*, *P. pistaciae*, *P. porri*, *P. pseudotsugae*, *P. quercina*, *P. ramorum*, *P. richardiae*, *P. sinensis*, *P. siskiyouensis*, *P. sojae*, *P. syringae*, *P. tropicalis* y *P. uliginosa* (Agdia Online Catalog, 2011).

Conjuntamente a la detección de *Phytophthora* es necesario identificar las diferentes especies de este género. Los métodos de taxonomía clásicos para la identificación de especies de este oomicete están basados en caracteres morfológicos tales como características de los esporangios (papilado, semipapilado o sin papila), la posición del anteridio (parágino o anfigino), el tipo de compatibilidad, si el aislamiento es homotático o heterotático y los patrones de crecimiento de la colonia (Stamps *et al.*, 1990). Esta forma de identificación ampliamente utilizada en años anteriores no siempre es confiable debido a la variabilidad de características dentro del género y a que varias especies comparten algunas de estas características (Erwin y Ribeiro, 1996).

Existen técnicas alternativas para la identificación rápida de especies del género *Phytophthora*; entre las que se incluyen la secuenciación de las regiones de los espaciadores transcritos internos ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal (ADNr) (Fig. 4). El análisis de estas secuencias ha sido usado exitosamente para la identificación de especies en estudios recientes (Schwingle *et al.*, 2007; Warfield *et al.*, 2008; Moralejo *et al.*, 2009; Yakabe *et al.*, 2009) ya que la mayoría de las especies tienen secuencias ITS únicas. Asimismo, presentan otras ventajas como la existencia de iniciadores universales para amplificar dicha región, son secuencias variables con gran número de copias lo que facilita su amplificación, polimórficas en longitud, las secuencias son muy informativas y representan una huella genómica para cada organismo (Rodríguez *et al.*, 2004). Este análisis se realiza comúnmente pues mediante estas secuencias es posible distinguir especies de *Phytophthora* morfológicamente similares (Cooke, *et al.*, 2000). Los datos adicionales aportados por las secuencias de marcadores como los genes citocromo oxidasa II (coxII) y β tubulina son necesarios para corroborar la identidad de grupos taxonómicos que no pueden ser resueltos basados en datos con las secuencias de la región ITS del ADNr. El uso de las secuencias de estos genes está recibiendo cada vez mayor atención. El gen coxII se ha utilizado especialmente en estudios en los cuales se intenta explorar las relaciones filogenéticas entre organismos a niveles taxonómicos bajos. El gen de β tubulina se ha usado en la reconstrucción filogenética de hongos a todos los niveles taxonómicos; sin embargo, ha sido poco usado en oomicetes como *Phytophthora* o *Pythium* (Villa *et al.*, 2006).

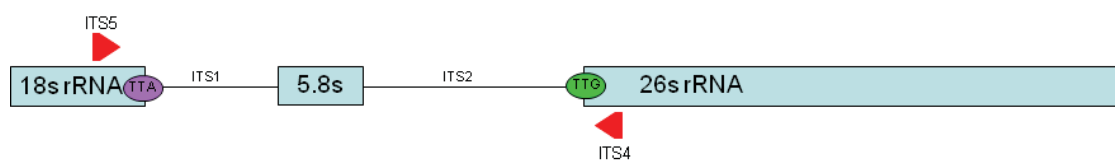


Fig.4. Genes ribosomales y sus espacios intergénicos. Los iniciadores para amplificar los espacios intergénicos también están indicados (Phytophthora database, 2010).

Por lo anterior los marcadores moleculares basados en el ADN han demostrado ser una excelente herramienta en estudios taxonómicos, estimación de relaciones evolutivas y variabilidad genética e identificación de diferentes organismos, apoyados en gran medida

con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, técnica utilizada por su alta especificidad y sensibilidad (Rodríguez *et al.*, 2004).

En México la producción de plantas ornamentales en vivero es una actividad que ofrece una alta rentabilidad y que genera empleos permanentes, sin embargo, se ve afectada principalmente por enfermedades causadas por patógenos como *Phytophthora*, no obstante los estudios realizados sobre los daños ocasionados por este patógeno son escasos y Michoacán y Morelos no son la excepción. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue detectar e identificar especies *Phytophthora* en tejido vegetal enfermo y suelo de la rizosfera en diferentes viveros ubicados en los municipios de Morelia, Uruapan y Tarímbaro en Michoacán y Morelos.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Colecta de muestras

Se obtuvieron aislamientos de muestras de tejido vegetal enfermo a partir de las siguientes especies: *Buxus sempervirens*, *Petunia* sp., *Gardenia jasminoides*, *Capsicum annum*, *Gerbera* sp., *Gazania rigens*, *Cestrum nocturnum*, *Euphorbia pulcherrima*, *Pentas lanceolata*, *Arctotis* sp., *Epipremnum aureum*, *Petunia* x *hybrida*, *Dianthus barbatus*, *Rhododendron indicum*, *Gazania* sp. y *Cataranthus roseus* y suelo de nueve viveros de los municipios de Tarímbaro (1), Uruapan (1) y Morelia (5) en Michoacán y dos provenientes de viveros del estado de Morelos que se adquirieron en el Distrito Federal y Morelia. Cabe mencionar que en todos los viveros muestreados las plantas que se venden provienen de diferentes estados de la República. El 100 % de las plantas muestreadas presentaban síntomas de marchitez, ocasionalmente mostraban pudrición en tallos, corona o raíz y muerte regresiva. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

1.2.2 Obtención de aislamientos

Los aislamientos se hicieron directamente de suelo o de las secciones de raíces, corona, ramas o tallos de las plantas con síntomas.

Tejido vegetal

- 1) Se realizaron cortes de tejido de 5 a 10 mm² a partir del borde de la lesión.
- 2) Los cortes se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 10 % durante 30 segundos. Algunos cortes únicamente se enjuagaron con agua.
- 3) Las secciones de tejido se colocaron en una caja Petri con medio selectivo de harina de maíz (PARNH) con: pentacloronitrobenceno o PCNB (0.10 g L⁻¹), Ampicilina (0.27 g L⁻¹), Rifampicina (0.01 g L⁻¹), Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50 % natamicina, 50 % lactosa)] e Himexazol (0.075 g L⁻¹); los cortes se colocaron también en medio selectivo V8 (PARN) con: PCNB (0.10 g L⁻¹), Ampicilina (0.27 g L⁻¹), Rifampicina (0.01 g L⁻¹) y Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) (ver anexo I).
- 4) Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C) hasta que se observó el crecimiento de colonias.

Suelo o sustrato de siembra

- 1) De la rizosfera de las diferentes plantas enfermas, se tomaron muestras de suelo de 10 g y se colocaron en una caja Petri con 20 ml de agua destilada estéril, se usó como cebo discos y hojas completas de azalea (*Rhododendron indicum*) que se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C).
- 2) Los discos o las hojas completas se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 1 % durante 30 segundos.
- 3) Se sembraron en medio selectivo de harina de maíz (PARNH).
- 4) Se incubaron a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C) hasta que se observó el crecimiento de colonias.

A partir de los aislamientos puros se obtuvieron cultivos de punta de hifa, se crecieron en medio de harina de maíz y se almacenaron a 15 °C en tubos de microcentrífuga con agua destilada estéril.

1.2.3 Caracterización morfológica

La taxonomía tradicional hace uso de criterios morfológicos y fisiológicos para clasificar organismos del género *Phytophthora*, incluyendo la morfología de los esporangios (papilados, sin papila, semipapilados), es por esto que la caracterización de los aislamientos obtenidos se realizó mediante la observación de la presencia de los esporangios típicos del género (Erwin y Ribeiro, 1996). Además se observó el tipo de micelio y se determinó si tenía hinchamientos, si los esporangios presentaban papila, si eran caducos o persistentes, el tipo de ramificación del esporangióforo, la presencia o ausencia de clamidosporas y de oosporas, tipo de oospora y de anteridio (anfigino y/o parágino) o si el aislamiento era homotático o heterotático (Stamps *et al.*, 1990). Se realizaron mediciones de esporangios, oosporas y clamidosporas cuando estuvieron presentes. Se determinó también su crecimiento a una temperatura de 35 °C.

Para determinar las características morfológicas los aislamientos se crecieron en medio de harina de maíz (Fluka analytical®), en medio V8-agar o en medio agar-zanahoria (ver Anexo I). Se mantuvieron en obscuridad a 25 °C.

Producción de esporangios

Se cortaron cuadros de micelio de los aislamientos de 4 a 5 días de crecimiento y se cubrieron con agua destilada estéril hasta que se observó producción de esporangios, con algunos aislamientos fue necesario agregar extracto de suelo (ver Anexo I) para observar esporulación. Se incubaron a 25 °C.

1.2.4 Determinación del tipo de compatibilidad

Para determinar los tipos de compatibilidad de los aislamientos heterotáticos colectados en viveros se utilizaron los aislamientos de referencia de *P. cinnamomi* A1 (A1 *P. cinnamomi*) y A2 (A2 *P. cinnamomi*) y los aislamientos de *P. capsici* A1 (chile perón) y A2 (3C2, chile) procedentes del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF.

Se colocó un disco de micelio de un aislamiento con tipo de compatibilidad A1 en cajas Petri con medio V8-agar y en otra caja se colocó un disco de micelio de un aislamiento con tipo de compatibilidad A2. En cada una de esas cajas se colocó un disco de micelio del aislamiento del cual se quería determinar el tipo de compatibilidad, aproximadamente a un centímetro de distancia. Las cajas se incubaron a 25 °C durante aproximadamente 15 días. Posteriormente se observó con un microscopio óptico el crecimiento micelial de ambos aislamientos, para determinar si ocurrió la formación de oosporas. En los casos donde se observaron oosporas, se asignó al aislamiento el tipo de compatibilidad complementario al que fue expuesto. Los aislamientos identificados como *P. capsici* y *P. cinnamomi* se cruzaron con aislamientos de referencia de estas especies, los de *P. nicotianae* con aislamientos de referencia de *P. capsici*, los de *P. drechsleri* con aislamientos de referencia de *P. cinnamomi* y el de *P. tropicalis* con aislamientos de referencia de *P. capsici*.

1.2.5 Identificación de especies de *Phytophthora* mediante secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal (ADNr)

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN de cada aislamiento se extrajo a partir de micelio, para lo cual se usó el protocolo descrito por Goodwin (1992) con modificaciones (ver anexo II).

Amplificación de ADN por PCR para identificación de especies

Para amplificar la región de los espacios transcritos internos (ITS1, 5.8S e ITS2) se utilizaron los oligonucleótidos ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), los cuales hibridizan dentro de los genes 18S ADNr y 28S ADNr. Las condiciones usadas para la realización del PCR fueron las siguientes: 4 minutos a 95 °C, 34 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, 2 minutos a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % para determinar el grado de amplificación. Se purificaron con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System–Promega), y se enviaron a la compañía Macrogen, ubicada en Corea del Sur para la secuenciación del ADN amplificado. Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron usando BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000) y en Phytophthora Database.

Para establecer las relaciones filogenéticas entre las especies de *Phytophthora*, las secuencias consenso obtenidas de cada aislamiento se compilaron en un archivo fasta y se alinearon con el profile mode del Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007).

El árbol filogenético se construyó con el método de Máxima Parsimonia utilizando 836 pares de bases correspondientes al espacio Transcrito Interno del ADNr, se usó la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (level=1), con un tree initial con adiciones al azar (10 REPS), los gap/missing se consideraron como delecciones.

Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis bootstrap con 1,000 repeticiones al azar (Felsenstein, 1985). Las secuencias de referencia de cada una de las especies encontradas en este trabajo se obtuvieron del GenBank (NCBI), *Pythium aphanidermatum* número de acceso FJ415896 se asignó como fuera de grupo.

1.2.6 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron para determinar si *Phytophthora* era el agente causal de las enfermedades observadas en vivero y cumplir así con los postulados de Koch.

Aislamientos obtenidos de raíz

Los aislamientos de *Phytophthora* obtenidos de *Capsicum annuum* se inocularon en 8 a 18 plántulas por aislamiento, en función del número de plántulas disponibles. En el caso de *Gerbera* sp., *Pentas lanceolata*, *Petunia* sp., *Petunia* x *hybrida*, *Gazania rigens*, *Gazania* sp. y *Dianthus barbatus* las pruebas de patogenicidad se realizaron en 8 plántulas por aislamiento y 4 fueron usadas como control. Estas tenían de 20 a 27 días de crecimiento y fueron proporcionadas por la compañía “Plántulas de Tetela” ubicada en el estado de Morelos. El aislamiento obtenido de *Euphorbia pulcherrima* se inoculó en dos plantas y dos se usaron como control. Durante el experimento todas las plántulas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C), se colocaron en charolas con agua destilada para mantener el suelo saturado.

El inóculo se obtuvo creciendo cada aislamiento en medio V8-agar durante 5 a 7 días, la producción de esporangios se hizo cortando cuadros de micelio de los aislamientos, posteriormente se cubrieron con agua destilada estéril o extracto de suelo; se mantuvieron en obscuridad a 25 °C hasta que se observó esporulación. La liberación de zoosporas se indujo incubando los aislamientos a 4 °C durante 30 a 45 minutos, posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente (24 °C - 29 °C) durante 30 minutos. El conteo de zoosporas se hizo usando una cámara de Neubauer. Se utilizó 1 ml. de una suspensión de zoosporas con una concentración entre 1000 y 6000 zoosporas/ml por cada plántula, dependiendo de la producción de cada aislamiento. Las plántulas que se usaron como testigo se inocularon con 1 ml de agua destilada estéril.

