

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* MEDIANTE
POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENA
SENCILLA.

TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA
JOSÉ RODRIGO RAMÍREZ SAGAHÓN



Diciembre del 2005

Chapingo, Estado de México

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* MEDIANTE
POLIMORFISMOS CONFORMACINALES DE CADENA SENCILLA**

Tesis realizada por José Rodrigo Ramírez Sagahón, bajo la dirección de la Dr.
Marcelo Acosta Ramos y aprobada por el Comité Asesor indicado, y aceptada
como requisito parcial para obtener el grado de:

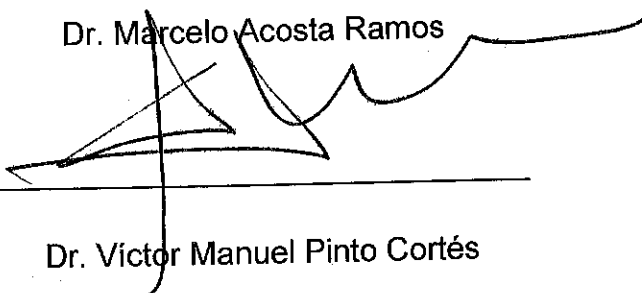
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



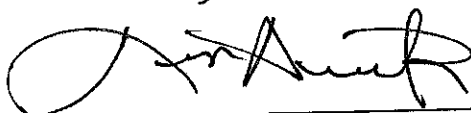
Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR:



Dr. Víctor Manuel Pinto Cortés

ASESOR:



M.C. Jorge Aguilar Ríos

DEDICATORIA

Con todo el cariño, respeto y admiración.

A mis padres

Paulina Sagahón Monroy y Angel Ramírez Ramírez

A mis hermanos

Manuel Angel, Juan Carlos, Santos y Elba Yanelly

Por hacer suyos mis sacrificios y mis logros y por inculcar en mi el afán de superación, la responsabilidad de los compromisos y el respeto a nuestros semejantes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Departamento de Parasitología Agrícola por las facilidades brindadas durante mi estancia.

A la Dirección General de Sanidad Vegetal, en especial al Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario por el apoyo en el uso de las instalaciones para la realización del presente trabajo.

A la Dr. Marcelo Acosta Ramos por la dirección, asesoramiento y revisión del presente trabajo.

Al Dr. Victor Manuel Pinto Cortés, por el apoyo y revisión del presente trabajo.

Al M.C. Jorge Aguilar Ríos por su dedicación, consejos, enseñanza y por el tiempo dedicado en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Nahum Marbán Mendoza por su disposición y apoyo en todo momento.

Al M.C. Camilo Hernández Juárez por sus sabios consejos y apoyo brindado a lo largo de la investigación.

A mis compañeros de generación por los buenos y agradables momentos.

A todos los maestros de la maestría por sus aportes académicos. Y a todas aquellas personas que contribuyeron en la finalización del presente trabajo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos generales

Nombre: José Rodrigo Ramírez Sagahón

Fecha de nacimiento: 22 de junio de 1975.

Lugar de origen: Alamo, Veracruz.

Profesión: Ingeniero Agrónomo Parasitólogo.

Formación académica

Licenciatura: Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (1995-1999).

Maestría: Programa en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo (2003-2005).

DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* MEDIANTE POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENA SENCILLA.

DIFFERENTIATION OF *Phytophthora* SPECIES THROUGH SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM ANALYSIS.

José Rodrigo Ramírez Sagahón¹; Marcelo Acosta Ramos²

RESUMEN

Phytophthora es uno de los géneros más importantes como patógenos de plantas. Formalmente se han identificado alrededor de 60 especies, muchas de gran importancia económica. Varios métodos se han utilizado para la identificación y diferenciación de especies. Los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), son sensibles y rápidos, para detectar diferencias a nivel de ADN. Este estudio permitió diferenciar nueve especies de *Phytophthora*, mediante los patrones electroforéticos SSCP; estableciendo la diferencia a partir de *P. capsici* y *P. cryptogea* (cada una aislada de diferentes hospedantes), con movilidad electroforética similar comparadas con las especies aisladas de un solo hospedante, cuya movilidad electroforética fue diferente.

Palabra clave: *Phytophthora*, SSCP

1 Tesista

2 Director de Tesis

ABSTRACT

Phytophthora is one of the most important genera of plant pathogens. About 60 species have been formally identified. Many species cause considerable economic losses. Several methods have been used for the identification and differentiation of species. Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP), is a fast and sensitive technique that detects differences at the DNA level. This study detected differences nine species of *Phytophthora* through SSCP analysis. The differences was found in *P. capsici* and *P. cryptogea* (each species isolated a different host), with similar electrophoretic mobility in comparison to the species only one host in which the electrophoretic mobility was different.

Key words: *Phytophthora*, SSCP

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE CUADROS	
LISTA DE FIGURAS	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Importancia del género <i>Phytophthora</i>	4
2.2 Morfología del género <i>Phytophthora</i>	4
2.3 Diferenciación de las especies de <i>Phytophthora</i>	5
2.4 Taxonomía del género <i>Phytophthora</i>	6
2.5 Descripción de especies del género <i>Phytophthora</i>	7
2.5.1 <i>P. cactorum</i>	7
2.5.2 <i>P. capsici</i>	9
2.5.3 <i>P. cinnamomi</i>	12
2.5.4 <i>P. citricola</i>	14
2.5.5 <i>P. cryptogea</i>	16

2.5.6 <i>P. fragariae</i>	19
2.5.7 <i>P. infestans</i>	21
2.5.8 <i>P. erythrosepica</i>	23
2.5.9 <i>P. phaseoli</i>	25
2.6 Métodos de diagnóstico para las especies de <i>Phytophthora</i>	27
2.6.1 Método tradiciona (claves taxonómicas.....	27
2.6.2 Métodos serológicos.....	27
2.6.3 Métodos moleculares.....	28
2.6.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa... ..	28
2.6.3.2 Técnica rADN-ITS.....	31
2.6.3.3 SSCP.....	32
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 Colecta del material biológico de especies de <i>Phytophthora</i>	33
3.2 Obtención de los aislamientos.....	34
3.2.1 Obtención de <i>P. capsici</i>	34
3.2.2 Obtención de <i>P. cinnamomi</i>	34
3.2.3 Obtención de <i>P. cryptogea</i>	35
3.2.4 Obtención de <i>P. fragariae</i> y <i>P. cactorum</i>	35
3.2.5 Obtención de <i>P. infestans</i>	35

3.2.6 Obtención de <i>P. phaseoli</i>	36
3.3 Obtención de los aislamientos puros para su identificación.....	36
3.4 Identificación de las especies de <i>Phytophthora</i>	36
3.5 Extracción de ADN a partir de aislamientos puros de especies de <i>Phytophthora</i>	36
3.5.1 Extracción de ADN del micelio fungoso por el método de PlantDNAzol.....	37
3.5.2 Determinación de la concentración y calidad del ADN de especies de <i>Phytophthora</i>	37
3.6. Determinación de la integridad del ADN total.....	38
3.7 Reacción en cadena de la polimeras (PCR).....	39
3.8 Análisis de los productos de la reacción.....	40
3.8 Análisis de las especies de <i>Phytophthora</i> mediante Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP).....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 Obtención de los aislamientos.....	43
4.2 Caracterización cultural y morfológica de las especies de <i>Phytophthora</i>	46
4.3 Mediciones de los esporangios e identificación.....	47

4.4 Caracterización genética.....	50
4.4.1 Evaluación del ADN total para llevar acabo la PCR.....	50
4.4.1.1 Estimación de la degradación del ADN total.....	
4.4.1.2 Estimación de la catidad y calidad (pureza)	
del ADN.....	51
4.4.2 Reacción de la Cadena en Polimerasa (PCR).....	54
4.4.3 Polimorfismos Conformacionales de Cadena	
Sencilla (SSCP).....	56
5. CONCLUSIONES.....	61
6. REVISIÓN DE LITERATURA.....	64

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Material colectado, lugar, donde se colectó y especies de <i>Phytophthora</i> aisladas.....	33
Cuadro 2. Cantidad de reactivo requerido para la mezcla master.....	39
Cuadro 3. Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de policrilamida al 12%.....	41
Cuadro 4. Caracterización cultural y morfológica de las especies de <i>Phytophthora</i>	46
Cuadro 5. Calidad y concentración de especies de <i>Phytophthora</i> correspondientes a la repetición 1.....	52
Cuadro 6. Calidad y concentración de especies de <i>Phytophthora</i> correspondientes a la repetición 2.....	53

Cuadro 7. Calidad y concentración de especies de <i>Phytophthora</i> correspondientes a la repetición 3.....	53
---	----

LISTA DE IMÁGENES

	Pag.
Fig. 1 Síntoma de la parte aislada, crecimiento de la colonia y estructura reproductiva de <i>Phytophthora</i> spp.;	43
1a) Cilíndro central rojo en raíces de fresa, 1b) Crecimiento micelial de <i>P. cactorum</i> , 1c) Esporangios de <i>P. cactorum</i> , 2a) Pudrición blanda en fruto de pepino, 2b) Crecimiento micelial de <i>P. capsici</i> , 2c) Esporangios de <i>P. capsici</i> , 3a). Pudrición café suave en calabaza, 3b) Colonia de <i>P. capsici</i> , 3c) Esporangios de <i>P. capsici</i> , 4a) Pudrición de raíz y marchitez en chile, 4b) Colonia de <i>P. capsici</i> , 4c) Esporangios de <i>P. capsici</i> , 5a) Muerte regresiva o tristeza del aguacatero, 5b) Colonia de <i>P. cinnamomi</i> , 5c) Clamidosporas de <i>P. cinnamomi</i> , 6a) Pudrición de raíz en crisantemo, 6b) Crecimiento de la colonia, 6c) Esporangios de <i>P. cryptogea</i> . 7a) Pudrición de raíces de gerbera, 7b) Colonia de <i>P. cryptogea</i> , 7c) Esporangio de <i>P. cryptogea</i> , 8a) Pudrición de raíz y marchitez en fresa, 8b) Colonia de <i>P. fragariae</i> , 8c) esporangio de <i>P. fragariae</i> , 9a) Tizón tardío en papa, 9b) Colonia de <i>P. infestans</i> , 9c) esporangio de <i>P. infestans</i> , 10a) Vainas de frijol con micelio algodonoso, 10b) colonia de <i>P. phaseoli</i> y 10c) esporangios de <i>P. phaseoli</i> .	
Fig. 2 Estructuras reproductivas, micelio y esporangióforo de especies de <i>Phytophthora</i> , a) Esporagio de <i>P. cactorum</i> , b) Esporangio de <i>P. phaseoli</i> , c) Esporangios de <i>P. cryptogea</i> en gerbera, d) Esporangio de <i>P. capsici</i> en pepino, e) Esporangios de <i>P.</i>	48

infestans, f) Oogonio de *P. cactorum*, g) Esporangio de *P. capsici* en pepino, h) Esporangio de *P. capsici* en chile, i) Micelio turuloso de *P. cinnamomi*, j) Esporangióforo con hinchamientos de *P. infestans*, k) Esporangio de *P. cryptogea* en crisantemo.