Aislamientos obtenidos de órganos aéreos

La inoculación de los aislamientos obtenidos de *Euphorbia pulcherrima* y *Cataranthus roseus* se realizó creciendo los aislamientos en medio V8-agar durante 5 a 7 días, de los cuales se cortaron discos de micelio de 8 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Antes de inocular las plantas se hizo una punción en las ramas usando una aguja de disección

estéril, una vez hecha la herida en el hospedero se colocó encima un disco de micelio y se cubrió con parafilm.

Se usaron de 2 a 3 plantas para las pruebas de patogenicidad por aislamiento y en cada planta se inocularon 3 ramas. Las plantas que se usaron como control se inocularon de la misma forma, usando discos de medio V8-agar estéril. Durante el experimento las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con un rango de temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se cubrieron con bolsas de polipapel durante 24 horas para mantener condiciones de alta humedad.

1.2.7 Detección de *Phytophthora* mediante el uso de ImmunoStrips

Se usó el kit comercial *Phytophthora* ImmunoStrip® Agdia. Se tomaron muestras de tejido vegetal enfermo, luego se colocaron dentro de la bolsa con el búfer. Se hizo una dilución aproximada de 1:20, para lo que se requirieron aproximadamente 15 g de muestra. Se colocó una muestra por bolsa y se etiquetó. El tejido enfermo dentro de la bolsa se maceró presionando con unas tijeras. La tira (immunoStrip) se tomó de la parte superior sin quitar la cubierta protectora y se sumergió en posición vertical en la bolsa que contenía la muestra macerada, no más de 0.5 cm, asegurándose de que permaneciera en contacto con el extracto durante la prueba (Fig. 5).

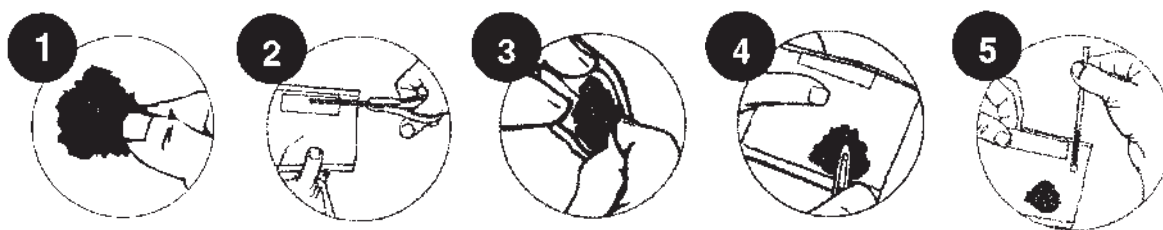


Fig. 5. Instrucciones para el uso de Agdia ImmunoStrip (Instructions for Agdia ImmunoStrip™ Test, 2010). 1) Tejido enfermo, 2) La parte superior de la bolsa que contiene el búfer se corta, 3) La muestra se coloca dentro de la bolsa con el búfer, 4) El tejido enfermo dentro de la bolsa se macera, 5) La tira (immunoStrip) se sumerge en posición vertical en la bolsa.

Interpretación de los resultados

La línea control aparece de 3 a 5 minutos después de que la tira entra en contacto con la muestra, el tiempo de reacción máximo es de 30 minutos, la tira debe retirarse después de

este periodo. La línea control indica que la prueba está funcionando correctamente, si la línea control no aparece, la prueba no es válida. Si la muestra es negativa, únicamente la línea control aparecerá. Si la muestra es positiva, la línea de prueba también aparecerá, es decir se observarán dos líneas. Las líneas van de color rojo a púrpura y la intensidad del color de la línea de prueba puede variar (Fig. 6).

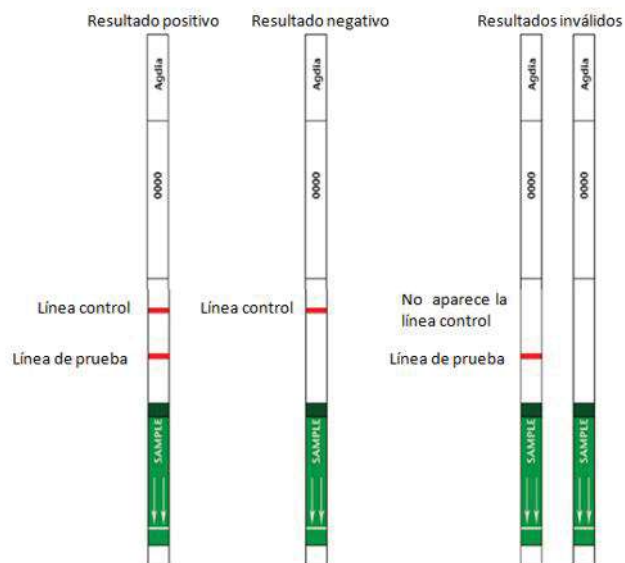


Fig. 6. Interpretación de resultados de Agdia ImmunoStrip (Instructions for Agdia ImmunoStrip™ Test, 2010).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Plantas ornamentales infectadas por *Phytophthora*

De las muestras obtenidas en los nueve viveros muestreados ubicados en Morelia (5), Tarímbaro (1) y Uruapan (1), Michoacán y en el estado de Morelos (2), se obtuvieron 26 aislamientos de *Phytophthora* a partir de 16 especies de plantas ornamentales que mostraron síntomas de marchitez, pudrición radical, pudrición de corona y tallo o muerte regresiva y que se mencionan a continuación: arrayán (*Buxus sempervirens* L.), petunia doble (*Petunia* sp.), gardenia [*Gardenia jasminoides* (J). Ellis], chile ornamental (*Capsicum annuum* L.), gerbera (*Gerbera* sp.), gazania gris [*Gazania rigens* (L). Gaertn], huele de noche (*Cestrum nocturnum* L.), nochebuena [(*Euphorbia pulcherrima* (Willd. ex Klotzsch)], penta (*Pentas lanceolata* Forssk), margarita africana (*Arctotis* sp), gazania (*Gazania* sp.), teléfono [*Epipremnum aureum* (Linden & André) G. S. Bunting], petunia (*Petunia* x *hybrida* Vilm.), clavellina (*Dianthus barbatus* L.), azalea (*Rhododendron indicum* Sweet.) y vinca (*Cataranthus roseus* (L.) G. Don.] (Cuadro 2).

1.3.2 Especies detectadas mediante caracterización morfológica y molecular

En base a las características morfológicas (Fig. 7) y a las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, los aislamientos obtenidos fueron identificados como *P. cinnamomi*, *P. nicotianae* x *P. cactorum*, *P. nicotianae*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. cactorum* y *P. tropicalis* (Cuadros 3 y 4). Las especies homotálicas y heterotálicas se muestran en el Cuadro 5. Para el caso de las heterotálicas se menciona el tipo de compatibilidad.

Cuadro 2. Plantas ornamentales con síntomas de marchitez, pudrición o muerte regresiva de las que se obtuvieron aislamientos de *Phytophthora*

Código	Hospedero	Síntomas	Localidad/Vivero	Año de colecta
PV3	<i>Buxus sempervirens</i>	Marchitez	Morelia/Alcatraz	2009
PV9	<i>Petunia</i> sp.	Pudrición de corona y raíz	Morelia/Alcatraz	2009
PV12	<i>Buxus sempervirens</i>	Marchitez	Morelia/Xochimilco	2009
PV14	<i>Gardenia jasminoides</i>	Marchitez	Morelia /Xochimilco	2009
PV15	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Morelia/Xochimilco	2009
PV16	<i>Petunia</i> sp.	Pudrición de corona y raíz	Morelia/El Tropical	2009
PV27	<i>Gerbera</i> sp.	Marchitez	Morelia/Paraíso 2	2009
PV29	<i>Gazania rigens</i>	Pudrición de corona	Morelia/El Tropical	2009
PV30	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Tarímbaro/Campestre	2009
PV31	<i>Cestrum nocturnum</i>	Marchitez	Tarímbaro/Campestre	2009
PV33	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Morelos/Tecnoflor	2009
PV34	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Tarímbaro/Campestre	2009
PV35	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Tarímbaro/Campestre	2009
PV36	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Tarímbaro/Campestre	2009
PV37	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Pudrición de tallo y raíz	Uruapan/Jardín del Cubilete	2009
PV38	<i>Pentas lanceolata</i>	Muerte regresiva	Uruapan/Jardín del Cubilete	2009
PV39	<i>Arctotis</i> sp.	Pudrición de corona y raíz	Uruapan/Jardín del Cubilete	2009
PV40	<i>Gazania</i> sp.	Marchitez	Uruapan/Jardín del Cubilete	2009
PV41	<i>Epipremnum aureum</i>	Marchitez	Tarímbaro/Campestre	2009
PV42	<i>Petunia x hybrida</i>	Marchitez	Uruapan/Jardín del Cubilete	2009
PV43	<i>Dianthus barbatus</i>	Pudrición de corona y raíz	Uruapan/Jardín del Cubilete	2009
PV44	<i>Solanum ovigerum</i>	Marchitez	Morelia/Alcatraz	2010
PV45	<i>Rhododendron indicum</i>	Marchitez	Morelia/Xochimilco	2010
PV46	<i>Capsicum annuum</i>	Marchitez	Morelia/Xochimilco	2010
PV47	<i>Gerbera</i> sp.	Marchitez	Morelos/Floramundo	2010
PV48	<i>Cataranthus roseus</i>	Pudrición de ramas	Morelia/S/N*	2010

*Vivero sin nombre

Cuadro 3. Especies de *Phytophthora* identificadas

Código	Especies de <i>Phytophthora</i>	BLAST % de similitud
PV3	<i>P. cinnamomi</i>	99
PV9	<i>P. cactorum</i>	96
PV12	<i>P. cinnamomi</i>	99
PV14	<i>P. nicotianae</i>	100
PV15	<i>P. capsici</i>	99
PV16	<i>P. nicotianae</i> x <i>cactorum</i>	99
PV27	<i>P. drechsleri</i>	99
PV29	<i>P. drechsleri</i>	100
PV30	<i>P. capsici</i>	99
PV31	<i>P. capsici</i>	100
PV33	<i>P. capsici</i>	99
PV34	<i>P. capsici</i>	100
PV35	<i>P. capsici</i>	100
PV36	<i>P. capsici</i>	100
PV37	<i>P. drechsleri</i>	100
PV38	<i>P. drechsleri</i>	100
PV39	<i>P. drechsleri</i>	99
PV40	<i>P. drechsleri</i>	99
PV41	<i>P. capsici</i>	99
PV42	<i>P. drechsleri</i>	99
PV43	<i>P. nicotianae</i>	99
PV44	<i>P. capsici</i>	99
PV45	<i>P. cinnamomi</i>	99
PV46	<i>P. capsici</i>	100
PV47	<i>P. drechsleri</i>	100
PV48	<i>P. tropicalis</i>	99

Cuadro 4. Características morfológicas de los aislamientos de *Phytophthora*

Especie	Características morfológicas
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Aislamientos heterotálicos. Esporangios sin papila, persistentes, de forma ovoide, las dimensiones fueron de 25-35 μ x 40-52.5 μ , clamidosporas abundantes, ocasionalmente se observaron agrupadas, terminales e intercalares, las dimensiones fueron de 25-42.5 μ x 22.5-42.5 μ , hinchamientos abundantes e irregulares en el micelio, no se observó crecimiento a 35 °C. Oosporas pleróticas, anteridios anfiginos.
<i>Phytophthora drechsleri</i>	Aislamientos heterotálicos. Esporangios sin papila, de forma ovoide, persistentes, ocasionalmente presentaron un hinchamiento en la base, las dimensiones fueron de 27.5-35 μ x 35-45 μ , con proliferación interna, hinchamientos en el micelio en grupos, se observó crecimiento a 35 °C.
<i>Phytophthora capsici</i>	Nueve aislamientos fueron heterotálicos, uno fue homotálico. Esporangios papilados, algunos presentaron doble papila, caducos, de forma ovoide aunque a veces presentaron formas variadas, pedicelo ocasionalmente lateral en algunos esporangios, las dimensiones de los esporangios variaron entre aislamientos, clamidosporas terminales e intercalares, estuvieron presentes en 6 aislamientos, se observó crecimiento a 35 °C, oosporas pleróticas, anteridios anfiginos.
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Aislamientos heterotálicos. Esporangios papilados, ocasionalmente presentaron dos papilas, persistentes, de forma casi esférica, las dimensiones fueron de 20-40 μ x 30-55 μ ; clamidosporas terminales e intercalares, las dimensiones variaron entre 22.5-32.5 μ x 22.5-32.5 μ , hinchamientos en el micelio, se observó crecimiento a 35 °C.
<i>Phytophthora nicotianae</i> x <i>cactorum</i>	Aislamiento homotálico. Esporangios papilados, persistentes, las dimensiones variaron entre 25-35 μ x 22.5-32.5 μ , esporangióforo en simpodio simple, se observaron hinchamientos en el micelio, clamidosporas terminales e intercalares, las dimensiones variaron entre 22.5-32.5 μ x 22.5-32.5 μ ; oosporas pleróticas con dimensiones entre 30-32.5 μ x 27.5-32.5 μ , anteridios anfiginos y paráginos, 1 anteridio por oogonio. No se observó crecimiento a 35 °C.

Cuadro 4. Continuación

Especie	Características morfológicas
<i>P. tropicalis</i>	Aislamiento heterotálico. Esporangios papilados, caducos, las dimensiones variaron entre 42.5-37.5 μ x 35-30 μ , esporangióforo ramificado en una umbela, clamidosporas terminales, las dimensiones variaron entre 32.5-37.5 μ x 40-32.5 μ . No se observó crecimiento a 35 ° C.
<i>P. cactorum</i>	Aislamiento homotálico. Esporangios papilados, persistentes, las dimensiones variaron entre 27.5-35 μ x 22.5-27.5 μ , esporangióforo en simpodio simple, se observaron hinchamientos en el micelio, clamidosporas terminales e intercalares, las dimensiones variaron entre 25-32.5 μ x 22.5-30 μ , oosporas pleróticas con dimensiones entre 32.5-35 μ x 32.5-35 μ , anteridios anfiginos y paráginos, 1 anteridio por oogonio. No se observó crecimiento a 35 °C.

Cuadro 5. Tipo de compatibilidad de los aislamientos de *Phytophthora* obtenidos de plantas ornamentales con síntomas de marchitez, pudrición o muerte regresiva

Código	Especies de <i>Phytophthora</i>	TC
PV3	<i>P. cinnamomi</i>	A2++
PV9	<i>P. cactorum</i>	H*
PV12	<i>P. cinnamomi</i>	A2
PV14	<i>P. nicotianae</i>	A2
PV15	<i>P. capsici</i>	A1+
PV16	<i>P. nicotianae</i> x <i>cactorum</i>	H
PV27	<i>P. drechsleri</i>	A2
PV29	<i>P. drechsleri</i>	ND**
PV30	<i>P. capsici</i>	A1
PV31	<i>P. capsici</i>	H
PV33	<i>P. capsici</i>	A1
PV34	<i>P. capsici</i>	A1
PV35	<i>P. capsici</i>	A1
PV36	<i>P. capsici</i>	A1
PV37	<i>P. drechsleri</i>	A2
PV38	<i>P. drechsleri</i>	A2
PV39	<i>P. drechsleri</i>	A1
PV40	<i>P. drechsleri</i>	A1
PV41	<i>P. capsici</i>	A2
PV42	<i>P. drechsleri</i>	A1
PV43	<i>P. nicotianae</i>	A2
PV44	<i>P. capsici</i>	A1
PV45	<i>P. cinnamomi</i>	A2
PV46	<i>P. capsici</i>	A1
PV47	<i>P. drechsleri</i>	A2
PV48	<i>P. tropicalis</i>	ND

TC: tipo de compatibilidad de especies heterotálicas; H*: Homotálico; ND**: No Determinado; + Tipo de compatibilidad A1; ++ Tipo de compatibilidad A2.

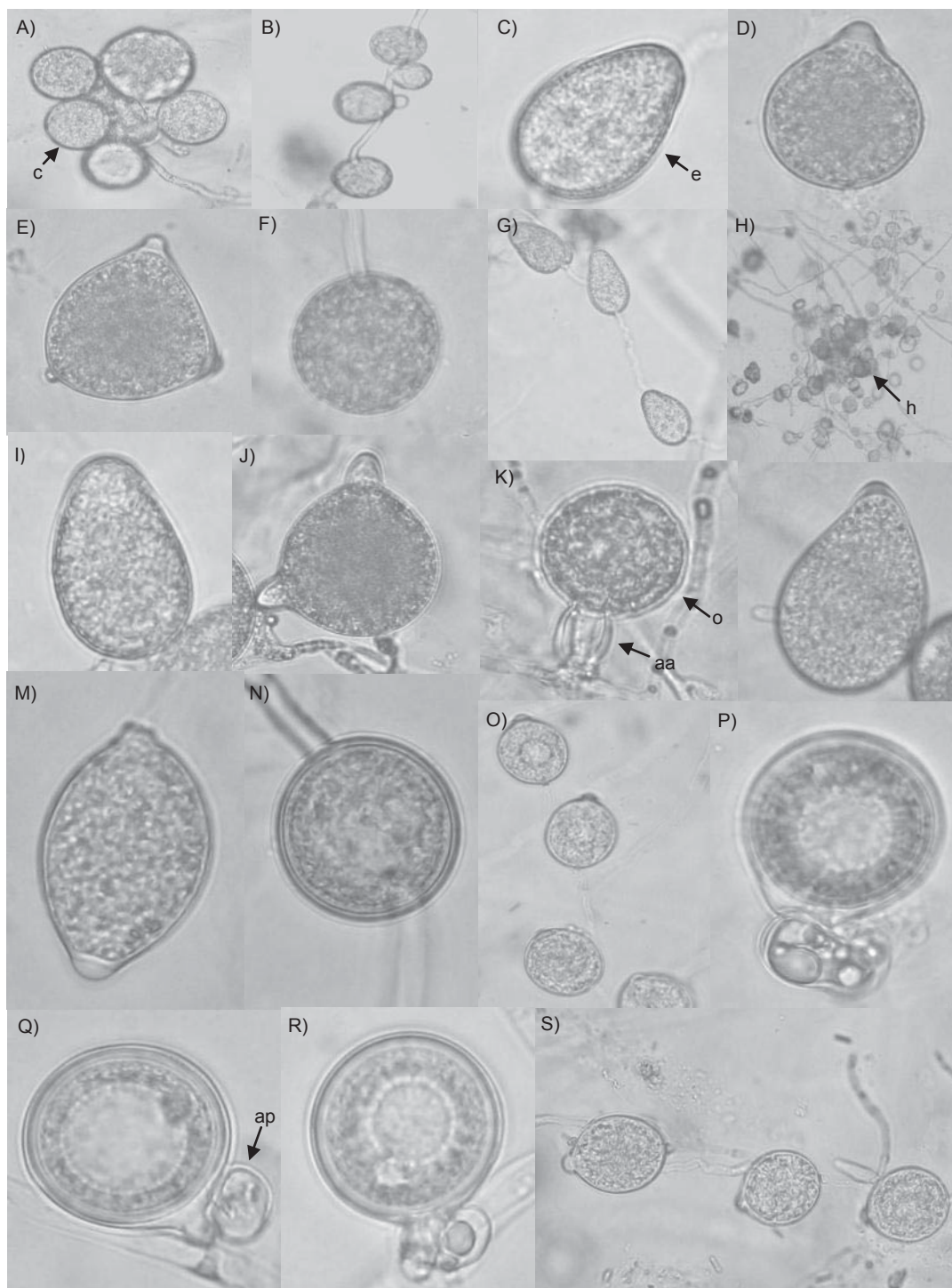


Fig.7. Estructuras de especies pertenecientes al género *Phytophthora*. A) a C) *P. cinnamomi* c= clamidosporas; e=esporangios 40X. D) a F) *P. nicotianae* 40X. G) a I) *P. drechsleri* h= hinchamientos de micelio 40 X. J) a L) *P. capsici* o=oogonio; aa= anteridio anfigino 40X. M) a N) *P. tropicalis* 40X. O) a Q) *P. nicotianae* x *cactorum* ap= anteridio parágino 40X. R) a S) *P. cactorum* 40 X.

La posición filogenética de las especies dentro del género *Phytophthora* se muestra en la Figura 8, el árbol fue construido con secuencias correspondientes al Espacio Transcrito Interno (ITS) del ADNr usando el método de Máxima Parsimonia.

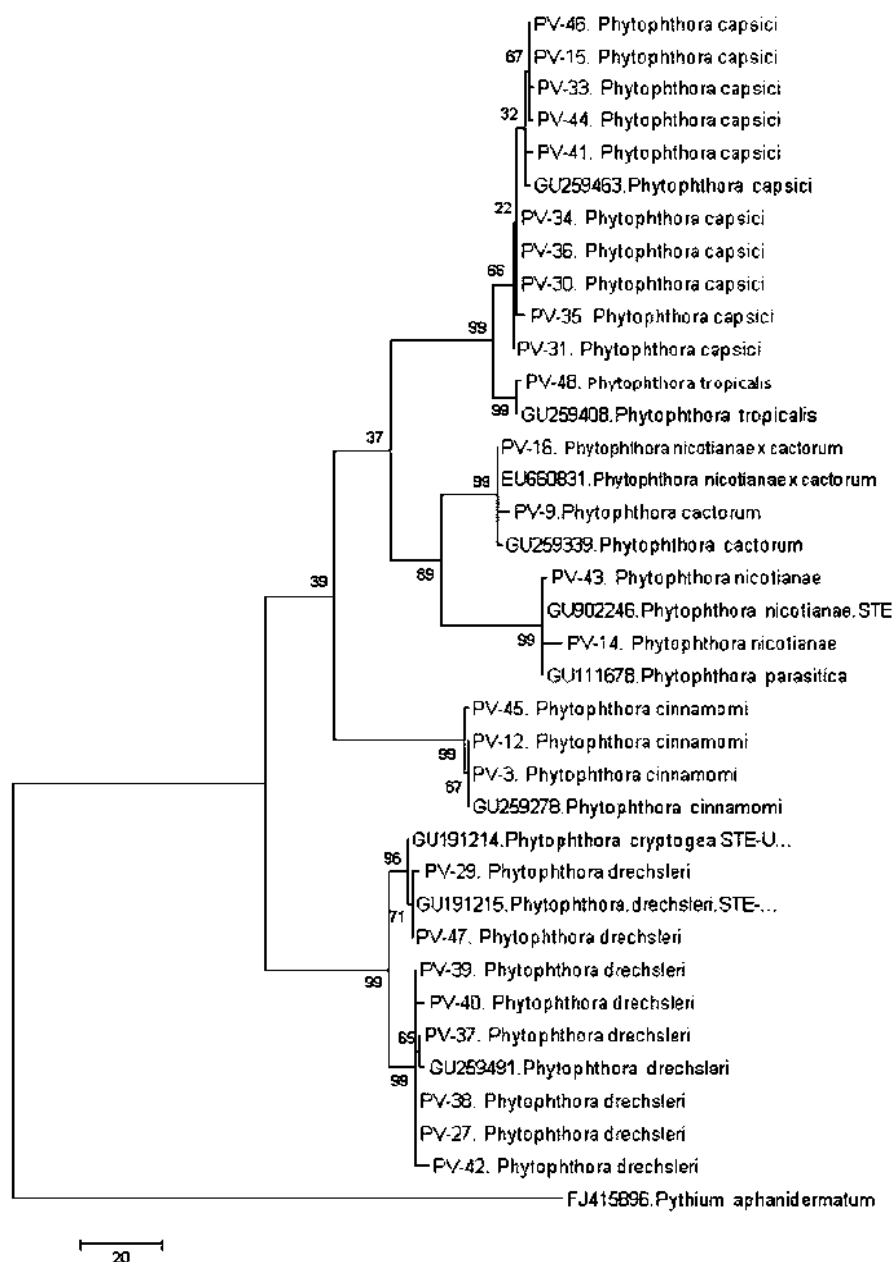


Fig. 8. Árbol filogenético de las especies de *Phytophthora* detectadas en viveros. Las secuencias obtenidas se compararon con las de aislamientos que se encuentran en el Genbank de NCBI (códigos EU y GU). Se utilizó la secuencia FJ415896 de *Pythium aphanidermatum* como grupo externo.

1.3.3 Pruebas de patogenicidad

Se confirmó que *Phytophthora capsici* fue el causante de la marchitez y muerte de las plantas de chile ornamental en vivero. La agresividad de los aislamientos obtenidos a partir de plantas de *Capsicum annuum* fue variable; en un aislamiento se observó la muerte del 100% de las plántulas cuatro días después de la inoculación, en el resto de los aislamientos la muerte de las plántulas se observó entre los 5 y 48 días posteriores a la inoculación. En las pruebas de patogenicidad la muerte del 100 % de las plántulas en *Petunia* sp. y *Gazania* se observó entre 9 y 26 días y 7 y 27 días después de la inoculación, respectivamente; en *Petunia x hybrida*, *Gerbera* sp, *Pentas lanceolata* y *Dianthus barbatus*, ocurrió después de los 6, 10, 6 y 26 días, respectivamente. En *Euphorbia pulcherrima* y en *Cataranthus roseus* los síntomas de marchitez en las ramas aparecieron después de los 7 días de la inoculación. Se re-aisló a *Phytophthora* a partir de las plantas inoculadas, en los testigos no se detectó al patógeno.

1.3.4 Detección de *Phytophthora* en tejido vegetal enfermo mediante el uso de ImmunoStrips

En la detección realizada con muestras de tejido vegetal enfermo de plantas de viveros y con plantas inoculadas, utilizando inmunotiras o ImmunoStrips, se obtuvieron resultados positivos de los siguientes hospedantes: *Solanum ovigerum*, *Petunia x hybrida*, *Epipremnum aureum*, *Rhododendron indicum*, *Capsicum annuum*, *Euphorbia pulcherrima* y *Cataranthus roseus*; con *Spathiphyllum* sp. esta prueba fue negativa. Para corroborar la presencia del oomicete se hicieron aislamientos en medio selectivo de harina de maíz (PARNH) obteniéndose únicamente cultivos de *Phytophthora* para los hospedantes que dieron resultados positivos con las immunoStrips. Las ImmunoStrips fueron utilizadas sólo en los hospederos mencionados anteriormente porque la compañía Agdia las proporcionó después de que ya se habían realizado algunas colectas de las plantas en viveros. Todas las plantas inoculadas dieron resultados positivos cuando se usaron las immunoStrips.