Fig. 3 ADN total obtenido por el método PlantDNAzol, a partir de micelio de especies de *Phytophthora*, visualizados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, línea 1 de repetición 1, 2 y 3 *P. cinnamomi*; línea 2 *P. cryptogea* de gerbera; línea 3 *P. cryptogea* de crisantemo; línea 4 *P. fragariae*; línea 5 *P. infestans*; línea 6 *P. capsici* de pepino; línea 7 *P. capsici* de chile; línea 8 *P. capsici* de calabaza; línea 9 *P. phaseoli*; línea 10 *P. cactorum*; línea 11 *P. erythrosepica* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 repetición 1 *P. cinnamomi* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 en repetición 2 y 3 *P. citricola* CNRDF; línea 13 repetición 2 y 3 *P. capsici* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

Fig. 4 Representación de los fragmentos amplificados por PCR usando los primers ITS4 e ITS6, amplificando fragmentos que van de 862 pb a 941 pb de diferentes especies de *Phytophthora*. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 GIBCO BRL; línea 1 de repetición 1, 2 y 3 *P. cinnamomi*; línea 2 *P. cryptogea* de gerbera; línea 3 *P. cryptogea* de crisantemo; línea 4 *P. fragariae*; línea 5 *P. infestans*; línea 6 *P. capsici* de pepino; línea 7 *P. capsici* de chile;

línea 8 *P. capsici* de calabaza; línea 9 *P. phaseoli*; línea 10 *P. cactorum*; línea 11 *P. erytroseptica*; línea 12 repetición 1 *P. cinnamomi* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 en repetición 2 y 3 *P. citricola* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 13 repetición 2 y 3 *P. capsici* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

Fig. 5 Análisis de patrones SSCP de los productos amplificados mediante PCR a partir de los primers ITS4 e ITS6 de 8 especies de *Phytophthora*: Línea 1 *P. fragariae*, línea 2 *P. infestans*, línea 3 *P. phaseoli*, línea 4 *P. cactorum*, línea 5 *P. cinnamomi*, línea 6 *P. cinnamomi* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 7 *P. capsici* de pepino, línea 8 *P. capsici* de chile, línea 9 *P. capsici* de calabaza, línea 10 *P. erytroseptica*, línea 11 *P. cryptogea* de gerbera y línea 12 *P. cryptogea* de crisantemo. 57

Fig. 6 Análisis de patrones SSCP de los productos amplificados mediante PCR de 9 especies de *Phytophthora*: Línea 1 *P. fragariae*, línea 2 *P. infestans*, línea 3 *P. phaseoli*, línea 4 *P. cinnamomi*, línea 5 *P. capsici* de pepino, línea 6 *P. capsici* de chile, línea 7 *P. capsici* de calabaza, línea 8 *P. erytroseptica* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 9 *P. capsici* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 10 *P. cryptogea* de gerbera, línea 11 *P. cryptogea* de crisantemo, línea 12 *P. cactorum* y línea 13 *P. citricola* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario). 58

Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

Fig. 7 Análisis de patrones SSCP de los productos amplificados mediante PCR de 9 especies de *Phytophthora*: Línea 1 *P. fragariae*, línea 2 *P. infestans*, línea 3 *P. cryptogea* de gerbera, línea 4 *P. cryptogea* de crisantemo, línea 5 *P. phaseoli*, línea 6 *P. cinnamomi*, línea 7 *P. capsici* de pepino, línea 8 *P. capsici* de chile, línea 9 *P. capsici* de calabaza, línea 10 *P. capsici* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 11 *P. erytroseptica* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 12 *P. cactorum* y línea 13 *P. citricola* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

58

1. INTRODUCCIÓN

Phytophthora (del griego, *phyton*: planta; *phthora*: destrucción) es uno de los géneros más importante como patógenos de plantas (Abad, 2003), causa considerables pérdidas económicas en plantas cultivadas, ornamentales y árboles forestales; también tiene un fuerte impacto sobre algunos sistemas de vegetación nativa (Erwin and Ribeiro, 1996).

Formalmente se han identificado alrededor de 60 especies (Stamps *et al.*, 1990), que existen en un amplio rango de nichos ecológicos. Muchas de las especies pueden atacar un amplio rango de hospedantes como el caso de *Phytophthora cinnamomi* y *P. cactorum*; otras como *P. infestans* el rango es más limitado (Carlile *et al.* 2001). La mayoría de las especies pueden afectar la parte aérea de la planta, pero más frecuentemente la base del tallo y raíces, lo cual hace más difícil su detección y diagnóstico. En algunos casos pueden estar involucradas más de una especie causando la enfermedad

La identificación de las especies se basa principalmente en la forma del esporangio y características morfológicas de las estructuras sexuales; otros criterios ampliamente utilizados son: la temperatura óptima y rango de crecimiento, características morfológicas de las colonias, y tipo de apareamiento (Bonants *et al.*, 2000). Sin embargo el uso de características taxonómicas y fenotípicas es difícil, ya que muchas especies son muy similares y no existe una gran variación entre los aislamientos (Erwin and Ribeiro, 1996; Appiah *et al.*, 2003). Las técnicas moleculares son sencillas y pueden utilizarse como un método adjunto, para la identificación, diagnóstico y clasificación

taxonómica de especies de *Phytophthora*, se incluyen: el uso de polimorfismos del ADN amplificados al azar o RAPD (Goodwin *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1993), polimorfismos en la longitud de los fragmentos de ADN o RFLP y más recientemente polimorfismos conformacionales de cadena sencilla o SSCP; análisis del espacio transcrito interno (ITS).

Los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla o SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) representan un método sensible y rápido para la detección de mutaciones puntuales identificadas en los productos amplificados de PCR a partir de ADN genómico (Hayashi, 1991).

Es un método rápido, simple y no isotópico (no radioactivo) que involucra la desnaturalización del ADN de doble cadena (dsADN) por álcali o formamida para obtener ADN de una sola cadena (ssADN) y observar su movilidad sobre un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes; permite determinar variantes a nivel ADN de un sin número de patógenos (Xie *et al.*, 2002; Aguilar, 2004).

El presente trabajo se llevó a cabo para conocer al variación de las secuencias de nueve especies de *Phytophthora*, amplificando la región ITS de cada especie por PCR y analizadas como polimorfismos conformacionales de cadena sencilla.

1.1 Hipótesis

- ❖ Es posible diferenciar especies *Phytophthora* con características morfológicas y fisiológicas
- ❖ Es posible utilizar los Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP) para la detección y diferenciación entre especies de *Phytophthora*.

1.2 Objetivos

- ❖ Realizar una caracterización morfológica y fisiológica nueve especies de *Phytophthora* aisladas de varios hospedantes.
- ❖ Implementar la técnica de SSCP para la diferenciación de especies de *Phytophthora*

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del género *Phytophthora*

Muchas de las especies de *Phytophthora* son económicamente importantes como patógenos de plantas, capaces de causar pérdidas significativas a muchos cultivos (Ristaino *et al.*, 2000). Este género por lo general está asociado con la base de los tallos y raíces, lo que hace más difícil su detección y diagnóstico. En algunos casos pueden estar involucradas más de una especie causando enfermedades tales como: pudriciones de raíz, cuello, tallos, hojas y frutos en un rango amplio de plantas cultivadas, ornamentales y árboles forestales de importancia económica. Algunas especies como: *P. cinnamomi* y *P. cactorum* atacan a cientos de especies de plantas hospedantes. Otras como: *P. infestans* tiene un restringido rango de hospedantes, infecta a pocas especies de plantas (Tyler, 2002).

2.2 Morfología del género *Phytophthora*

El género *Phytophthora*, descrito por De Bary en 1876, con *P. infestans* como tipo, está representado por especies de una gran riqueza morfológica (Romero, 1993). El micelio cenocítico como el de todos los Oomycetes está compuesto de hifas lisas, con hinchamientos o turgencias y ramificaciones muy peculiares en determinadas especies. Los esporangios varían en forma, y es frecuente encontrarlos desde ovoides a alimonados, obpiriformes, ovales o simplemente largos; su tamaño también es variable, aunque lo más importante es según Waterhouse (1963) su relación largo-ancho. Otra característica muy

notable de los esporangios es la papila, la cual es un hinchamiento apical del esporangio que por su tamaño puede ser conspicua (mayor de 4 μm) o inconspicua (menor de 3 μm) y algunos esporangios no tienen papila (Romero, 1993). Los oogonios, generalmente, son terminales y de forma esférica, hialinos al principio, varían de color amarillo a café cuando maduran; sus paredes son delgadas y lisas. Los anteridios aparecen como puntas de hifa hinchadas, multinucleadas y separadas de la hifa madre por una septa; al madurar adoptan forma esférica, oval, claviforme o cilíndrica según la especie. Por su origen, los anteridios pueden ser monoclinos, si es que nacen de la misma rama oogonial, o diclinos, si proceden de diferente rama; y por su posición, se denominan anfíginos, si se encuentran rodeando al tallo del oogonio, o paráginos, si están colocados al lado del oogonio (Erwin and Ribeiro, 1996).

2.3 Diferenciación de las especies de *Phytophthora*.

Phytophthora es un género complejo dentro de los Oomycetes, que presenta alrededor de 60 especies existentes descritas en un rango amplio de nichos ecológicos (Erwin and Ribeiro, 1996). La diferenciación de estas se basa en criterios morfológicos y fisiológicos (Stamps *et al.*, 1990) que incluye estructura del esporangio, presencia o ausencia de clamidosporas, temperatura de crecimiento, posición del anteridio (anfígeno o parágino), especificidad del hospedante y sistema de reproducción (homotálico o heterotálico).