1.3.5 Nuevos hospederos

Se reporta por primera vez a *P. nicotianae* x *P. cactorum* y *P. cactorum* causando pudrición de corona y raíces en *Petunia* sp.; a *P. drechsleri* causando pudrición de raíces en *Gazania*

rigens, marchitez en *Petunia x hybrida* y muerte regresiva en *Pentas lanceolata*; a *P. capsici* causando marchitez en *Cestrum nocturnum* y *Solanum ovigerum*. Se comprobó la patogenicidad de los aislamientos obtenidos a partir de *Petunia* sp., *Gazania rigens* y *Pentas lanceolata* mediante los postulados de Koch.

1.4 DISCUSIÓN

Los estados de Michoacán y Morelos figuran dentro de los principales productores de plantas ornamentales en México, en ambos estados se pueden encontrar viveros dedicados a la producción y venta de plantas de ornato. En el presente trabajo se detectaron síntomas como pudrición radical y de la corona, muerte regresiva, necrosis en ramas o marchitez causados por diversas especies de *Phytophthora* en plantas ornamentales, así como varios hospederos afectados por este patógeno en viveros en estos estados. Son múltiples los reportes acerca de patógenos que causan daños en plantas ornamentales en viveros de diferentes partes del mundo debidos a *Phytophthora* (Zitko *et al.*, 1987; MacDonald *et al.*, 1994; Ferguson y Jeffers 1999; Themann *et al.*, 2002a; Warfield *et al.*, 2003; Cúdom *et al.*, 2004; Dart *et al.*, 2007; Schwingle *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008; Moralejo *et al.*, 2009; Yakabe *et al.*, 2009), no obstante en México los estudios realizados sobre estos problemas fitosanitarios son escasos, y Michoacán y Morelos no son la excepción.

En el presente estudio se identificó a *P. drechsleri* en seis hospederos diferentes en cuatro de los viveros muestreados. *P. nicotianae* se detectó en dos viveros causando daños en dos hospederos. *P. capsici* se identificó en cuatro viveros y en cuatro hospederos. *P. cinnamomi* se encontró en dos hospederos en dos viveros. *P. nicotianae* x *P. cactorum* se detectó en un solo hospedero en un vivero. *P. cactorum* se detectó en un vivero y en un hospedero al igual que *P. tropicalis*. De acuerdo con estos resultados se puede ver que en algunos viveros se encontró más de una especie de *Phytophthora* afectando varios hospederos en el mismo vivero, lo cual aumenta el riesgo de pérdidas económicas.

Aunque el muestreo se hizo únicamente en nueve viveros, se identificaron 26 aislamientos obtenidos a partir de 16 diferentes hospederos, lo cual es indicativo del serio problema que representa este patógeno en viveros de plantas ornamentales. Así mismo, se comprueba la diseminación de *Phytophthora* por las malas prácticas de cultivo, ya que se encontró la misma especie en diferentes hospederos en el mismo vivero.

Se detectó a *P. cinnamomi* causando síntomas de marchitez en *Buxus sempervirens* y en *Rhododendron indicum*, este patógeno ha sido reportado previamente en viveros de España, causando daños en *Quercus ilex* y en agua de riego en viveros de Alemania y Estados Unidos (MacDonald *et al.*, 1994; Themann *et al.*, 2002b; Moralejo *et al.*, 2009).

En cuanto a los aislamientos identificados como *P. capsici* se comprobó la patogenicidad en plantas de *Capsicum annuum*, aunque también se encontró asociado a *Cestrum nocturnum*, *Epipremnum aureum* y *Solanum ovigerum*, en todos los hospedantes se encontró causando síntomas de marchitez; existen reportes del patógeno en viveros ornamentales de Argentina ocasionando daños en *Philodendron scandens* (Cúndom *et al.*, 2004).

P. drechsleri ha sido identificado en viveros de España, Estados Unidos y Alemania ocasionando daños en *Polygala myrtifolia* y en el agua de riego (Moralejo *et al.*, 2009; Themann *et al.*, 2002b), en el presente estudio se comprobó la patogenicidad de *P. drechsleri* en plantas de *Gerbera* sp., en las cuales se encontró ocasionando síntomas de marchitez; en *Gazania rigens* causando pudrición de corona; en *Euphorbia pulcherrima* causando pudrición de tallo y raíz; en *Pentas lanceolata* causando muerte regresiva; en *Gazania* sp. y *Petunia x hybrida* causando síntomas de marchitez, también se reporta asociada a *Arctotis* sp., causando pudrición de corona y raíz.

Asimismo existen reportes de *P. nicotianae* en viveros de España y Estados Unidos afectando plantas de diversas especies entre las que se encuentran *Catharantus roseus*, *Capsicum annuum*, *Rhododendron* sp. y *Arbutus unedo* (Schwingle *et al.*, 2007; Moralejo *et al.*, 2009), aquí se reporta al patógeno ocasionando marchitez en *Gardenia jasminoides* y pudrición de corona y raíz en *Dianthus barbatus*, en ambos casos se comprobó la patogenicidad del oomicete.

P. cactorum ha sido identificada en viveros de Estados Unidos y en agua de riego en Alemania en *Fragaria x ananassa*, *Rhododendron* sp., *Eucalyptus* sp., *Acer rubrum*, *Acer tataricum*, *Calycanthus floridus*, *Lonicera* sp., *Malus* sp., *Myrica pensylvanica*, *Prunus maackii*, *Pyrus calleryana*, *Ribes alpinum*, *Viburnum prunifolium*, *Arctostaphylos* sp., *Photinia* sp., *Pyracantha* sp., *Rhamnus* sp., *Sequoia* sp. y *Toyon* sp. (Themann *et al.*, 2002b; Schwingle *et al.*, 2007; Warfield *et al.*, 2008; Yakabe *et al.*, 2009), en este trabajo únicamente se encontró causando pudrición de corona y raíz en *Petunia* sp., cabe mencionar que en el aislamiento de *P. cactorum* se observaron anteridios anfiginos, lo cual es una característica que ocurre ocasionalmente en esta especie (Stamps *et al.*, 1990).

Con respecto a *P. tropicalis* se ha identificado en viveros de España y Estados Unidos causando daños en *Arbutus unedo*, *Allamanda* sp., *Camellia* sp., *Pieris japonica*, *Rhododendron catawbiense* (Moralejo *et al.*, 2009; Yakabe *et al.*, 2009), en este estudio se identificó a *P. tropicalis* en plantas de *Cataranthus roseus* causando pudrición de ramas, comprobándose la patogenicidad en dicho hospedero. Este constituye el primer reporte de *P. tropicalis* en plantas ornamentales en el país aunque anteriormente se reportó afectando cacao (*Theobroma cacao*) (Donahoo y Lamour, 2008).

En un vivero se identificó una especie híbrida *P. cactorum* x *P. nicotianae* causando daños en *Petunia* sp., que se reporta por primera vez en México. La probabilidad de que especies híbridas de *Phytophthora* se desarrollen en viveros depende en parte de que las especies parentales ocupen áreas similares en la misma planta hospedera (Schwingle *et al.*, 2007). La formación de híbridos entre *P. cactorum* y *P. nicotianae* es un proceso que ocurre con frecuencia y se ha documentado (Man in't Veld *et al* 1998; Aragón-Caballero *et al.*, 2006 citado en Donahoo y Lamour, 2008). El proceso de hibridación entre especies diferentes de *Phytophthora* ha sido reportado en pocas especies (Goodwin *et al.*, 1994; Donahoo y Lamour, 2008). La formación de especies híbridas de *Phytophthora* puede ser la causa de la introducción de nuevas variantes en las poblaciones de patógenos en ecosistemas naturales (Man in't Veld *et al*, 1998). Las especies híbridas de *Phytophthora* en comparación con las especies parentales tienen un rango de hospedantes más amplio (Schwingle *et al.*, 2007).

En los viveros muestreados predominaron las especies heterotáticas sobre las especies homotáticas. Dentro de las heterotáticas se reporta en este estudio el tipo de compatibilidad A2 para los aislamientos obtenidos de *B. sempervirens* y *Rhododendron indicum* identificados como *P. cinnamomi*; el cual corresponde al tipo reportado para aguacate en México.

En *P. drechsleri* se detectaron ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) en diferentes hospedantes en el vivero “Jardín del Cubilete” de Uruapan, por lo que la reproducción sexual podría estar ocurriendo dentro de este vivero; en los viveros “Paraíso 2” y “Floramundo” se encontraron aislamientos que corresponden al tipo de compatibilidad A2, lo cual indica que los dos tipos de compatibilidad de esta especie se encuentran en México.

Los aislamientos identificados como *P. capsici* que fueron obtenidos de *Capsicum annum* presentaron el tipo de compatibilidad A1, un aislamiento obtenido de *Epipremnum aureum* corresponde al tipo A2, por lo tanto en el vivero “Campestre” podría ocurrir la reproducción sexual. También se encontraron aislamientos de *P. capsici* con tipo de compatibilidad A1 en los viveros “Xochimilco” y “Tecnoflor”, lo que sugiere que este se encuentra más ampliamente distribuido en el país.

Todas las especies de *Phytophthora* identificadas en este estudio se reportan por primera vez causando daños en plantas de viveros ornamentales en México. No existen reportes previos a este estudio a nivel mundial de acuerdo con la información encontrada en Fungaldatabases, 2011 de *P. cactorum* x *P. nicotianae* y *P. cactorum* causando pudrición de corona y raíces en *Petunia* sp., de *P. drechsleri* causando pudrición raíces en *Gazania rigens*, marchitez en *Petunia* x *hybrida* y muerte regresiva en *Pentas lanceolata*, de *P. capsici* causando marchitez en *Cestrum nocturnum* y *Solanum ovigerum*. Se comprobó la patogenicidad de los aislamientos obtenidos a partir de *Petunia* sp., *Gazania rigens* y *Pentas lanceolata* mediante los postulados de Koch.

El rango de hospedantes es muy extenso para todas las especies de *Phytophthora* identificadas y las áreas donde se distribuyen dichas especies van en aumento considerable. Además de que las especies de *Phytophthora* causan daños en viveros y grandes pérdidas económicas ocasionan además desastres ecológicos en todo el mundo (Schwingle, *et al.*, 2007). El conocimiento de la diversidad de especies de *Phytophthora* que afectan plantas en viveros en Michoacán particularmente, permitirá mejorar las estrategias de manejo de las enfermedades que estos oomicetes ocasionan. En un vivero de Tarímbaro, Michoacán se observó una pérdida del 100% de las plantas de chile ornamental y hule de noche; debido al desconocimiento del agente causal no se tomaron las medidas de control adecuadas.

Asimismo es importante mencionar que en todos los viveros muestreados de Michoacán las plantas que estos comercializan las adquieren en el Estado de México, Guerrero, Guanajuato o Jalisco por lo que las enfermedades causadas por este oomicete se están diseminando en los viveros de un estado a otro, y estas plantas serán llevadas a diversos jardines, por lo es posible que el patógeno se disemine de manera considerable. Por lo cual es importante seguir detectando la presencia de *Phytophthora* ya que si se llegara a detectar

P. ramorum esta especie podría causar daños severos en los viveros, y se podría diseminar a los bosques lo cual causaría posiblemente una catástrofe ecológica en el estado.

La importancia de detectar la presencia de patógenos como *Phytophthora* radica en que no se conocen todos los hospederos que afecta. En el caso de México sólo existe un reporte previo a este en viveros de aguacate, no obstante el daño que causa en diferentes especies de plantas ornamentales y otros cultivos, por lo que este trabajo aporta información acerca de la diversidad de especies de *Phytophthora* en viveros, lo cual permitirá el uso de métodos para el manejo adecuado y oportuno de enfermedades causadas por este patógeno en este sistema de producción.

1.5 CONCLUSIONES

Se obtuvieron 26 aislamientos de *Phytophthora* a partir de muestras de suelo y tejido enfermo de cinco viveros de Morelia, uno de Tarímbaro, uno de Uruapan y dos de Morelos.

Con base en las características morfológicas y a las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, se identificaron siete especies de *Phytophthora*: *P. cinnamomi*, *P. nicotianae* x *P. cactorum*, *P. nicotianae*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. cactorum* y *P. tropicalis*, obtenidas a partir de plantas de vivero con síntomas de marchitez, pudrición de ramas, corona o raíces y muerte regresiva en viveros de Tarímbaro, Morelia y Uruapan en Michoacán y en Morelos.

Se identificaron 16 hospederos para las diferentes especies de *Phytophthora* encontradas en este estudio: arrayán (*Buxus sempervirens*), petunia doble (*Petunia* sp.), gardenia (*Gardenia jasminoides*), chile ornamental (*Capsicum annuum*), gerbera (*Gerbera* sp.), gazania (*Gazania rigens*), hule de noche (*Cestrum nocturnum*), nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), penta (*Pentas lanceolata*), margarita africana (*Arctotis* sp.), gazania (*Gazania* sp.), teléfono (*Epipremnum aureum*), petunia (*Petunia* x *hybrida*), clavellina (*Dianthus barbatus*), azalea (*Rhododendron indicum*) y vinca (*Cataranthus roseus*).

Se reporta por primera vez a *P. cactorum* x *P. nicotianae* y a *P. cactorum* causando pudrición de corona y raíces en *Petunia* sp.; a *P. drechsleri* causando pudrición raíces en *Gazania rigens*, marchitez en *Petunia* x *hybrida* y muerte regresiva en *Pentas lanceolata*; a *P. capsici* causando marchitez en *Cestrum nocturnum* y *Solanum ovigerum*. Se comprobó la patogenicidad de los aislamientos obtenidos a partir de *Petunia* sp., *Petunia* x *hybrida*, *Gerbera* sp., *Gazania rigens*, *Pentas lanceolata*, *Dianthus barbatus*, *Euphorbia pulcherrima* y *Cataranthus roseus* mediante los postulados de Koch.

1.6 LITERATURA CITADA

Agdia, 2010. Instructions for Agdia ImmunoStrip™ Test. Strip tests for the detection of plant pathogens. 2010.

Agdia Online Catalog.
https://orders.agdia.com/InventoryD.asp?attribute_Size=5&collection=ISK+92601&loc=IN
 (Consultada Marzo de 2011).

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 horticultrura ornamental en el Estado de Veracruz. <http://www.funprover.org/formatos/PLANES%20ESTRATEGICOS/Cadena%20horticultrura%20ornamental.pdf> (Consultada Septiembre de 2009).

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 Genet. Biol. 30: 17-32.

Cúndom, M. A., y Cabrera M. G. 2004. Primera determinación de *Phytophthora capsici*, patógeno de filodendro (*Philodendron scandens*) en Argentina. Agric. Téc. 64(4): 421-425.

Dart, N. L., Chastagner, G. A., Rugarber, E. F. and Riley K. L. 2007. Recovery frequency of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* spp. in the soil profile of ornamental retail nurseries. Plant Dis. 91: 1419-1422.

Donahoo, R. S., and Lamour, K. H. 2008. Interspecific hybridization and apomixis between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. Mycologia 100(6): 911–920.

Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 562 p.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791

Ferguson, A. J., and Jeffers, S. N. 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Dis.* 83:1129-1136.

Fungal databases. <http://nt.ars-grin.gov/fungal databases/> (Consultada Marzo de 2011).

Goodwin, S. B., Drenth, A., and Fry, W. E. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* 22:107-115.

Goodwin, S. B., and Fry W. E. 1994. Genetic analyses of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis*. *Exp. Mycol.* 18: 20-32.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.

Hong, C. X., Gallegly, M. E., Richardson, P. A., Kong, P., Moorman G., Lea-Cox J., and Roos, D. 2008. *Phytophthora irrigata* and *Phytophthora hydropathica*, two new species from irrigation water at ornamental plant nurseries. *Phytopathology* 98: S68. (Abstract).

MacDonald, J. D., Ali-Shtayed, M. S., Kabashima, J., and Stites, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Dis.* 78: 607-611.

Macías, F. O. L., Delgado, C. Y., Peña, M. E., León B. R., y Elías, B. R. 2006. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH01d2/441186ed.dir/doc.pdf> (Consultada Mayo de 2011).

Man in't Veld W.A., Veenbaas-Rijks W. J., Ilieva, E., de Cock W. A. M., Bonants P. J. M., and Pieters, R. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology* 88: 922–929.

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 Pathol.* 58: 100-110.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consultada Marzo de 2011).

Olsen, M. Plant Disease Publications. Cooperative Extension, College of Agriculture & Life Sciences, The University of Arizona. Diseases of Urban Plants. <http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1124/#pyd> (Consultada Enero de 2010).

Phytophthora database. <http://www.phytophthoradb.org/species.php?a=view> (Consultada Febrero de 2011).

Rodríguez, A., B. Xoconostle., y M. Valdés. 2004. Ecología molecular de hongos ectomicorrízicos. Rev. Fitotec. Mex. 3: 267-278.

Schwingle, B. W., Smith, J. A., and Blanchette, R. A. 2007. *Phytophthora* species associated with diseased woody ornamentals in Minnesota nurseries. Plant Dis. 91:97-102.

Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., and Hall, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Second edition. CAB International Mycological Institute edition. Mycological Papers N° 162. U. K. 28 p.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.

Themann, K., Werres, S., Diener, H.-A., and Luettmann, R. 2002a. Comparison of different methods to detect *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. J. Plant Pathol. 84:41-50.

Themann, K., Werres, S., Luettmann, R., and Diener, H.-A. 2002b. Observations of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. Eur. J. Plant Pathol. 108:337-343.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

- Villa, N. O., Kageyama K., Asano, T., and Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 98(3): 410–422.
- Warfield, C. Y., Hwang, J., and Benson, D. M. 2008. *Phytophthora* blight and dieback in North Carolina nurseries during a 2003 survey. *Plant Dis.* 92:474-481.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: A guide to Methods and Applications.* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 315-322
- 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. Dis.* 93: 883-890.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7:203-14.
- Zitko, S. E., Timmer, L. W., and Castle W. S. 1987. Survey of Florida citrus nurseries for *Phytophthora* spp. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 100: 82-85.

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Pythium* AISLADAS DE PLANTAS ORNAMENTALES PROVENIENTES DE VIVEROS

RESUMEN

El uso de plantas ornamentales como elementos decorativos en jardines e interiores ha tomado gran importancia en todo el mundo, lo que ha estimulado el cultivo intensivo de estas especies. Uno de los principales problemas en la producción de plantas de ornato en viveros es la falta de control fitosanitario, lo que ocasiona pérdidas económicas por enfermedades como las causadas por *Pythium* spp. que afectan todas las etapas del ciclo de producción ya que el patógeno es capaz de sobrevivir en agua, residuos de plantas y suelo. Se han realizado estudios en diferentes viveros a nivel mundial para detectar la presencia de estos, no obstante en México los trabajos que existen son muy escasos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue detectar e identificar especies de *Pythium* en muestras de tejido vegetal enfermo y suelo de la rizosfera de plantas ornamentales procedentes de viveros ubicados en Morelia, Michoacán. Se obtuvieron 19 aislamientos a partir de 18 hospederos, de los cuales 14 fueron patogénicos en plántulas de pepino. Trece aislamientos se caracterizaron con base en las secuencias de la región ITS del ADNr y a las características morfológicas; las especies de *Pythium* identificadas fueron: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. splendens*, *P. irregulare*, *P. ultimum* var. *ultimum* y *Pythium* sp. nov.

CHAPTER II. IDENTIFICATION OF SPECIES OF *Pythium* ISOLATED FROM ORNAMENTAL PLANT NURSERIES

ABSTRACT

The use of ornamental plants to decorate gardens and indoors has become very important around the world, stimulating the intensive growth of these species. Nevertheless, one of the main problems in ornamental plant production in nurseries is the lack of phytosanitary control, as a consequence diseases like the ones caused by *Pythium* spp. affect all the production stages, because the pathogen is capable to survive in water, plant residues and soil. Due to the importance of plant production in nurseries in the world and the great losses caused by pathogens, several studies have been conducted around the world to detect them, nevertheless, in Mexico these studies are scarce. Therefore the objective of this study was to detect and identify the species of *Pythium* on diseased tissue, and rhizosphere soil from nurseries located in Morelia, Michoacan. Nineteen isolates were obtained from 18 hosts, from which fourteen were pathogenic on cucumber seedlings. Thirteen species were characterized by sequencing of ITS of rDNA and morphological characteristics. The *Pythium* species identified were: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. splendens*, *P. irregulare*, *P. ultimum* var. *ultimum* and *Pythium* sp. nov.

2.1 INTRODUCCIÓN

El género *Pythium* consta de más de 120 especies (Dick, 1990) que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. *Pythium* puede vivir como saprófito sobre restos de plantas muertas o puede ser patógeno. En sistemas de producción tales como invernaderos, viveros, campos agrícolas y bosques ocasiona pudrición de semillas, ahogamiento de plántulas, pudrición de raíces, frutos y otros órganos vegetales que se encuentran en contacto con el suelo (MacDonald *et al.*, 1994; Agrios, 2005). También se le asocia con una reducción en el vigor de plantas adultas ya que daña la raíz; pero generalmente no las mata (Martin, 2009).

Este oomicete puede ser introducido en viveros, establecerse ahí, dispersarse e infectar plantas susceptibles, un número pequeño de plantas infectadas genera una gran cantidad de propágulos (MacDonald *et al.*, 1994). Debido a las pérdidas económicas producidas por patógenos en plantas ornamentales en vivero, se han realizado estudios a nivel mundial para detectarlos y se han identificado varias especies de *Pythium* causando daños, entre las que se encuentran: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. intermedium*, *P. irregulare*, *P. pachycaule*, *P. paroecandrum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* var. *ultimum* y *P. vexans* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Spies *et al.*, 2006; Al-Sa'di *et al.*, 2007), en agua de riego se ha identificado a *P. dissotocum*, *P. porphyrae*, *P. sulcatum* y *P. torulosum*, (Kong *et al.*, 2004). Los estudios sobre *Pythium* son escasos a diferencia del taxón *Phytophthora* (perteneciente a la misma familia).

La identificación de especies del género *Pythium* está basada en características morfológicas como forma y tamaño de los esporangios, tamaño y ornamentación del oogonio, el número de anteridios y la forma en que están unidos (Van der Plaats-Niterink, 1981; Martin, 2009). La gran variación de características morfológicas dentro del género y el hecho de que estas características son compartidas entre especies, así como la ausencia de estructuras que permitan la identificación de ciertas especies o aislamientos dificulta en gran medida la identificación de este oomicete; por lo tanto la caracterización morfológica debe complementarse con la identificación molecular. El análisis de las secuencias ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal (ADNr) ayuda a simplificar la clasificación de los aislamientos a nivel de especie, dicha región del ADNr es la más usada en estudios del

género *Pythium*, además presenta gran variabilidad y disponibilidad de iniciadores desarrollados por White, *et al.* (1990) para su amplificación mediante la técnica de PCR. El uso de caracteres moleculares es especialmente importante para aislamientos que no forman estructuras como oosporas y por lo tanto no pueden ser clasificados morfológicamente a nivel de especie. Algunos estudios han demostrado que el tamaño de la región ITS del ADNr varía de 750-1050 pb, lo cual indica que es mayor que en hongos 300-700 pb, lo que provee de un número mayor de caracteres para su análisis (Lévesque y De Cock, 2004).

Aunque existen estudios acerca de la diversidad de especies de *Pythium* en viveros de algunos países del mundo, en México no hay reportes acerca de la presencia este oomicete en viveros ornamentales. Por lo que el objetivo de este estudio fue detectar e identificar especies de *Pythium* en muestras de tejido enfermo y suelo de la rizosfera procedentes de viveros ubicados en Morelia, Michoacán.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colecta de muestras

Se obtuvieron 19 muestras de tejido vegetal enfermo de las siguientes especies: *Ruta graveolens*, *Buxus sempervirens*, *Cedrus* sp., *Primula acaulis*, *Saintpaulia hybrida*, *Petunia* sp., *Cyclamen persicum*, *Rhododendron indicum*, *Gazania rigens*, *Impatiens hawkeri* x *hybrida*), *Portulaca grandiflora*, *Santolina chamaecyparissus*, *Alyssum maritimum*, *Cineraria marítima*, *Dianthus barbatus*, *Petunia* x *hybrida* y *Gerbera* sp., y suelo de cuatro viveros del municipio de Morelia, Michoacán. Todas las muestras de tejido vegetal presentaban síntomas de marchitez. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

2.2.2 Obtención de aislamientos

Los aislamientos fueron hechos directamente de suelo o de las secciones de raíces de las plantas con síntomas.

Tejido vegetal

- 1) Se realizaron cortes de tejido de 5 a 10 mm² a partir del borde de la lesión.
- 2) Los cortes se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 10 % durante 30 segundos. Algunos cortes únicamente se enjuagaron con agua.
- 3) Las secciones de tejido se colocaron en una caja Petri con medio selectivo de harina de maíz (PARNH) con: pentacloronitrobenceno o PCNB (0.10 g L⁻¹), Ampicilina (0.27 g L⁻¹), Rifampicina (0.01 g L⁻¹), Delvolid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50 % natamicina, 50 % lactosa)] e Himexazol (0.075 g L⁻¹); los cortes se colocaron también en medio selectivo V8 y harina de maíz (PARN) con: PCNB (0.10 g L⁻¹), Ampicilina (0.27 g L⁻¹), Rifampicina (0.01 g L⁻¹) y Delvolid Instant (0.02 g L⁻¹) (ver anexo I).
- 4) Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C) hasta que se observó el crecimiento de colonias.

Suelo o sustrato de siembra

- 1) De la rizosfera de las diferentes plantas enfermas, se tomaron muestras de suelo de 10 g y se colocaron en una caja Petri con 20 ml de agua destilada estéril, se usó como cebo discos y hojas completas de azalea (*Rhododendron indicum*) que se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (23°C +/- 3°C).
- 2) Los discos o las hojas completas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 1 % durante 30 segundos.
- 3) Se sembraron en medio selectivo de harina de maíz (PARNH) y (PARN).
- 4) Se incubaron a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C) hasta que se observó el crecimiento de colonias.

A partir de los aislamientos puros se obtuvieron cultivos de punta de hifa, se crecieron en medio de harina de maíz y se almacenaron a 15 °C en tubos de microcentrífuga con agua destilada estéril.