Las claves taxonómicas producidas por Waterhouse (1963) y modificadas Stamps *et al.* (1990), categorizan a las especies en seis grupos, basadas en una serie de parámetros morfológicos y fisiológicos que nos ayudan a la identificación de las especies y su ubicación taxonómica.

Grupo I. Esporangios papilados: engrosamiento apical hemi esférico o al menos de 5 μm , orificio de 7 μm o menos. Abundancia de esporangios en medios

sólidos; generalmente deciduos; sin proliferar internamente. Formación de oosporas en el hospedante. Anteridios paráginos en su mayoría.

Grupo II. Esporangios como en el grupo I. Generalmete heterotálicos. Anteridio anfigino.

Grupo III. Papila más pequeña que en grupo I y II, algunas veces inconspicua; engrosamiento apical evidente pero no hemiesférico (no más de 3.5 μm), orificio de 7 μm o menos. Esporangios pueden o no ser deciduos, sin proliferar internamente, homotálicos, anteridio predominate parágino.

Grupo IV. Papila del esporangio como en grupo III. Esporangio generalmente deciduo; sin proliferar internamente, homotálicos o heterotálicos. Anteridios predominantemente anfigenos.

Grupo V. Esporangios no papilados; orificio de 12 μm o más, no deciduos, raramente producidos en medios de cultivo; proliferan internamente. Oosporas producidas en la planta o en medios de cultivo. Anteridios paráginos en su mayoría.

Grupo VI. Esporangios en V. Homotálicos o heterotálicos. Anteridios anfigenos, en su mayoría.

2.4 Taxonomía del género *Phytophthora*

Es característica del Phylum poseer zoosporas biflageladas, una tipo pincel y otra látigo; los núcleos de las hifas asimilativas son diploides, y las paredes de las hifas usualmente están compuestas de celulosa (Kirt *et al.*, 2001; Kendrick, 2000), lo que lo hace diferente de los hongos verdaderos.

La clasificación jerárquica se presenta de la manera siguiente:

Reino Chromista

Phylum Oomycota

Clase Oomycetes

Orden Pythiales

Familia Pythiaceae

Género *Phytophthora*

2.5 Descripción de especies del género *Phytophthora*

2.5.1 *P. cactorum* (Leber y Cohn) Schroeter (1886)

Antecedentes

Leber y Cohn en 1870 aislaron a esta especie a partir de la cactácea *Cereus giganteus* en Alemania y le asignaron el nombre de *Peronospora cactorum*. Posteriormente, Schroeter (1889) la cambió al género *Phytophthora*. Y debido a su rango amplio de hospedantes (Romero, 1993), actualmente dicho patógeno se encuentra en todo el mundo, se presenta en un grado mayor en las regiones cálidas (Erwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

P. cactorum ataca a un gran número de plantas que incluye ornamentales, forestales, hortalizas y frutales como manzano, peral entre otros (Romero, 1993). Generalmente los aislamientos que se obtienen de esta especie no son de un hospedante específico (Erwin and Ribeiro, 1996).

Síntomas y daño

La importancia de *P. cactorum* radica en que es el agente causal de muchas enfermedades de importancia económica, especialmente en plantas arbustivas. Los daños que ocasiona son en general pudriciones en raíz, cuello (cancrosis), frutos, atizonamiento en hojas, marchitez y atizonamiento de plántulas a más de 200 especies de plantas en 150 géneros botánicos distribuidos en 60 familias (Erwin and Ribeiro, 1996; Romero, 1993).

En fresa es de gran importancia económica (Madden *et al.*, 1991) ya que bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, más del 80% de los frutos pueden llegar a ser afectados en áreas infectadas; además del fruto, el daño también se presenta en el cáliz, pedúnculo y tallos del fruto. Lesiones café oscuro se presentan tanto en frutos verdes como maduros. Posteriormente las lesiones se tornan café brillante, llegan a ser de color púrpura (Erwin and Ribeiro, 1996).

Los síntomas que presentan las plantas de fresa con pudrición del cuello son: marchitamientos y muerte regresiva de la planta. Las raíces muestran necrosis y lesiones rijizas café dentro del cuello (Wilcox, 1989).

Morfología

P. cactorum esta clasificada en el grupo I (Waterhouse, 1963; Stamps *et al.*, 1990). El **micelio** es de apariencia general liso, poco hinchado pero no toruloso, hifas moderadamente gruesas (de 3.5 a 14.5 μm) y muy ramificadas; **esporangióforos** ramificados, en simposio simple; **esporangios** papilados, normalmente terminales y ocasionalmente intercalares, la forma es muy variada ya que pueden ser elipsoidales, obpiriformes u ovoides a esféricos, son caducos con un pedicelo corto, de 21 a 54 X 17 a 46 μm , con papila conspicua;

clamidosporas abundantes, esféricas o terminales, raramente intercalares, germinan en corto tiempo y emiten tubos germinativos que a su vez originan clamidosporas secundarias; los **oogonios** son globosos, lisos, con base alargada en forma de embudo, de 23 a 34 μm de diámetro; **anteridios** paráginos, nacidos en la misma hifa del oogonio y próximos a la base de éste; **oosporas** esféricas con pared gruesa, pleróticas, de color amarillo paja, de 20 a 29.5 μm de diámetro, producidas homotálicamente (Oudemans *et al.*, 1991; Romero, 1993).

Ciclo de vida

Las oosporas de *P. cactorum* sobreviven en frutos momificados en campo aún cuando las temperaturas en invierno son inferiores a -1.1°C (Grove *et al.*, 1985) y como los frutos sanos están próximos al suelo, se ven afectados rápidamente por la extensión del inoculo con el salpique de la lluvia a plantas sanas (Madden and Ellis, 1990).

2.5.2 *P. capsici* Leonian (1922)

Antecedentes

P. capsici fue descrito por Leonian (1922) como agente causal de la marchitez del chile en Nuevo México, U.S.A., el cual fue originalmente considerado como hospedante específico, sin embargo esta especificidad no fue muy duradera y no se puede usar como un criterio taxonómico, porque actualmente este patógeno se encuentra afectando a un gran número de especies de plantas hospedantes (Erwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

Este oomycete es el agente causal de la enfermedad más universalmente conocida como marchitez del chile (Ortega, 1990). Esta enfermedad afecta de forma grave a los cultivos de chile en estado de plántula e incluso, otras plantas adultas de solanáceas. En especies de cucurbitáceas es un patógeno muy destructivo (Café-Filbo, 1995). Y también puede ser tan destructivo en campos de Zanahoria, Jitomate, Berenjena, y últimamente en cacao, debido a su gran velocidad de crecimiento y esporulación abundante (Romero, 1993).

Sintomatología y daño

Esta enfermedad puede causar marchitez foliar, pudrición en fruto, tallos y raíces. El hongo puede provocar daños en cualquier parte de la planta y estado de desarrollo (Tsao, 1991), observándose marchitez y amarillamiento generalmente después de la floración. En el tallo y raíz principal se observa un necrosamiento muy marcado en el tejido interno y externo. Los tejidos dañados son de consistencia dura y no se desprenden con facilidad, en hojas se presentan lesiones de color verde pálido a café claro con margen amarillento, textura rígida y quebradiza (Mendoza, 1996). En las ramas llegan a observar lesiones de color café oscuro y en los frutos se presentan manchas cafés de consistencia acuosa hundidas a veces cubiertas por el micelio del hongo, generalmente en el punto de contacto entre el fruto y el suelo, infecta tanto frutos verdes como maduros, las semillas también son afectadas (Jones *et al*, 1991).

El hongo *P. capsici* no tiene preferencia por algún tejido, por lo que es capaz de infectar cualquier parte de la planta, sin importar la edad de la misma. La infección primaria se inicia a nivel del suelo, la parte invadida pierde turgencia, cae o queda erguida (Espinoza, 1999).

El daño se presenta en preemergencia y postemergencia; en el primer caso la semilla solo alcanza a germinar y la radícula se muestra de color café con muerte rápida, en el segundo, la planta presenta flacidez progresiva hasta marchitarse por completo, apreciándose así en el cuello un estrangulamiento café oscuro que luego ocasiona la muerte. El estrangulamiento por lo general se presenta después de la floración con una incidencia mayor que en preemergencia; los puntos dañados se colorean rápidamente y se arrugan sin que la planta cambie de coloración. Puede provocar atizonamiento de hojas y una pudrición hundida de frutos con un crecimiento blanco en el interior del fruto. El hongo penetra por el cuello de la planta, provoca una pudrición dura y ocasiona la marchitez de la planta, la cual es causada básicamente por una toxina que secreta el hongo y mata a las células por taponamiento de los haces vasculares (Mendoza, 1993).

Morfología

Es un hongo heterotálico clasificado en el grupo II (Waterhouse, 1963; Stamps *et al.*, 1990) de **micelio** cenocítico, con abundantes ramificaciones lisas, e hinchadas y de colonia finamente radiada; **esporangióforo** simple o ramificado de forma robusta y gruesa con un hinchamiento cercano a la base del **esporangio**, el cual es ovoide y guarda la relación 1.7 μm de largo por ancho, de crecimiento indeterminado y simpodio simple, papila conspicua, en ocasiones dividida y frecuentemente con dos papilas; clamidosporas raras o ausentes, presenta un pecíolo largo el cual varía entre aislamientos de Chile y cucurbitáceas (Ristaino 1990); **oogonio** esférico a subesférico, de paredes lisas; anteridios basales anfiginos de 2 a 21 μm de largo por 12 a 17 μm de ancho; **oosporas** generalmente apleróticas, esféricas a subesféricas con pared gruesa lisa, de un diámetro promedio de 31.5 μm (Romero, 1993).

Ciclo de vida

Habita en el suelo de forma natural, sobrevive sobre y dentro de la semilla, una forma de inoculo primario son las oosporas que son capaces de sobrevivir en el invierno (Galindo, 1962). En las plantas de Chile la infección se presenta en la etapa de plántulas pero el problema principal se observa en la época de floración, en las cucurbitáceas el problema principal es en la etapa de fructificación (Mendoza, 1993).

2.5.3 *P. cinnamomi* Rands (1922)

Antecedentes

La primera descripción de esta especie la realizó Rands en 1922 como el agente causal del cancro en *Cinnamomum burmannii* en Sumatra. Desde entonces se ha demostrado que esta especie causa pudriciones de raíz severas en una gran cantidad de árboles forestales (Erwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

Desde que se comenzó a estudiar este patógeno se ha encontrado un variado y numeroso grupo de hospedantes tales como: aguacate (Turkey, 1933); piña (Sabih, 1930); pino, ciprés, coníferas (Newhook, 1959); durazno, papaya, etc. (Zentmyer, 1976) eucalipto (Podger, 1972); azalea (Jenkis *et al.*, 1970), entre muchos otros. Razón por la cual, este patógeno es conocido mundialmente (Citados por Erwin and Ribeiro, 1996).

Síntomas y daño

Es un patógeno habitante del suelo, económica y ecológicamente importante a nivel mundial que ataca a un rango amplio de plantas hospedantes (Linde *et al.*, 1994). Infecta a las raíces ocasionando pudrición y posteriormente el follaje de la planta infectada llega a ser clorótica y se marchita, causando rápidamente una muerte regresiva en la planta (Robin *et al.*, 1992). Los frutos no alcanzan su tamaño normal y es común observar que se producen en número mayor, debido a que la pudrición de la raíz impide la circulación completa del alimento elaborado y éste se acumula en la parte aérea, y estimula la formación de frutos (Romero, 1993).

Morfología

P. cinnamomi se encuentra ubicado en el grupo VI (Waterhouse, 1963; Stamps *et al.*, 1990) debido a las características siguientes: **Micelio** cenocítico, turuloso, con vesículas globosas o piriformes de diferentes tamaños, por lo que las hifas presentan un diámetro variable que va de 3.5 a 21 μm (Romero, 1993). Una característica importante del crecimiento micelial en medio de cultivo es que presenta un aspecto de rosa o camelia, debido al crecimiento deprimido y algodonoso del micelio, que tiene lugar a intervalos regulares; **esporangióforos** en simposio simple o ramificado, en ocasiones por proliferación esporangial, pueden ser cortos o largos; **los esporangios** son ovides, obpiriformes o elipsoidales a alargados, sin papila (Erwin and Ribeiro, 1996), no se producen en medios sólidos, si embargo en extracto de suelo se forman en abundancia (Romero, 1993; Mendoza, 1993) llegando a medir de 23 a 63 X 15 a 38 μm . Este patógeno produce un gran número de **clamidosporas** esféricas, ovales, piriformes, terminales o intercalares, frecuentemente en racimos que persisten en plantas sin síntomas, residuos y suelo por muchos años (Zemtmeyer *et al.*, 1966). Como especie heterotática, las **oosporas** se producen cuando tenemos

el apareamiento de los dos tipos de compatibilidad la A1 y A2 (Haasis and Nelson, 1963; Galindo *et al.*, 1964) siendo esta última más común de encontrar, los **oogonios** son esféricos terminales, de 40 µm de diámetro, de color amarillo pálido al envejecer; anteridios subclaviformes, largos de 21a 23 X 17 µm (Romero, 1993).

Ciclo de vida

P. cinnamomi como habitante del suelo vive parasitando las raíces y base del tallo. Inverna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. Las oosporas germinan en forma de zoosporas, en el caso del micelio se desarrolla hasta llegar a producir esporangios que liberan zoosporas, las cuales se transportan por el agua presente en el suelo e infectan las raíces. El hongo forma más micelio y zoosporas durante los climas húmedos y moderadamente fríos. En climas secos, cálidos incluso demasiado fríos, el hongo sobrevive en forma de oosporas, clamidosporas o micelio que puede una vez más iniciar nuevas infecciones cuando el suelo se encuentra húmedo y la temperatura es favorable (Agrios, 2001).

2.5.4 *P. citricola* Sawada (1927)

Antecedentes

El primer aislamiento de este hongo lo realizó Sawada en 1927 en frutos de naranjo con síntomas de pudrición café. Actualmente es conocido que *P. citricola* causa pudriciones de raíz y canchros en troncos de muchas plantas de importancia económica (Edwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

Este patógeno tiene como hospedante principal a los frutos de cítricos que se localizan en las regiones mediterráneas y subtropicales de varias partes del mundo, también ataca a otros cultivos de importancia económica como: tomate, piña, aguacate, durazno, frambuesa, uva, entre otros (Erwin and Ribeiro, 1996).

Síntomas y daño

P. citricola es causante de enfermedades importantes en los cítricos. La infección en el fruto produce una pudrición parda, el área afectada es de color café, correosa y no hundida comparada con la corteza adyacente. En condiciones húmedas se forma un micelio blanco en la superficie de la corteza del fruto, y si continúan las condiciones favorables, el hongo produce los esporangios, los cuales se dispersan a los frutos en toda la copa. La mayor parte de los frutos infectados se caen pronto y los que son recolectados puede que no muestren ningún síntoma hasta después de haber sido conservados en almacén durante unos días. Las raíces son infectadas en el córtex y causan un deterioro de las raíces fibrosas. El córtex se hace blando, se decolora y aparece húmedo. Las raíces fibrosas se desprenden de su córtex, dejando sólo el cilindro central (tejido vascular) que sobresale de los extremos de las raíces (Timmer *et al.*, 2002).

Morfología

P. citricola es clasificado en el grupo III (Waterhouse, 1963; Stamps *et al.*, 1990). La forma del **esporangio** es muy variable, puede ser ovoide, obclavada y obpiriforme a delgada y aplanada de un lado y ocasionalmente bifurcadas con dos, tres o hasta cuatro ápices (Zentmyer, 1974). Los esporangios son semipapilados de 30 a 75 μm de largo X 21 a 44 μm de ancho.

Los **esporangióforos** ocasionalmente en simposio simple. Es una especie homotática con anteridios paraginos (raramente anfigenos); **oogonios** son esféricos con un diámetro de 18 a 35 μm ; las **oosporas** son esféricas, la mayoría pleróticas de 16 a 30 μm en diámetro (Erwin and Ribeiro, 1996).

Ciclo de vida

Este patógeno sobrevive en los desechos de las raíces. El córtex podrido se desprende y el hongo produce clamidosporas, que pueden persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo. Cuando vuelven las condiciones favorables, las clamidosporas germinan indirectamente produciendo esporangios y zoosporas, o directamente produciendo micelio. También puede persistir como micelio o esporangios de paredes gruesas en raíces vivas infectadas. Los frutos son infectados cuando están próximos a la madurez por esporangios y zoosporas salpicadas desde el suelo. Después se producen infecciones secundarias, desde las partes de la planta situadas por encima de la tierra, debidas al inóculo que es dispersado por el salpique de agua o por lluvia con viento fuerte (Timmer *et al.*, 2002).

2.5.5 *P. cryptogea* Pethybridge and Lafferty (1919)

Antecedentes

Primero fue descrito como el agente causal de la pudrición del pie de tomate en Irlanda por Pethybridge and Lafferty en 1919. Ahora es reconocido a nivel mundial como un patógeno importante de ornamentales, principalmente aquellas cultivadas bajo invernadero y de muchos árboles frutales (Erwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

P. cryptogea ataca una gama amplia de árboles y arbustos *prunus malus*, *populus*, *eucaliptos*, *casianea*, cultivos como: tomate, papa, cártamo, frijol, alfalfa, melón, garbanzo, espinaca y berro. También son hospedantes frecuentes las flores como: gerbera y otras compuestas (*Aster*, *Callistephus*, *Chrysanthemum*, *Dahlia*, *Osteospermum*, *Seneceio*, *Tagetes*, *Zinnia*), pero también *Tulipa*, *Sinningia*, *Papaver*, *Cheiranthus*, *Matthiola*, *Antirrhinum*, *Gysophila*, *Lupinus*, *Begonia* (Smith, 1992).

Sintomatología y daño

P. cryptogea es un patógeno importante en ornamentales capaz de destruir una gran cantidad de plantas al extenderse con rapidez en el cultivo (Smith, 1992); invade los tejidos de la corona casi a nivel del suelo y avanza hacia las raíces, y tiene como consecuencia que las hojas se marchiten repentinamente y mueran en cuestión de días. Los tejidos enfermos de la corona y raíz son suaves y húmedos de color café oscuro e inodoro. Esta enfermedad se caracteriza por el desprendimiento de la corteza al arrancar la planta y solo sale el cilindro central (Romero y Solís, 1996). También existe formación de manchas blanquecinas en la base de los tallos principalmente a nivel de esqueje (Arbos, 1992).

Smith (1992) mencionó que la gerbera es susceptible en cualquier estadio, pero puede serlo más durante la floración. Los síntomas que se presentan se inician en la base del pecíolo de las hojas que se ennegrecen y acaban por pudrirse, así como el cuello de la planta. Las raíces que en el comienzo del ataque presentan un estado normal, finalmente ennegrecen y pudren (Baños et al., 1993).

P. cryptogea se puede encontrar en agua de riego, donde puede sobrevivir en ausencia de su hospedante. Es un saprófito que tiene la capacidad de colonizar la materia orgánica muerta en donde puede persistir por más de cuatro años en ausencia de su hospedante (Erwin and Ribeiro, 1996).

Morfología

P. cryptogea esta ubicada en el grupo VI (Waterhouse, 1963; Stamps *et al.*, 1990). **Micelio** cenocítico, liso y radiado. El **esporangio** es oval a obpiriforme con base redondeada, sin papila y persiste sobre el pedicelo; los esporangios que se desarrollan después tienden a ser más alargados y de formas variables (Ho *et al.*, 1992). El tamaño va de 30 a 93 μm de largo y de 15 a 51 μm de ancho. Los **esporangioforos** son de 2 a 3.5 μm de ancho. Es una especie heterotática que requiere de un aislamiento opuesto para la formación de Oogonios y Oosporas. El anteridio es anfígeno y esférico con 10 μm de diámetro, algunas veces puede ser oval o cilíndrico. Los **Oogonios** son de 28 a 40 μm de diámetro con paredes lisas y de color amarillo café con la edad. Las **Oosporas** son pleróticas de 20 a 32 μm de diámetro con paredes delgadas (Erwin and Ribeiro, 1996)

Ciclo de vida

P. cryptogea cuando en el suelo existe agua libre produce micelio y esporangios abundantes; los cuales liberan zoosporas, que al penetrar la base del tallo por medio de un tubo germinativo causa lesiones pequeñas de color café oscuro. El tubo germinativo crece en los tejidos internos de la planta y se convierte en micelio a expensas de las células de la planta, las cuales descompone (causa la pudrición) para obtener alimento. Como consecuencia las lesiones se extienden horizontal y verticalmente, llegando a afectar una gran parte del tallo y raíz (Romero, 1993).