2.2.3 Caracterización morfológica

Los aislamientos se crecieron en medios agar-zanahoria, V8-agar o en papa dextrosa agar (PDA) (ver anexo I). Se mantuvieron en obscuridad a 25 °C hasta que se observaron estructuras. Se determinó el tipo de esporangios, presencia o ausencia de hinchamientos del micelio, presencia o ausencia de oosporas y tipo de oospora. También se determinó su crecimiento a una temperatura de 35 °C, se hicieron mediciones de esporangios, oogonios e hinchamientos de micelio cuando estuvieron presentes.

2.2.4 Identificación de especies de *Pythium* mediante técnicas moleculares

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN de los aislamientos se extrajo a partir de micelio, para lo cual se usó el protocolo descrito por Goodwin (1992) con modificaciones (ver anexo II).

Amplificación de ADN por PCR para identificación de especies

Para amplificar la región de los espacios transcritos internos (ITS1, 5.8S e ITS2) se utilizaron los oligonucleótidos ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), los cuales hibridizan dentro de los genes 18s ADNr y 28s ADNr. Las condiciones usadas para la realización del PCR fueron

las siguientes: 4 minutos a 95 °C, 34 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, 2 minutos a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % para determinar el grado de amplificación. Se purificaron con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System–Promega), y se enviaron a la compañía Macrogen, Corea del Sur para la secuenciación del ADN amplificado. Las secuencias se ensamblaron y editaron usando BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Para establecer las relaciones filogenéticas entre las especies de *Pythium*, las secuencias consenso obtenidas de cada aislamiento se compilaron en un archivo fasta y se alinearon con el profile mode del Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007).

El árbol filogenético se construyó utilizando 11 aislamientos con el método de Máxima Parsimonia utilizando 836 pares de bases correspondientes al espacio Transcrito Interno del ADN_r, se usó la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (level=1), con un tree initial con adiciones al azar (10 REPS), los gap/missing se consideraron como delecciones.

Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis bootstrap con 1,000 repeticiones al azar (Felsenstein, 1985). Las secuencias de referencia de cada una de las especies encontradas en este trabajo se obtuvieron del GenBank (NCBI), *Phytophthora* sp. número de acceso FJ217679 se asignó fuera de grupo.

2.2.5 Pruebas de patogenicidad en plántulas de pepino

Preparación del inóculo

- 1) Se cortaron hojas de pasto, se lavaron con agua de la llave y jabón, luego se cortaron en trozos de 1 cm de longitud aproximadamente y se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada.

- 2) Los tubos se esterizaron durante 20 minutos a 121 °C.
- 3) Los tubos con las hojas de pasto estériles se inocularon con discos de micelio de los diferentes aislamientos de *Pythium*.
- 4) Se incubaron durante 15 días o hasta que se observó que el micelio había colonizado las hojas de pasto.

Germinación de semillas

Se usaron semillas de pepinillo verde (Vita®). Las semillas se lavaron con agua destilada estéril, enseguida se sumergieron en etanol (96 %) durante algunos segundos, nuevamente se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Las semillas se transfirieron posteriormente a cajas Petri estériles en las que se colocó papel filtro estéril humedecido. Se incubaron a 25 °C expuestas a la luz durante 6 días.

Trasplante e inoculación de las plántulas

Las plántulas se colocaron en macetas de plástico que se llenaron con suelo (turba/agrolita) estéril, humedecido; se mantuvieron a 23 °C +/- 3 °C, expuestas a la luz. El 6° día después del trasplante se realizó la inoculación. La cual se hizo con hojas de pasto colonizadas por *Pythium*. Se inocularon seis plántulas por aislamiento y tres fueron usadas como control. Durante el experimento todas las plántulas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 °C +/- 3 °C), se colocaron en charolas con agua destilada para mantener el suelo saturado.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Plantas ornamentales infectadas por *Pythium*

Se obtuvieron 19 aislamientos del género *Pythium* a partir de 17 plantas ornamentales diferentes procedentes de cuatro viveros de Morelia, Michoacán, las cuales pertenecen a las siguientes especies: ruda (*Ruta graveolens* L.), arrayán (*Buxus sempervirens* L.), pino (*Cedrus* sp.), primavera [*Primula acaulis* (L.) L.], violeta africana (*Saintpaulia hybrida* J. C. Wendl.), petunia doble (*Petunia* sp.), violeta imperial (*Cyclamen persicum* Mill.), azalea (*Rhododendron indicum*), gazania [*Gazania rigens* (L.) Gaertn.], belén (*Impatiens hawkeri* x *hybrida*), amor de un rato (*Portulaca grandiflora* L.), santolin (*Santolina chamaecyparissus* L.), panalillo [*Alyssum maritimum* (L.) Lam], cineraria [*Cineraria marítima* (L.). Pelser & Meijden], clavellina (*Dianthus barbatus* L.), petunia sencilla (*Petunia* x *hybrida* Vilm.) y gerbera (*Gerbera* sp.), todas mostraron síntomas de marchitez. Únicamente se caracterizaron 13 de los 14 aislamientos que fueron patogénicos en plántulas de pepino (Cuadro 6).

Cuadro 6. Plantas ornamentales procedentes de viveros de Morelia, Michoacán de las que se obtuvieron aislamientos de *Pythium*.

Código	Hospedero	Síntomas	Vivero	Año de Colecta
PV1	<i>Ruta graveolens</i>	Marchitez	Alcatraz	2008
PV4	<i>Buxus sempervirens</i>	Marchitez	Alcatraz	2009
PV5	<i>Cedrus</i> sp.	Marchitez	Alcatraz	2008
PV7	<i>Primula acaulis</i>	Marchitez	Alcatraz	2008
PV8	<i>Saintpaulia hybrida</i>	Marchitez	Xochimilco	2009
PV13	<i>Cyclamen persicum</i>	Marchitez	Xochimilco	2009
PV17	<i>Rhododendron indicum</i>	Marchitez	Alcatraz	2009
PV18	<i>Gazania rigens</i>	Marchitez	Xochimilco	2009
PV19	<i>Impatiens hawkeri</i> x <i>hybrida</i>	Marchitez	Xochimilco	2009
PV20	<i>Portulaca grandiflora</i>	Marchitez	HIBSA	2009
PV21	<i>Santolina chamaecyparissus</i>	Marchitez	HIBSA	2009
PV25	<i>Alyssum maritimum</i>	Marchitez	Paraíso 2	2009
PV26	<i>Gerbera</i> sp.	Marchitez	Paraíso 2	2009

2.3.2 Especies detectadas mediante caracterización morfológica y molecular

La caracterización morfológica de los aislamientos permitió la identificación de siete especies de *Pythium*: *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. cylindrosporum* B. Paul, *P. dissotocum* Drechsler, *P. irregulare* Buisman, *P. ultimum* Trow var. *ultimum*, *P. splendens* Hans Braun y *Pythium* sp. nov. En todos los viveros se detectó más de una especie. La identificación morfológica se confirmó mediante la secuenciación de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr (Van der Plaats-Niterink, 1981; Bernard, 1992; Lévesque y de Cock, 2004; McLeod *et al.*, 2009) (Cuadros 7 y 8). Las características morfológicas observadas se muestran en la Figura 9. Se detectaron tanto especies homotálicas como heterotálicas.

Cuadro 7. Especies de *Pythium* identificadas

Código	Especies	BLAST % de similitud
PV1	<i>P. irregulare</i>	99
PV4	<i>P. splendens</i>	99
PV5	<i>P. splendens</i>	99
PV7	<i>P. irregulare</i>	99
PV8	<i>Pythium</i> sp. nov.	-
PV13	<i>P. cylindrosporum</i>	99
PV17	<i>P. splendens</i>	100
PV18	<i>P. dissotocum</i>	100
PV19	<i>P. cylindrosporum</i>	100
PV20	<i>P. cylindrosporum</i>	100
PV21	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	100
PV25	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	100
PV26	<i>P. aphanidermatum</i>	99

Cuadro 8. Características morfológicas de los aislamientos de *Pythium*

Especie	Características morfológicas
<i>Pythium splendens</i>	Heterotáticos. No se observaron esporangios. Hinchamientos en el micelio abundantes y globosos, con un diámetro de 37.5-40 μ x 37.5-40 μ , generalmente terminales, raramente intercalares. No crecieron a 35 °C.
<i>Pythium cylindrosporum</i>	Homotáticos. Oogonios globosos, terminales, con un diámetro de 17.5-20 μ x 15-17.5 μ . Oosporas apleróticas. Un anteridio por oogonio. No crecieron a 35 °C.
<i>Pythium ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Homotáticos. Hinchamientos en el micelio globosos, terminales de 20-25 μ x 20-25 μ de diámetro. Oogonios terminales e intercalares de 22.5-25 μ x 22.5-25 μ de diámetro. Uno o dos anteridios por oogonio. Oosporas apleróticas. Solamente un aislamiento creció a 35 °C.
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Homotático. Esporangios lobulados, formados en medio papa-dextrosa-agar. Oogonios terminales, globosos con un diámetro de 25-27.5 μ x 25-27.5 μ . Un anteridio por oogonio. Oosporas apleróticas. Si creció a 35 °C.
<i>Pythium dissotocum</i>	Homotático. Esporangios lobulados. Apresorios cilíndricos. No creció a 35 °C.
<i>Pythium</i> sp. nov.	Homotático. Hinchamientos en el micelio intercalares, globosos, con un diámetro de 22.5 μ a 25 μ . Oogonios globosos, algunos irregulares, terminales e intercalares, con un diámetro de 20-25 μ x 20-25 μ . Uno o dos anteridios por oogonio. Oosporas apleróticas. No creció a 35 °C.
<i>P. irregulare</i>	Homotáticos. Hinchamientos en el micelio intercalares, globosos, con un diámetro de hasta 25 μ . Oogonios globosos, algunos irregulares, terminales e intercalares, con un diámetro de 22.5-25 μ x 22.5-25 μ . Uno o dos anteridios por oogonio. Oosporas apleróticas. No crecieron a 35 °C.

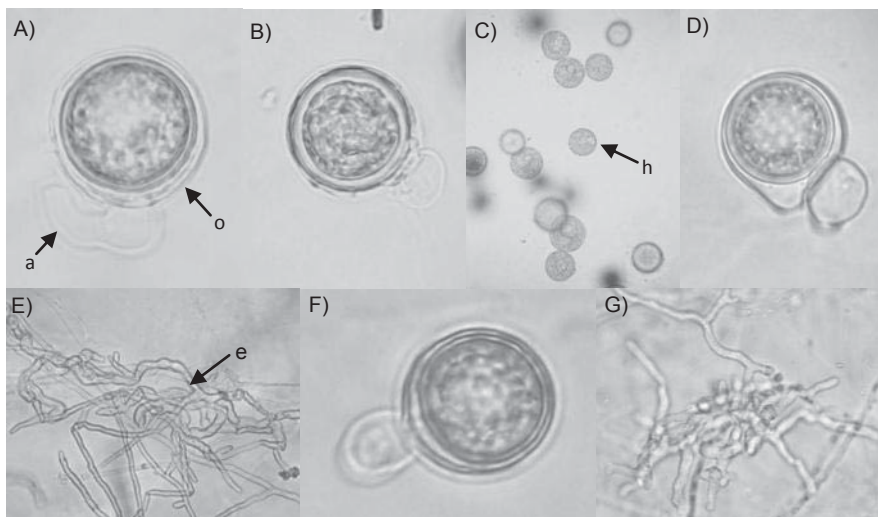


FIGURA 9. Estructuras de especies pertenecientes al género *Pythium*. A) *P. irregulare* a= anteridio; o= oogonio 40X. B) *P. ultimum* var *ultimum* anteridio y oogonio 40X. C) *P. splendens* h= hinchamientos de micelio 40X. D) y E) *P. aphanidermatum* anteridio y oogonio, e= esporangios 40X. F) *P. cylindrosporum* anteridio y oogonio 40X. G) *P. dissotocum* esporangios 40X.

La posición filogenética de las especies dentro del género *Pythium* se muestra en la Figura 10, el árbol fue construido con secuencias correspondientes al Espacio Transcrito Interno (ITS) del ADNr usando el método de Máxima Parsimonia.