2.5.6 *P. fragariae* Hickman (1940)

Antecedentes

La enfermedad fue observada por primera vez en Escocia en 1921 causando serios problemas en plantas, presentando achaparramiento, clorosis y caída de frutos; sin embargo Alcock (1929), describió la enfermedad como la pudrición rojiza debido a que en cilindro central de las raíces se tornan rojizas e indicó que el agente causal de dicha enfermedad es una especie de *Phytophthora* debido a la presencia de oosporas, pero Hickman en 1940 señaló que el agente causal de la pudrición basal rojiza de la fresa fué *P. fragariae* (Milholland, 1994).

Hospedantes

Mckeen (1958) reportó a una raza de *P. fragariae* infectando zarzamora en Briths Columbia, Canadá, causando una degeneración de las raíces en el cultivo; pero Wilcox en 1993 realizó estudios morfológicos, fisiológicos y moleculares indicando que los patógenos asociados al cultivo de zarzamora y fresa pertenecientes al género *Phytophthora* son organismos diferentes pero relacionados y concluyó que *P. fragariae* var. *rubi* es el patógeno presente en zarzamora y *P. fragariae* var. *fragariae* es el patógeno asociado al cultivo de fresa.

Síntomas y daño

El cilindro central rojo actualmente es reconocido como la enfermedad más importante de la fresa en el mundo (Erwin and Ribeiro, 1996). Los síntomas de la enfermedad, generalmente no se manifiestan durante el primer año, si no hasta fines de la primavera o a principios del otoño del año siguiente (Milholland, 1994), época en que aparecen manchones de plantas poco desarrolladas, con

las hojas de color verde opaco y muy pocos frutos. Además de los síntomas descritos, la enfermedad produce síntomas muy característicos en la raíz. Si se compara una planta sana con una enferma se podrá apreciar que las raíces de la planta sana son de textura firme y con numerosas raíces secundarias, mientras que las raíces de la planta enferma muestran una pudrición suave, casi no tiene raíces secundarias y la corteza se tiende a separar del cilindro central, el cual al quedar expuesto al aire libre, adquiere la coloración roja (Romero, 1993).

Morfología

P. fragariae está clasificado en el grupo V (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990). **Micelio** cenocítico poco ramificado, hifas que crecen extra e intercelularmente, frecuentemente moviéndose de una célula a otra y penetrando directamente por las paredes celulares. Posteriormente se da la formación de órganos reproductivos y de **esporangios** (Milholland and Daykin, 1993), los cuales son obpiriformes, ovoides de 32 a 90 μm X 22 a 52 μm de largo y ancho, sin papila; **esporangióforo** en simposio simple o ramificado, generalmente cortos; gametangios producidos homotálicamente en el cilindro central de la raíz; los **oogonios** son globosos a subglobosos, de paredes gruesas a lisas de 28 a 40 μm de diámetro; **anteridios** anfígenos y paráginos, predominando los últimos; **oosporas** esféricas de paredes gruesas a lisas de 24 a 44 μm de diámetro, apleróticas (Milholland, 1994).

Ciclo de vida

Las zoosporas de *P. fragariae* son los propagulos principales que al entrar en contacto con el hospedante causan la infección; estas se transportan a través del agua y duran por mucho tiempo enquistadas, germinan y entonces penetran por las células epidermicas de las raíces. Law and Milholland (1991),

determinaron que el sitio de infección de *P. fragariae* en raíces de plantas de fresa esta entre los 10 mm de la punta de la raíz, donde se comienzan a producir nuevos esporangios y se da la infección (Milholland, 1994).

2.5.7 *P. infestans* (Mont.) de Bary (1876)

Antecedentes

P. infestans es el agente causal del tizón tardío de la papa y tomate, apareció casi simultáneamente en Europa y Estados Unidos en la década de 1830–1840 (Hooker, 1981), causando daños severos a la papa, particularmente en Irlanda. El primero en describir la taxonomía de este patógeno fue Martius (1842), quien le dió el nombre de *Gangrena tuberum solani*; en 1845, Montagne la clasificó como *Botrytis infestans*. Unger, en 1847, la cambió al género *Peronospora*, hasta que finalmente De Bary en 1876, propone el género *Phytophthora*, sugiriendo a esta especie como tipo (Romero, 1993)

Hospedantes

P. infestans tiene un rango limitado de hospedantes, los hospedantes principales son las solanáceas, entre ellas papa y tomate; es considerado de gran importancia por los daños severos que ocasiona a la papa, siendo esta un cultivo vital para la dieta de la gente en el mundo (Erwin and Ribeiro, 1996).

Síntomas y daño

El tizón tardío causado por el Oomycete *P. infestans* es una enfermedad devastadora de la papa y tomate (Andrivon, 1995). Su nombre se debe a causa de los síntomas de quemado que provoca en el follaje y fruto de ambos cultivos. El síntoma en hojas se presenta con manchas necróticas color café oscuro o

café púrpura, rodeadas por un halo color verde amarillo, las cuales si el tiempo es húmedo y fresco se desarrolla rápidamente, cualecen y cubren toda la hoja, generalmente aparecen primero en la punta y márgenes de la hoja, después llegan a cubrirla toda, al pecíolo y base del pecíolo. Por el envés de la hoja las manchas se cubren de un vello blanquecino; de aquí la infección avanza hacia el pecíolo y luego al tallo, el cual muestra una pudrición café oscura, al principio y después superficialmente blanquecina provocada por el desarrollo del micelio, esporangióforos y esporangios que en conjunto dan esta tonalidad (Erwin and Ribeiro, 1996; Romero, 1993). Los brotes y ramas son también atacados y presentan síntomas similares a las hojas. El ataque en tubérculos se caracteriza por la presencia de áreas irregulares oscuras, firmes relativamente superficiales de aproximadamente 1.5 cm de profundidad (Mendoza, 1993). En frutos de tomate, los síntomas aparecen en cualquier fase de crecimiento y son más comunes en el pedúnculo. Las manchas gris verdosas alcanzan un tamaño y forma definida. Si las condiciones óptimas están presentes, el hongo fructifica en la superficie de los frutos enfermos (Romero, 1993).

Morfología

P. infestans es clasificado en el grupo IV (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990). **Micelio** liso y no muy ramificado que va de 4.2 a 13.5 μm de diámetro; **esporangióforos** ramificados en simpodio compuesto con hinchamientos en las ramas donde nacen los esporangios, de crecimiento indeterminado; los **esporangios** son ovoides, elipsoides a limoniformes, con papila inconspicua, el tamaño es de 36 X 22 μm a 29 X 19 μm (Waterhouse, 1963). Es una especie heterotálica con anteridios anfígenos. Gametangios: los **oogonios** son de 31 a 50 μm de diámetro, lisos y globosos, el anteridio anfígeno; las **oosporas** lisas, esféricas de paredes gruesas, apleróticas de 24 a 53 μm de diámetro (Erwin and Ribeiro, 1996).

Ciclo de vida

Este patógeno persiste en el suelo e inverna en forma de micelio en los tubérculos de papa infectados, también sobrevive en áreas cultivadas de papa donde existe los tipos de compatibilidad A1 y A2 (Andrison, 1995). Este micelio se propaga en los tejidos de los tubérculos de papa llegando a unos cuantos retoños que se formaron a partir de los tubérculos infectados que se utilizan como semilla. El micelio se propaga hacia el tallo de las plantas con mayor rapidez a nivel de la región cortical, dando como resultado la decoloración y el colapso de las células de esa zona. Posteriormente el micelio se desarrolla entre las células del tallo, pero rara vez se le encuentra en el sistema vascular, este crece a través del tallo y llega a la superficie del suelo y cuando alcanza las partes aéreas de la planta, produce esporangióforos que emergen a través de los estomas de las hojas y del tallo, sobre los cuales se forman los esporangios que se desprenden y son diseminados por la lluvia o el aire y que al depositarse sobre hojas o tallos húmedos de plantas de papa los esporangios germinan y producen infecciones nuevas (Erwin and Ribeiro, 1996; Agrios, 2001).

2.5.8 *P. erythrosepica* Pethybridge (1913)

Antecedentes

Fue descrita por vez primera en Irlanda por Pethybridge, en 1913, como agente causal de la enfermedad llamada pudrición rosada de la papa. Once años después fue descubierta en Escocia y luego en Inglaterra. Actualmente se le encuentra en diferentes partes del mundo donde se cultiva papa (Erwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

Aunque *P. erythroseptica* es un patógeno importante en solanáceas como: tomate y papa, pero también se ha reportado en otras plantas como: caña de azúcar, espinaca, trigo, tulipán, col, entre otras (Erwin and Ribeiro, 1996).

Sintomatología y daño

La enfermedad rosada de la papa es la más grave que causa *P. erythroseptica* cuyos síntomas son: marchitez de la parte aérea y pudrición húmeda de los tubérculos. El problema empieza durante el desarrollo de estos últimos; en su acción sobre los tubérculos, la pudrición rosada es más rápida y destructiva que el tizón tardío; y de igual forma en tubérculos almacenados las pérdidas son mayores. La marchitez es precedida por una clorosis y enrrollamiento de las hojas; los brotes son también afectados y es notable la formación de un racimo de tubérculos muy cercano al suelo. Sin embargo, los síntomas realmente característicos de la enfermedad solo se pueden observar cuando se arranca la planta y se examinan los tubérculos de un tamaño mayor. Estos si se ven completamente afectados son de color café, se encuentran cubiertos con numerosas partículas de suelo, tienen consistencia de hule, y si se les presionan, exudan un líquido pegajoso. Adicionalmente al cortar los tubérculos parcialmente infectados, el área necrótica, adquiere una coloración típicamente rosada por quedar expuesta al aire durante unos 10 ó 15 minutos, (Romero, 1993).

Morfología

Clasificada en el grupo VI (Waterhouse, 1963; Stamps *et al.*, 1990). Con **micelio** regularmente uniforme y fino (7 μ m de grosor), ocasionalmente con hinchamientos angulares; los **esporangióforos** son simpodiales y ramificados

exactamente abajo del **esporangio**, los cuales no presentan papila y son elipsoidales, ovoides, obpiriformes o de formas distorsionadas, de 43 a 69 μm de largo por 26 a 47 μm de ancho; es una especie heterotálica con anterídios anfígenos casi esféricos de 14 a 13 μm ; **oogonios** lisos, globosos de 30 a 35 μm ; **oosporas** apleróticas de 28 a 35 μm de diámetro (Erwin and Ribeiro, 1996, Romero, 1993).

Ciclo de vida

La enfermedad inicia por medio de oosporas en dormancia como inoculo y se ven favorecidas por humedad alta en el suelo y temperaturas entre 20 y 30°C. que posteriormente infectarán tubérculos de papa. La diseminación del patógeno se da por medio de la zoosporas. Lonsdale et al. (1980) inocularon zoosporas y micelio para inducir síntomas en tallos, estolones y raíces, sin embargo la infección ocurrió en el tubérculo (formación de oosporas en la superficie del tubérculo) pero sin síntomas. Por lo que concluyeron que las oosporas presentes en tubérculos de papa sin síntomas son una fuente de inoculo en terrenos no infectados infectados. (Erwin and Ribeiro, 1996).

2.5.9 *P. phaseoli* Thaxer (1889)

Antecedentes

Fue descrito por vez primera por Thaxer en 1889, y corregido por Clinton en 1906. Causa daños severos en frijol lima (Erwin and Ribeiro, 1996).

Hospedantes

Afecta principalmente al frijol lima, aunque lo podemos encontrar en otros cultivos como: mostaza, tomate, rábano, berenjena y espárrago (Erwin and Ribeiro, 1996).

Sintomatología y daño

Esta enfermedad es muy destructiva de vainas de frijol; los retoños y peciolo son poco afectados. La enfermedad comienza con lesiones de forma irregular de color púrpura; posteriormente se observa una vellosidad blanquecina sobre la superficie de la vaina ocasionada por el micelio y esporangios de patógeno. Las vainas infectadas pierden turgencia y por tanto su valor comercial (Erwin and Ribeiro, 1996).

Morfología

P. phaseoli es clasificado en el grupo IV (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990). El esporangio es semipapilado, oval o elíptico, con una base truncada. El tamaño es muy variado según el medio donde haya crecido. Thaxter (1889) reportó las dimensiones de 35 a 50 μm de largo X 20 a 24 μm de ancho. Los esporangióforos en simpodio ramificado y dilatados en la base; esta especie es homotática, con anteridios anfígenos en forma de esfera aplanada; los oogonios son suberféricos que van de 16.2 a 35.6 μm de diámetro y oosporas de 14.4 a 26.6 μm de diámetro (Erwin and Ribeiro, 1996).

Ciclo de vida

El patógeno inverna en el suelo en forma de oosporas o como micelio sobre vainas de frijol. Las oosporas las cuales se forman en las vainas y las semillas

sobreviven al invierno y son capaces de causar la enfermedad. Por otra parte los esporangios pueden ser diseminados por el aire y ocasionar la enfermedad. (Erwin and Ribeiro, 1996).

2.6 Métodos de diagnóstico para las especies de *Phytophthora*

Para la identificación de especies de *Phytophthora* existen varias metodologías como: método tradicional (claves taxonómicas), métodos serológicos (ELISA) y métodos moleculares que incluye: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de ADN (RFLP); en el cual se analiza el ADN nuclear y mitocondrial y más recientemente los polimorfismos conformacionales de de cadena sencilla (SSCP), donde se hace un análisis del espacio transcrito interno (ITS).

2.6.1 Método tradicional (claves taxonómicas)

La identificación de este patógeno esta basada principalmente en características fisiológicas y morfológicas que incluye: rango de temperatura de crecimiento, forma y textura de la colonia, tamaño y morfología de las estructuras reproductivas, ausencia o presencia de papila en el esporangio; especificidad con el hospedante (Erwin and Ribeiro, 1996).

2.6.2 Métodos serológicos

Los métodos inmunológicos son ampliamente utilizados en la detección de patógenos en áreas agrícolas. Un diagnóstico inequívoco depende de la afinidad y especificidad del anticuerpo utilizado, lo que permite realizar la detección de bajas concentraciones de un patógeno.

En un principio estos métodos se desarrollaron para la detección de virus, sin embargo más adelante se aplicaron para hongos (Miller and Martín, 1988). El

género *Phytophthora* puede ser detectado por este método, por lo que se llegaron a desarrollar variaciones en la metodología del ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para una rápida detección de las especies (Gabor *et al.*, 1993), como el caso de *P. cinnamomi* (Cahill and Hardham, 1994).

La prueba de ELISA esta basada en la capacidad que tienen los agentes fitopatógenos (antígeno) para desencadenar la producción de inmunoglobulinas (anticuerpo) cuando son inyectados en organismos de sangre caliente. Estos anticuerpos reaccionan específicamente con la proteína del patógeno inyectado. Para este género algunos anticuerpos policlonales reconoce tanto especies de *Pythium* como de *Phytophthora*, otros a solo especies de *Phytophthora*. Los monoclonales son mas específicos pero requieren altas técnicas de tratamiento (Erwin and Ribeiro, 1996).

2.6.3 Métodos moleculares

Las técnicas moleculares han permitido la detección y caracterización molecular de fitopatógenos como hongos, bacterias, virus, nemátodos y fitoplasmas, principalmente paralelo a la caracterización morfológica de un hongo. Las técnicas moleculares no son un sustituto a las metodologías clásicas de micología para la identificación de especies fungosas, son una herramienta científica, que adicionalmente proporcionan, confirman o amplían, la información de un hongo a nivel genético (Yañez, 2001).

2.6.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Kary Mullis en el año de 1985, descubrió la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) esta técnica es una síntesis enzimática cíclica en donde las cadenas de ADN son copiadas "*in vitro*". Para

esto, la PCR involucra un par de iniciadores (oligonucleótidos o primers) que rodean los segmentos de ADN que son amplificados por ciclos repetidos. El producto de la extensión del primer ciclo sirve de molde para el siguiente, de manera que el número de copias del ADN blanco se duplica exponencialmente en cada ciclo de polimerización (Williams *et al.*, 1990).

Los componentes requeridos para una reacción de PCR son: una mezcla de desoxinucleósidos trifosfatados (dNTP's), iones de magnesio, una enzima ADN polimerasa termotable, una mezcla de iniciadores (oligonucleótidos o primers), y el ADN. Si se colocan estos componentes en un tubo de reacción, la ADN polimerasa puede incorporar uno a uno los nucleótidos correspondientes, es decir, si el templado o molde existe una A (adenina) el nucleótido a incorporar será T (tiamina), G (guanina) enfrente de C (citosa) y así sucesivamente, de manera que la cadena siempre estará creciendo hasta que se agote la mezcla de reactivos. Dicho procedimiento se realiza *in vitro* y en una serie de ciclos sucesivos en una reacción en cadena. Los oligos o bases sintéticas, debido a su capacidad de hibridarse con la molécula molde u original de ácido nucleico, define el inicio de copiado de la cadena. Si se colocaran dos oligos cuya secuencia define extremos de un segmento determinado de ADN, estos se hibridarán con las cadenas molde previamente separadas en el proceso de desnaturalización, cuando se encuentran con la ADN polimerasa en la reacción, resultando dos moléculas cuyos extremos están definidos por los oligonucleótidos que corren en sentido opuesto a lo largo de la cadena molde. Las cadenas resultantes son complementarias entre sí, y se encuentran el doble de moléculas con la secuencia de los oligonucleótidos que fueron adicionados en la mezcla de reacción, al repetirse este proceso de forma cíclica el resultado es un crecimiento exponencial. Al dar inicio el nuevo ciclo se obtendrán cuatro moléculas de la región entre los oligonucleótidos. Los ciclos subsecuentes formarán 8, 16, 32, 64 moléculas y así sucesivamente. Con la PCR se pueden obtener segmentos específicos de ADN para crear millones

de moléculas a partir de una cuantas, o incluso de una sola. Para esto se hace uso de la ADN polimerasa sintética que soporta temperaturas de 98°C (Rojas, 1998).

Desnaturalización. Para dar inicio a la reacción se requiere que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla, esto se logra aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente este tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los iniciadores y una posterior extensión.

Hibridación. Esta fase también se denomina fase de "anillamiento" o de emparejamiento. Una vez que el ADN esta desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los iniciadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va amplificar. La temperatura de fusión (T_m , "melting temperature"), depende de varios factores y es relativamente específica para cada iniciador. La longitud de los iniciadores y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una formula simple para calcular la T_m es la siguiente:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+C).$$

Por consiguiente cada praimer requiere de una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de anillamiento específica ya que si su temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

Extensión. Durante este paso la polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizado. La temperatura a la que se lleva acabo este paso suele ser 72°C ya que es la temperatura a la que la polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb (pares de bases), y 40 segundos por encima de 1.2 kb (Kilobases).

2.6.3.2 Técnica rDNA-ITS (Internal transcriber spacer regions).

Se basa en que los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S, y 28S son altamente conservados, y se encuentran unidos internamente por las siguientes regiones: ITS1 y ITS2. Por lo que la amplificación de estas regiones, incluyendo todo el gen 5.8S y las regiones adyacentes de los otros dos genes por PCR con primers universales, y la secuenciación de nucleótidos, permiten caracterizar molecularmente a los hongos a nivel de género y a nivel de especie, por alineación con las secuencias depositadas en el banco de genes. Aunque, en algunos casos, especies morfológicamente muy similares pudieran tener idéntica secuencia de la región amplificada (Yáñez, 2001).

Otras aplicaciones de esta técnica son: la secuencia de cualquiera de las regiones ITS de una especie caracterizada, se puede emplear para diseñar iniciadores específicos que permiten la identificación molecular de esas mismas especies en los tejidos del hospedante o sustrato, sin tener que realizar previamente el aislamiento del hongo en cultivo puro, y en diversos estudios filogenéticos (Kirt *et al.*, 2001).