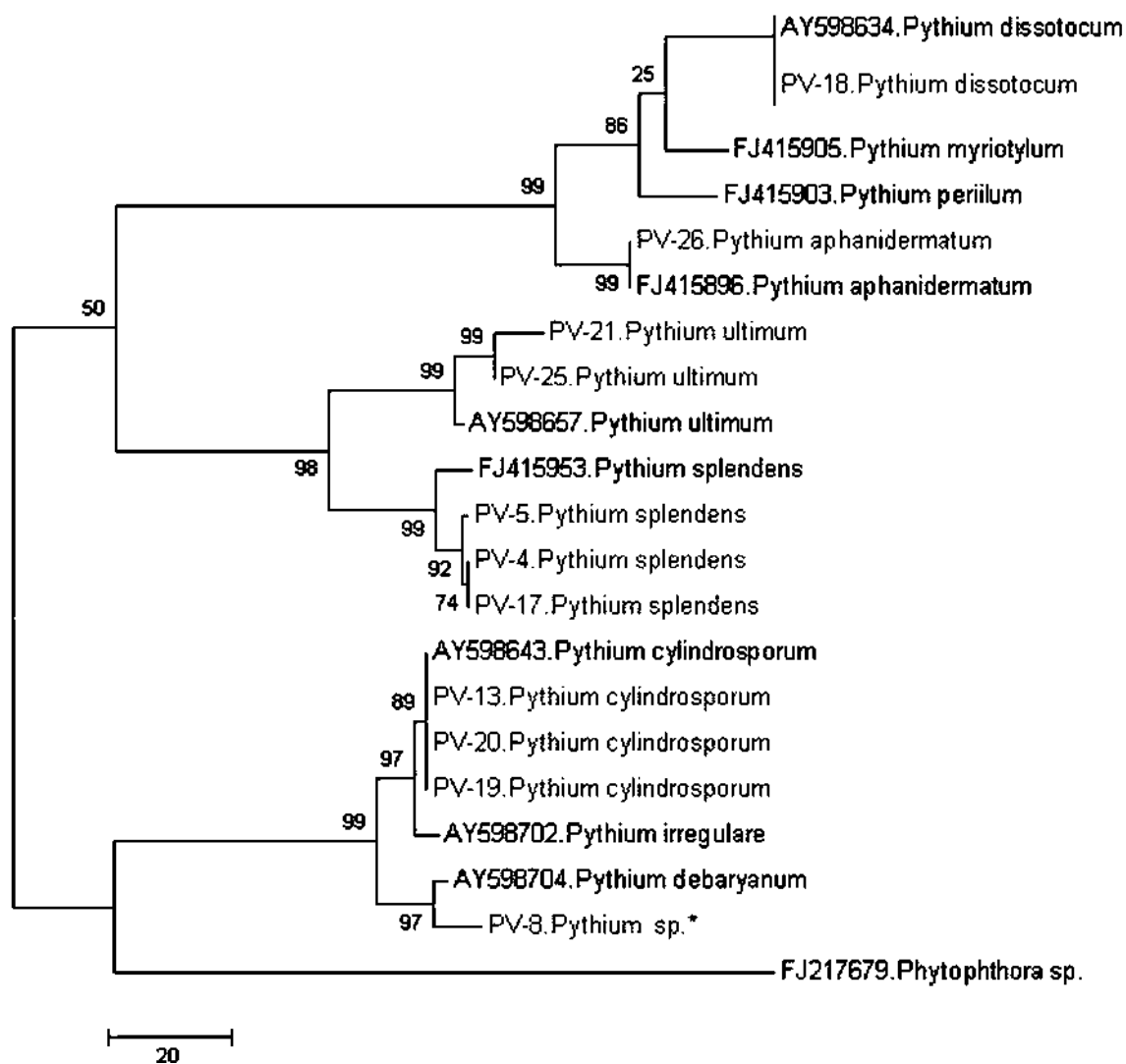


Fig. 10. Árbol filogenético de las especies de *Pythium* detectadas en viveros. Las secuencias obtenidas se compararon con las de aislamientos que se encuentran en el Gen Bank de NCBI (códigos AY y FJ). Se utilizó la secuencia FJ217679 de *Phytophthora* sp. como grupo externo.

2.3.3 Pruebas de patogenicidad

Catorce de los 19 aislamientos obtenidos en este estudio fueron patogénicos en plántulas de pepino, los síntomas de ahogamiento en las plántulas se presentaron entre 2 y 9 días después de la inoculación. Las plántulas testigo no presentaron síntomas.

2.4 DISCUSIÓN

Los problemas fitosanitarios que ocasionan enfermedades en viveros dedicados a la producción y venta de plantas ornamentales, no son tratados la mayoría de las ocasiones debido a la falta de conocimiento acerca de la identidad de los patógenos que las ocasionan. Por esto, el presente trabajo constituye un avance importante debido a que se identificaron siete de especies de *Pythium* ocasionando síntomas de marchitez en 17 especies de plantas ornamentales en viveros de Morelia, Michoacán.

En México son escasos los reportes acerca de enfermedades causadas por oomicetes en viveros. Existen reportes de patógenos que causan daños en plantas ornamentales en viveros de diferentes partes del mundo, entre los que se encuentran los ocasionados por los oomicetes *Pythium* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2004; Spies *et al.*, 2006; Al-Sa'di *et al.*, 2007) y *Phytophthora* (Yakabe *et al.*, 2009; Moralejo *et al.*, 2009).

Debido a que *Pythium* puede encontrarse como saprófito se han diseñado pruebas de patogenicidad en las cuales se utilizan plántulas de pepino como cebos para la evaluación del potencial infeccioso de aislamientos de *Pythium* (Sánchez *et al.*, 2001; Sánchez y Gallego, 2002). Esta prueba de patogenicidad en plántulas de pepino resultó muy efectiva ya que permitió seleccionar 14 aislamientos patogénicos de los 19 aislamientos de *Pythium* obtenidos de cuatro viveros de Morelia, Michoacán. Esto es indicativo del gran problema fitosanitario que puede ocasionar este patógeno en este sistema de producción masiva de plantas. Asimismo, se detectó el amplio rango de hospedantes que tiene este oomicete, al haberse aislado de diferentes plantas ornamentales. De las plantas ornamentales analizadas únicamente el género *Rhododendron* había sido previamente reportado a nivel mundial como hospedante de *Pythium* (Ho, 1986).

La identificación morfológica de los aislamientos se confirmó con las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, se identificaron siete especies: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. irregulare*, *P. splendens* y *Pythium* sp. nov. Es importante mencionar que las secuencias se compararon con las secuencias de aislamientos tipo ya que existen secuencias que se encuentran en el GenBank de NCBI que están incorrectamente clasificadas, y no corresponden a la especie que reportan (G. Abad, comunicación personal). Las secuencias obtenidas del aislamiento PV8

presentó 95 % de homología con *P. debaryanum*, debido a este bajo porcentaje de homología se puede considerar como una especie no descrita; sin embargo, es necesario obtener más aislamientos para poder describirla. Con respecto a las especies identificadas ya han sido reportadas en viveros ornamentales cuatro de ellas *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. aphanidermatum* y *P. irregulare* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Spies *et al.*, 2006; Al-Sa'di *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2004).

Se ha reportado que entre las especies de *Pythium* más patogénicas se encuentran *P. cylindrosporum*, *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum* y *P. splendens* (Miller y Sauve, 1975; citado en Moorman *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2004), todas ellas identificadas en este estudio. Las enfermedades causadas por *Pythium* son un importante factor limitante que afecta la producción de cultivos florales (Kong *et al.*, 2004), además *Pythium* puede ser transportado de un lugar a otro a través de suelo o agua de riego infestados, al igual que por medio de esquejes, semillas o plantas infectadas. En Michoacán se comercializan plantas provenientes de diferentes estados entre los que se encuentran Edo. de México, Guanajuato, Guerrero y Jalisco, por lo que este patógeno se está diseminando de un estado a otro en el país.

La identificación de especies de *Pythium* presentes en un vivero es de suma importancia pues representa el paso más importante para el desarrollo de estrategias de manejo efectivas (Kong *et al.*, 2004). Entre las cuales se recomienda esterilizar el sustrato antes de ser usado en el vivero, ya que en la mayoría de estos se utiliza suelo llamado de monte que proviene de bosques de encinos o coníferas que puede estar infestado por *Pythium*. Las macetas deben tener buen drenaje. Con este trabajo se intenta aportar información sobre los daños y síntomas de enfermedades causadas por *Pythium* spp. en varias especies ornamentales que se comercializan ampliamente en viveros de Morelia, Michoacán, dicha información puede ser utilizada para la implementación de medidas de control.

2.5 CONCLUSIONES

Se obtuvieron 19 aislamientos de *Pythium* a partir de muestras de suelo y tejido enfermo de 17 especies ornamentales de cuatro viveros de Morelia.

Se identificaron siete especies de *Pythium* en base a las características morfológicas y a las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr: *P. aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. splendens*, *Pythium* sp. nov.

Se reportan 13 hospederos para las diferentes especies de *Pythium* identificadas en este estudio: ruda (*Ruta graveolens*), primavera (*Primula acaulis*), (*Buxus sempervirens*), pino (*Cedrus* sp.), violeta africana (*Saintpaulia hybrida*), violeta imperial (*Cyclamen persicum*), azalea (*Rhododendron indicum*), gazania (*Gazania rigens*), belén (*Impatiens hawkeri* x *hybrida*), amor de un rato (*Portulaca grandiflora*), santolin (*Santolina chamaecyparissus*), panalillo (*Alyssum maritimum*) y gerbera (*Gerbera* sp.).

De las plantas ornamentales analizadas únicamente el género *Rhododendron* había sido previamente reportado a nivel mundial como hospedante de *Pythium*.

2.6 LITERATURA CITADA

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

Al-Sa'di, A. M., Drenth, A., Deadman, M. L., Al-Said, F. A., Khan, I., and Aitken, E. A. B. 2007. Potential sources of *Pythium* inoculum into greenhouse soils with no previous history of cultivation. J. Phytopath. 156: 502-505.

Bernard, P. 1992. *Pythium cylindrosporum*: a new soil fungi from Germany. Int. J. Mycol. Lichenol. 4(3): 337-345.

Dick, W. M. 1990. Keys to *Pythium*. Department of Botany. School of Plant Sciences. University of Reading. U. K. 64 p.

Duff, J. D. 1993. The Incidence of *Phytophthora* and *Pythium* Species in Northern Territory Nurseries. Aust. Plant. Pathol. 22:149-151.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791

Goodwin, S. B., Drenth, A., and Fry, W. E. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. Curr. Genet. 22:107-115.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41:95–98.

Ho, H. H. 1986. *Pythium dimorphum* from *Rhododendron*. Mycopathologia 93: 141-145.

Kong, P., Richardson, P. A., and Hong, C. 2004. *Pythium* and recycled irrigation water. Pest & Diseases 32-35.

Lévesque C. A., and de Cock. A. W. A. M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycol. Res. 108 (12): 1363-1383.

- MacDonald, J. D., Ali-Shtayed, M. S., Kabashima, J., and Stites, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Dis.* 78: 607-611.
- McLeod, A., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F., Tewoldemedhin, Y. T., and Mostert, L. 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *J. Mycol. Res.* 113: 933-951.
- Martin, F. 2009. *Pythium* Genetics. In: *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. K. Lamour and S. Kamoun (eds.). Wiley-Blackwell. United States of America. pp: 213-239.
- Moorman, G. W., Kang, S., Geiser, D. M., and Kim, S. H. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant Dis.* 86: 1227-1231.
- 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 Pathol.* 58: 100-110
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consultada marzo de 2011).
- Sánchez, J., Olivares, J. S., and Gallego E. 2001. Occurrence and pathogenicity of *Pythium* spp. in the dust deposited on the greenhouse roofs in the Poniente region of Almeria (South-East Spain). *J. Plant. Pathol.* 83: 13-19.
- Sánchez, J., y Gallego E. 2002. Fitopatogenicidad de *Pythium* spp. presentes en el agua de riego del Poniente almeriense (sureste de España). *Rev. Iberoam. Micol.* 19: 177-180.
- Spies, C. F. J., Mazzola, M., and McLeod, A. 2006. Characterization of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevine decline in South Africa. *Proceedings of the 44th Congress*. South Africa. 62 p.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.

Tello, M. M. L., Alonso, A., y Mateo-Sagasta Azpeitia, E. 1995. Algunos hongos patógenos detectados en raíces de diferentes plantas ornamentales en viveros de la Comunidad de Madrid. Bol. San. Veg. Plagas. 21: 517-526.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Stud. Mycol. 21: 1-242.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 315-322.

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. Dis. 93: 883-890.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7:203-14.

DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades de las plantas causadas por patógenos tienen una gran importancia no sólo porque poseen el potencial de causar daños en cultivos, bosques o viveros, sino porque aún en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen el rendimiento de los cultivos. En este trabajo dirigido particularmente al estudio de oomicetes que causan daños en plantas ornamentales de viveros, se detectaron síntomas como pudrición radical y de la corona, muerte regresiva, necrosis en tallos o marchitez causados por diversas especies de *Phytophthora* y *Pythium*, así como varios hospederos afectados por estos patógenos en los estados de Michoacán y Morelos.

La importancia de la realización de este estudio en viveros dedicados a la producción y venta de plantas ornamentales, radica en que los problemas fitosanitarios que ocasionan enfermedades no son tratados la mayoría de las ocasiones debido a la falta de conocimiento acerca de la identidad de los patógenos que las ocasionan.

De los nueve viveros muestreados en este estudio en ocho se detectó a *Phytophthora* y en cuatro a *Pythium*. En total se identificaron 26 aislamientos del género *Phytophthora* obtenidos a partir de 16 diferentes hospederos y 19 aislamientos de *Pythium* a partir de 17 hospederos. Aunque el muestreo se hizo únicamente en nueve viveros, se obtuvieron 45 aislamientos, lo cual es indicativo del serio problema que representan estos patógenos en viveros de plantas ornamentales. Así mismo se puede ver el amplio rango de hospedantes que presentan.

Es por esto que las enfermedades causadas por *Pythium* y *Phytophthora* son un factor limitante importante que afecta la producción de plantas de ornato en viveros, además ambos oomicetes pueden ser transportados de un lugar a otro a través de suelo o agua de riego infestados, al igual que por medio de esquejes, semillas o plantas infectadas. En Michoacán se comercializan plantas provenientes de diferentes estados entre los que se encuentran Edo. de México, Guanajuato, Guerrero y Jalisco, por lo que estos patógenos se están diseminando de un estado a otro en el país.