2.6.3.3 SSCP

Método electroforético propuesto como una alternativa en el uso de técnicas moleculares que puede utilizarse en el diagnóstico rutinario de hongos fitopatógenos (Moricca *et al.*, 2000). Para este análisis se requiere de productos de PCR menores a 400 pb, basando su principio en la movilidad electroforética de la molécula de ADN en un gel de poliacrilamida, que es sensitivo al tamaño, la carga y la forma de dicha molécula; sin embargo la conformación y movilidad de la doble cadena de ADN son afectadas por diferentes factores fisiológicos que incluye la composición del gel (concentración de la acrilamida, contenido de glicerol y tipo de gel) y condiciones de la electroforesis (temperatura, voltaje, concentración del buffer y grosor del gel). Cuando las condiciones son favorables aproximadamente 90% de los polimorfismos pueden ser detectados en PPCR superiores a 450 pb y aproximadamente el 99% en PPCR por debajo de 400 pb (Yap and McGee, 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología molecular del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario (CNRDF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal SAGARPA y en el Laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

3.1 Colecta del material biológico de especies de *Phytophthora*

El material vegetal sintomático se colectó durante el período septiembre del 2003 a marzo del 2004 (cuadro 1).

Cuadro 1. Material colectado, lugar donde se colectó y especies de *Phytophthora* aisladas.

Especie	Hospedante	Origen
<i>P. cactorum</i>	Fresa	Abasolo, Guanajuato
<i>P. capsici</i>	Calabaza	Cuautla, Morelos
<i>P. capsici</i>	Pepino	Cuautla, Morelos
<i>P. capsici</i>	Chile	Cuatepec de Harinas, Estado de México
<i>P. cinnamomi</i>	Aguacate	Villa Guerrero, Estado de México
<i>P. cryptogea</i>	Crisantemo y Gerbera	Villa guerrero, Estado de México
<i>P. fragariae</i>	Fresa	Irapuato, Guanajuato
<i>P. infestans</i>	Papa	Valle de Toluca, Estado de México
<i>P. phaseoli</i>	Frijol	Ixmiquilpan, Hidalgo

Otras especies analizadas, *P. erythrosepica*, *P. citricola* y *P. cinnamomi* fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario.

3.2 Obtención de los aislamientos

3.2.1 Obtención de *P. capsici*

Frutos de calabaza y pepino con síntomas de pudrición fueron llevados al laboratorio de los cuales se obtuvieron trozos de 1 cm² que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 minutos y enjuagados en agua destilada estéril, secados con papel secante estéril, y colocados en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), el material fue incubado a temperatura ambiente (25 a 28°C), bajo oscuridad. Al tercer día se observó el crecimiento de micelio en el medio de cultivo. Las plantas de chile con síntoma de marchitez también fueron llevadas al laboratorio; se desechó la parte foliar y se conservaron el cuello y la raíz. Trozos de raíz y cuello de 2 cm² de longitud fueron sembrados por el mismo procedimiento de los frutos de calabaza y pepino.

3.2.2 Obtención de *P. cinnamomi*

Raíces de árboles de aguacate con síntoma de muerte regresiva se llevaron al laboratorio; se lavaron con agua de la llave. Trozos de raíz de 2 cm² de longitud fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1.5 % y enjuagados en agua destilada estéril, secados con papel secante estéril y colocados en cajas petri con medio de cultivo PDA. El material se incubó a temperatura ambiente bajo oscuridad. Al cuarto día se observó crecimiento de micelio.

3.2.3 Obtención de *P. cryptogea*

Plantas gerbera y crisantemo con síntoma de marchitez se llevaron al laboratorio; se desechó la parte foliar de ambas y se conservó la raíz de gerbera y cuello de crisantemo. Trozos de raíz de 2 cm² de longitud y de 1 cm² trozos de cuello se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % y enjuagados en agua destilada estéril, secados con papel secante estéril y colocados en cajas petri con medio de cultivo PDA. El material se incubó a temperatura ambiente bajo oscuridad. Al tercer día se observó crecimiento de micelio.

3.2.4 Obtención de *P. fragariae* y *P. cactorum*

Plantas de fresa con síntoma de marchitez se llevaron al laboratorio; se desechó la parte foliar se conservó la raíz y cuello. Trozos de raíz de 2 cm² de longitud y de 1 cm² trozos de cuello se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % y enjuagados en agua destilada estéril, secados con papel secante estéril y colocados en cajas petri con medio de cultivo PDA. El material se incubó a temperatura ambiente bajo oscuridad. Al cuarto día se observó crecimiento de micelio.

3.2.5 Obtención de *P. infestans*

Plantas de papa con síntomas de Tizón tardío se llevaron al laboratorio, de las que se obtuvieron trozos de 1 cm² que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto y enjuagados en agua destilada estéril, secados con papel secante estéril, y colocados en cajas petri con medio de cultivo Centeno Agar, el material fue incubado a 25°C en una cámara de crecimiento. A los 10 días se observó el crecimiento de micelio.

3.2.6 Obtención de *P. phaseoli*

Ejotes de frijol con síntoma de pudrición se llevaron al laboratorio, de los que se obtuvieron trozos de 1 cm² que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 minutos y enjuagados en agua destilada estéril, secados con papel secante estéril, y colocados en cajas petri con medio de cultivo PDA, el material fue incubado a temperatura ambiente. Al cuarto día se observó el crecimiento de micelio.

3.3 Obtención de aislamientos puros para identificación

Para realizar la identificación de las especies fue necesario obtener cultivos puros a partir de reisolamientos en medios de cultivo selectivo, las veces necesarias. Para *P. capsici* se utilizó el medio de cultivo jugo de tomate- agar y líquido/antibiótico y fungicidas (Ampicilina, Rimfampicina y PCNB). *P. cinnamomi* se reisoló en harina-maíz-agar y líquido/antibiótico y fungicidas (Ampicilina, Rimfampicina, Pimaricina, Benlate y PCNB). *P. cryptogea* y *P. fragariae* en jugo V8-agar y líquido/antibiótico y fungicida (Ampicilina, Rimfampicina y PCNB). *P. infestans* en centeno-agar y líquido/antibiótico (Ampicilina, Rimfampicina y Pimaricina). *P. phaseoli* en PDA y agua destilada estéril/antibiótico y fungicida (Ampicilina, Rimfampicina, Benlate y PCNB).

3.4 Identificación de las especies de *Phytophthora*

Para llevar acabo la identificación se realizaron montajes de las estructuras reproductivas de los primeros aislamientos (ya que el cultivo continuado ocasiona distorsión de los esporangios) con glicerol puro y se observaron en el microscopio para seleccionar los esporangios con las características necesarias para la identificación.

La identificación de las especies se llevó acabo con las mediciones de las estructuras reproductivas obtenidas en cada especie y para aquellas que no se logró obtener dichas estructuras, se tomó en cuenta el el micelio, la forma de la colonia y la especificidad con el hospedante.

3.5 Extracción de ADN a partir de aislamientos puros de especies de *Phytophthora*.

Para la extracción de ADN de cada especie se utilizó el micelio puro obtenido en medio líquido y para facilitar su manejo se coló el micelio, bajo condiciones asépticas. Se realizaron tres repeticiones de cada especie.

3.5.1 Extracción del ADN del micelio fungoso por el método de plantDNAzol.

Se tomó aproximadamente 0.1g de micelio fresco obtenido de cultivo líquido y se homogenizó en un mortero previamente estéril y congelado hasta pulverizar completamente el micelio. Lo homogenizado se transfirió con la ayuda de una espátula estéril a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, el cual contenía 300µL de PlantDNAzol (Invitrogene^R). Se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente (25-30°C) durante cinco minutos, para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas . Una vez incubado se agregó 300µL de cloroformo mezclándose vigorosamente y se incubó en agitación a temperatura ambiente por cinco minutos. Una vez incubado, se pasó a una centrífuga con refrigeración a 12000 xg por 10 minutos, formándose dos fases. Se tomó todo el sobrenadante y se pasó a un tubo de microcetrífuga de 1.5 mL, se agregó el mismo volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:25:1; se agitó vigorosamente y se dejó a temperatura ambiente en agitación durante cinco minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos. Después de la centrifugación se transfirió el sobrenadante a un tubo de

microcetrífuga de 1.5 mL, al cual se le agregó la misma cantidad de cloroformo; se mezcló vigorosamente para después incubar en agitación a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos a 4°C; el sobrenadante extraído se transfirió a un tubo limpio para precipitar con 250 µL de etanol, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente y centrifugó a 5000 xg por cuatro minutos a 4°C; se retiró el sobrenadante y se lavó con 250 µL de etanol al 70 %. La pastilla formada se agitó vigorosamente (vortex) y se centrifugó a 5000 xg por cuatro minutos a 4°C. Por último se retiró nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente se disolvió la pastilla con agua libre de nucleasas (GIBCO BRL) y almacenó a -70°C.

3.5.2 Determinación de la concentración y calidad del ADN de especies de *Phytophthora*

Una vez que el ADN fue resuspendido, se procedió a determinar su concentración y calidad (pureza) en un espectrofotómetro marca Gene Quat (Amarsham), colocando en una microcelda de cuarzo para luz UV de 3 µL, se agregó el ADN y se tomaron las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, concentración y calidad.

3.6 Determinación de la integridad del ADN total.

La integridad del ADN se determinó en una cámara de electroforesis (Invitrogen Life Technologies) en gel de agarosa al 1%, en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, acetato de sodio 20mM y Na₂ EDTA), Sambrook y cols, 1989, separándose el ADN a 80 volts (V) durante 30 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio agregando 1µL en 30 mL de agarosa (SIGMA) y se visualizó en un transiluminador de luz UV (ULTRA-LUM). Finalmente el gel fue fotografiado con un analizador de imágenes Kodak Digital Science para su análisis.

3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción se llevó a cabo a partir de ADN con alta confiabilidad de pureza y concentración requerida de acuerdo al protocolo establecido (cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidad de reactivo requerido para la mezcla master

Mezcla master de PCR	Concentración requerida	Volumen / 1 tubo
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM	1.5µL
dNTP's 10 mM	200 µM	1µL
Primer (PHITS6) 10pmoles/µL	20 pmoles/µL	2µL
Primer (PHITS4) 10pmoles/µL	20 pmoles/µL	2µL
Taq polimerasa 1U/µL	2.0 U/µL	2µL
ADN	50 ng	2µL
H ₂ O destilada esteril		12µL
Volumen final		25µL

los primers ITS6 5' GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG 3' y ITS4 5'TCC TCC GTC TAT TGA GC 3' (Cooke and Duncan, 1997), obtienen un fragmento amplificado de 862 pb (*P. capsici*) a 941 pb (*P. fragariae*). Estos primers amplifican la región ITS de muchos eucariontes, los cuales pueden ser distinguidos por el tamaño del producto.