La identificación de especies de *Pythium* y *Phytophthora* presentes en un vivero es de suma importancia pues representa el paso más importante para el desarrollo de estrategias de

manejo efectivas (Kong *et al.*, 2004). Entre las cuales se recomienda esterilizar el sustrato antes de ser usado en el vivero, ya que en la mayoría de estos se utiliza suelo llamado de monte que proviene de bosques de encinos o coníferas que puede estar infestado por *Pythium* y/o *Phytophthora*. Con este trabajo se intenta aportar información sobre los daños y síntomas de enfermedades causadas por estos oomicetes en varias especies ornamentales que se comercializan ampliamente en viveros de Morelia, Michoacán, dicha información puede ser utilizada para la implementación de medidas de control.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Desde el punto de vista económico, el viverismo es una actividad importante, sobre todo en zonas donde la tierra es un recurso escaso, ya que en poca superficie, se pueden obtener utilidades muy altas, además genera una gran cantidad de empleos, sin embargo, esta actividad en Michoacán y otros estados del país se ve afectada debido a pérdidas económicas causadas por patógenos, por lo tanto es importante conocer a los patógenos que causan estas enfermedades para lo cual es necesario la realización de estudios más extensos mediante colectas en un mayor número de viveros y plantas que muestren síntomas de enfermedades causadas por *Phytophthora* y *Pythium* en los diferentes municipios del estado de Michoacán que se dedican a la producción y venta de plantas de ornato en vivero, así como en otros estados del país para evitar que estos patógenos se sigan diseminando y se puedan reducir las pérdidas producidas por los mismos.

Además es importante obtener datos adicionales a los que se obtuvieron en este estudio de secuencias de genes como el citocromo oxidasa II (coxII) y β tubulina necesarios para corroborar la identidad de grupos taxonómicos que no pueden ser resueltos basados en datos con las secuencias de la región ITS del ADNr.

LITERATURA COMPLEMENTARIA

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

Al-Sa'di, A. M., Drenth, A., Deadman, M. L., Al-Said, F. A., Khan, I., and Aitken, E. A. B. 2007. Potential sources of *Pythium* inoculum into greenhouse soils with no previous history of cultivation. J. Phytopath. 156: 502-505.

Badillo-Ponce, G., Vázquez-García, L. M., Fernández-Pavía, S. P., y Rodríguez-Alvarado, G. 2005. Detección de *Phytophthora cinnamomi* en viveros de aguacate de Michoacán. XXXIII Congreso Nacional de Fitopatología, VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chihuahua 26-29 de Septiembre 2005.

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. <http://www.funprover.org/formatos/PLANES%20ESTRATEGICOS/Cadena%20horticultur a%20ornamental.pdf>. (Consultada Septiembre de 2009).

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 Genet. Biol. 30: 17-32.

Cúndom, M. A., y Cabrera M. G. 2004. Primera determinación de *Phytophthora capsici*, patógeno de filodendro (*Philodendron scandens*) en Argentina. Agric. Téc. 64(4): 421-425.

Dart, N. L., Chastagner, G. A., Rugarber, E. F., and Riley K. L. 2007. Recovery frequency of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* spp. in the soil profile of ornamental retail nurseries. Plant Dis. 91: 1419-1422.

Dick, W. M. 1990. Keys to *Pythium*. Department of Botany. School of Plant Sciences. University of Reading.U. K. 64 p.

Duff, J. D. 1993. The incidence of *Phytophthora* and *Pythium* species in Northern territory nurseries. Austral. Plant Pathol. 22:149-151.

Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 562 p.

Ferguson, A. J., and Jeffers, S. N. 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. Plant Dis. 83:1129-1136.

García, P. F., Ramírez, R. S., Osuna, C. F. J., y Ocampo, O. T. 2009. Enfermedades de las principales ornamentales en Morelos. SAGARPA, CEMOPAC, INIFAP, FUNDACIÓN PRODUCE MORELOS. México. 30 p.

García-Díaz, S.E., Cibrián-Tovar, D., Rodríguez, C., Santiago, E., Cruz-Juárez, J., y Don Juan, B. 2009. Hongos de mayor importancia en viveros forestales. X Congreso Nacional de Micología. Guadalajara, Jalisco 20-24 de Septiembre 2009.

Hong, C., Gallegly, M. E., Richardson, P.A., Kong, P., Moorman G., Lea-Cox J., and Roos, D. 2008. *Phytophthora irrigata* and *Phytophthora hydropathica*, two new species from irrigation water at ornamental plant nurseries. Phytopathology 98: S68. (Abstract).

INIFAP. 2009.
www.inca.gob.mx/.../HORTÍCOLA_Prog.%20Estr.%20Etapa%20II%20PO%20sf.doc
(Consultada Agosto de 2009).

Kong, P., Richardson, P. A., and Hong, C. 2004. *Pythium* and recycled irrigation water. Pest & Diseases 32-35.

MacDonald, J. D., Ali-Shtayed, M. S., Kabashima, J., and Stites, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. Plant Dis. 78: 607-611.

Technical Working Party for Ornamentals. Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). Cuernavaca, Morelos 19-24 Septiembre de 2010. Memorias. <http://snics.sagarpa.gob.mx/prensa/boletines/Paginas/2010-B005.aspx> (Consultada Marzo de 2011).

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 Pathol. 58: 100-110.

Mundo-Ocampo, J. 2006. El vivero ornamental. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 461 p.

Robertson, N. F. 1991. The challenge of *Phytophthora infestans*. In: *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato. D. S. Ingram and P. H. Williams (eds.). Academic Press, London. pp. 1-30

Schwingle, B. W., Smith, J. A., and Blanchette, R. A. 2007. *Phytophthora* species associated with diseased woody ornamentals in Minnesota nurseries. Plant Dis. 91:97-102.

Spies, C. F. J., Mazzola, M., and McLeod, A. 2006. Characterization of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevine decline in South Africa. Proceedings, 44th Congress of the Southern African Society for Plant Pathol. p. 62.

Tello, M. L.; Alonso, A., y Mateo-Sagasta Azpeitia, E. 1995: Algunos hongos patógenos detectados en raíces de diferentes plantas ornamentales en viveros de la Comunidad de Madrid. Bol. San. Veg. Plagas 21: 517-526.

Themann, K., Werres, S., Luettmann, R., and Diener, H.-A. 2002. Observations of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. Eur. J. Plant Pathol. 108:337-343.

Warfield, C. Y., Hwang, J., and Benson, D. M. 2008. *Phytophthora* blight and dieback in North Carolina nurseries during a 2003 survey. Plant Dis. 92:474-481.

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. Dis. 93: 883-890.

Zitko, S. E., Timmer, L. W., and Castle W. S. 1987. Survey of Florida citrus nurseries for *Phytophthora* spp. Proc. Fla. State Hort. Soc. 100: 82-85.

ANEXOS

ANEXO I

Preparación de medios de cultivo

Medio agar-zanahoria (1litro)

20 g de agar

50 g de zanahoria en cubitos

1000 ml de agua destilada

Esterilizar 20 minutos a 121 °C

Medio V8-agar (1 litro)

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

Esterilizar 20 minutos a 121 °C

Medio de harina de maíz (HM) (Fluka Analytical) (1litro)

Se preparan de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Esterilizar 20 minutos a 121 °C

Medio papa dextrosa agar (PDA)

Se preparan de acuerdo a las instrucciones del fabricante

Esterilizar 20 minutos a 121 °C

Medios selectivos

Medio de harina de maíz (PARNH)

A un litro de medio de harina de maíz previamente estéril se le agregan los siguientes fungicidas pentacloronitrobenzeno o PCNB (0.10 g L^{-1}), Delvocid Instant (0.02 g L^{-1}) [(50 % natamicina, 50 % lactosa)] e Himexazol (0.075 g L^{-1}) y los antibióticos: Ampicilina (0.27 g L^{-1}) y Rifampicina (0.01 g L^{-1}).

Medio de harina de maíz (PARN)

A un litro de medio de harina de maíz previamente esterilizado se le agregan los siguientes fungicidas: PCNB (0.10 g L^{-1}) y Delvocid (0.02 g L^{-1}) y los antibióticos: Ampicilina (0.27 g L^{-1}) y Rifampicina (0.01 g L^{-1}).

Medio V8 (PARN)

A un litro de medio V8 previamente esterilizado se le agregan los siguientes fungicidas: PCNB (0.10 g L^{-1}) y Delvocid (0.02 g L^{-1}) y los antibióticos: Ampicilina (0.27 g L^{-1}) y Rifampicina (0.01 g L^{-1}).

Medio líquido de chícharo (1 litro)

120 g de chícharos

1000 ml de agua destilada

Los chícharos se esterilizan con el litro de agua destilada durante 20 minutos a 121°C . Posteriormente se filtra con una manta de cielo y se afora a un litro con agua destilada, se esteriliza nuevamente bajo las condiciones ya mencionadas. El medio se puede almacenar a -20°C .

Preparación de extracto de suelo (1litro)

20 g de suelo húmedo o 10 g de suelo seco

1000 ml de agua destilada

En un matraz Erlenmeyer se mezcla el agua con el suelo y se coloca en agitación a 660 rpm durante 3 horas. Posteriormente la suspensión se filtra las veces necesarias usando un embudo Buchner y papel filtro (Whatman) en el siguiente orden: 2 (8μ), GF/A (1.6μ) y GF/C (1.2μ) hasta eliminar todas las partículas de suelo que sea posible. La filtración se realiza usando un matraz Kitasato, para facilitar la filtración se usa una bomba de vacío. El extracto de suelo puede ser almacenado a 4°C .

Nota. Si el extracto de suelo se almacena a 4°C se debe usar hasta que alcance la temperatura ambiente.

ANEXO II

Protocolo para extracción de ADN de oomicetes (Goodwin, 1992) con modificaciones.

1. Cada aislamiento se crece en medio líquido de chícharo (ver Anexo I) y se incuba a 25 °C, por 5 a 7 días para obtener abundante crecimiento micelial. Una vez que el micelio ha crecido se enjuaga con agua destilada estéril usando un embudo, un matraz y tela filtrante (Miracloth). Posteriormente el micelio se envuelve con papel filtro y papel aluminio estériles y se deshidrata durante 24 a 48 horas a 4 °C. Se utilizan guantes diferentes para cada muestra para evitar contaminación cruzada de las mismas. El micelio deshidratado se muele en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se transfiere a tubos de microcentrífuga. El micelio se puede almacenar a -20 °C hasta que es utilizado.

2. A cada tubo con micelio molido se agregan 900 µl de búfer de extracción (0.5 M EDTA, 1 M Tris-HCl pH 8.0, 5 M NaCl, SDS 20 %, Mercaptoetanol 0.75 %), precalentado de 10 a 15 minutos a 65 °C.

Búfer de extracción (50 ml)

5ml EDTA 0.5 M

5 ml Tris-HCl 1.0 M pH 8

5 ml NaCl 5 M

650 µl SDS al 20 %

350 µl Beta Mercaptoethanol

3. Incubar a 65 °C durante 1 hora.

4. Adicionar 450 µl de acetato de amonio 7.5 M. Mezclar vigorosamente durante 5 minutos y posteriormente mantener en hielo durante 20 minutos.

5. Centrifugar los tubos a máxima velocidad durante 15 minutos.

6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.7 ml conteniendo 800 µl de isopropanol y agitar manualmente. Mantener en hielo por 30 minutos.

7. Centrifugar los tubos a máxima velocidad durante 15 minutos.
8. Descartar el sobrenadante, drenar la pastilla manteniendo el tubo invertido y posteriormente colocar el tubo abierto en una gradilla para que la pastilla se seque a temperatura ambiente.
9. Resuspender la pastilla en 450 µl de TE pH 7.5. Agregar 1 µl de ARNasa A (20 mg/ml). Dejar resuspender toda la noche a 4 °C en refrigeración. Cuidando de no agitar.

TE pH 7.5 (Tris 100 Mm y EDTA 1mM)

1 ml Tris 1 M pH 8.0

0.2 ml EDTA 0.5 M

Aforar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar.

10. Agregar a cada tubo 450 µl de cloroformo: alcohol isoamyl (24:1) y mezclar vigorosamente durante 5 minutos.
11. Centrifugar los tubos a máxima velocidad durante 5 minutos y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
12. Agregar 45 µl de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol 100 % frío, agitar manualmente y mantenerlo mínimo por 1 hora a -20°C. El ADN se puede almacenar a -20 °C hasta que se necesite.
13. Centrifugar los tubos a máxima velocidad durante 15 minutos.
14. Descartar el sobrenadante, drenar la pastilla manteniendo el tubo invertido y posteriormente colocarlo abierto en una gradilla para que la pastilla se seque a temperatura ambiente.
15. Resuspender la pastilla en 100 µl de TE pH 7.5, permitir la resuspensión lenta, dejar toda la noche a 4 °C para mantener los fragmentos de ADN intactos.
16. Analizar por electroforesis 5 µl de ADN en un gel de agarosa 1 % / TAE 1X durante 90 minutos a 50V.

Búfer TAE 50X

242 g Tris base

57.1 ml de ácido acético glacial

100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)

Aforar a 1 litro con agua destilada