Condiciones de la PCR

El programa térmico de PCR para el termociclador fue: desnaturalización inicial de 94°C por tres minutos, seguido de 35 ciclos de 55°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos y 94°C por 30 segundos y un paso final de polimerización 72°C por 10 minutos, almacenándolo a 4°C.

3.8 Análisis de los productos de la reacción.

La amplificación de las muestras se verificaron fraccionando el ADN en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X, se mezclaron las muestras con buffer de carga (Azul de bromofenol: 0.025% de azul de bromofenol, 0.025% xilencianol, 30% de glicerol en agua; u Orang G: 0.25% de orang G, 30% de glicerol en agua). Se separó el ADN a 80 Volts por 10 minutos y 100 Volts por 25 minutos o cuando el colorante exceda un poco más de la mitad del gel. En cada corrimiento se colocaron los testigos negativos (Agua libre de nucleasas), positivos PPCR perteneciente al CNRF y marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Ladder 100 pb Invitrogene^R). Este último sirvió para calcular el tamaño del fragmento amplificado y comprobar si es el esperado.

3.9 Análisis de las especies de *Phytophthora* mediante Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP).

Para los ensayos de SSCP se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando cámaras verticales con dimensiones del gel de 16 x 18 cm, marca Hoefer Scientific Instrumens SE400 y una fuente de poder marca BIORAD modelo 200/2.0.

Gel de poliacrilamida al 12%

Después de ensamblados los cristales de la cámara vertical previamente lavados y desengrasados, se preparó el gel en un vaso de precipitado mezclando las soluciones de acuerdo al cuadro 3, se transfirió la mezcla a la cámara ensamblada y se colocó el peine para dejar polimerizar por lo menos una hora, transcurrido el tiempo se quitó el peine y se enjuagaron los pozos, así como los bordes del gel con solución TBE 1X (Tris-HCl 45mM, ácido bórico 45 mM y Na₂ EDTA 1mM).

Cuadro 3. Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de poliacrilamida al 12%

Soluciones/Volumen (mL)	30 mL
Archilamida 30% (mL)	12.0 mL
Agua bidestilada estéril (mL)	11.79 mL
TBE 5X (mL)	6 mL
Persulfato de amonio (μ L)	210 μ L
TEMED (μ L)	10.5 μ L

Análisis SSCP.

El análisis SSCP se realizó directamente de los productos de PCR. Se utilizaron 5 μ L de producto de PCR, y se mezclaron con 20 μ L de buffer desnaturizante (Formamida 95% y azul de bromofenol 0.05%) esta mezcla se calentó por 10 minutos a 95°C con agitación a los 5 minutos, después se enfrió rápidamente en hielo por 1 minuto. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 12% en una cámara de electroforesis vertical, en buffer TBE 1X como amortiguador de corrida. La electroforesis se corrió a 300 volts durante 48 hrs.

Tinción del gel de poliacrilamida con nitrato de plata.

El gel se colocó en un contenedor y se agregaron 100mL de solución fijadora (10% de etanol y 2% de ácido acético) durante 20 minutos con agitación constante. Se eliminó la solución fijadora y el gel se lavó tres veces con agua destilada. Agitando ligeramente durante los lavados. Se decantó el agua y se agregaron 100mL de solución de tinción (nitrato de plata al 2%) por 20 minutos con agitación ligera, se eliminó la solución de tinción y el gel se lavó tres veces. Posteriormente se agregaron 100 mL de solución reveladora (6% de hidróxido de sodio y 2% de formaldehído) y se mantuvo en agitación suave hasta que

aparecieron las bandas. La reacción se detuvo con una solución al 2% de ácido acético.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los aislamientos

En la figura 1 se muestran los diferentes síntomas observados en los cultivos muestreados en campo (fresa, pepino, calabaza, chile, aguacate, crisantemo, gerbera, papa y ejote), el crecimiento y la morfología de los diferentes aislamientos obtenidos de *Phytophthora* en relación a su hospedante.

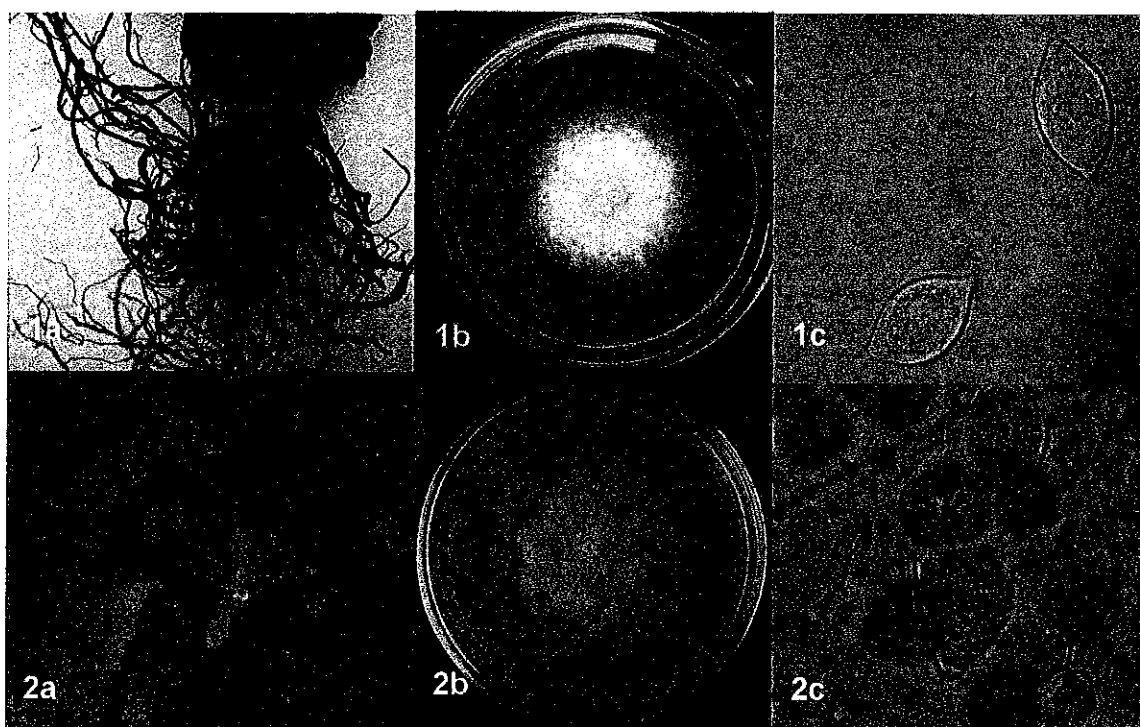
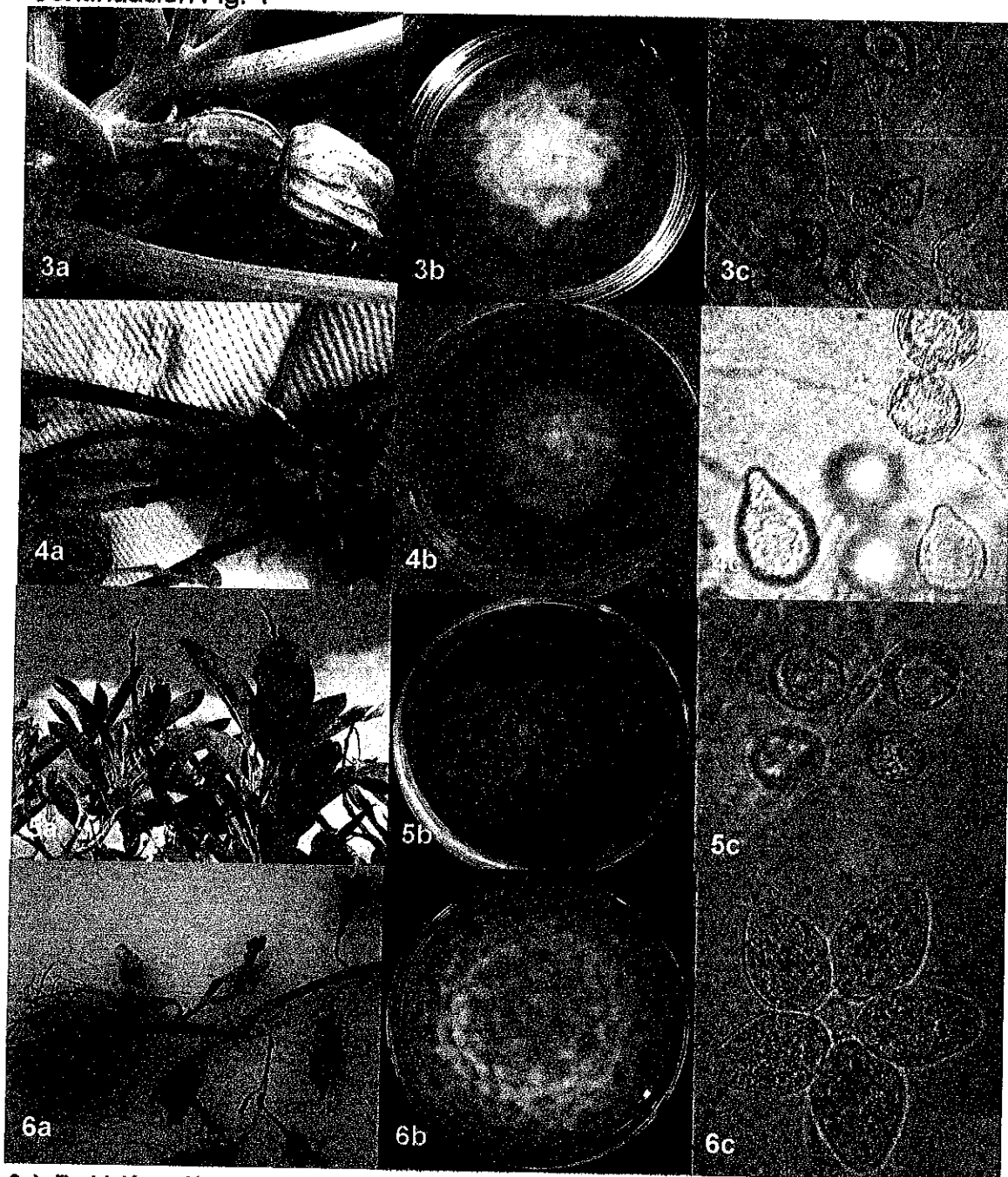


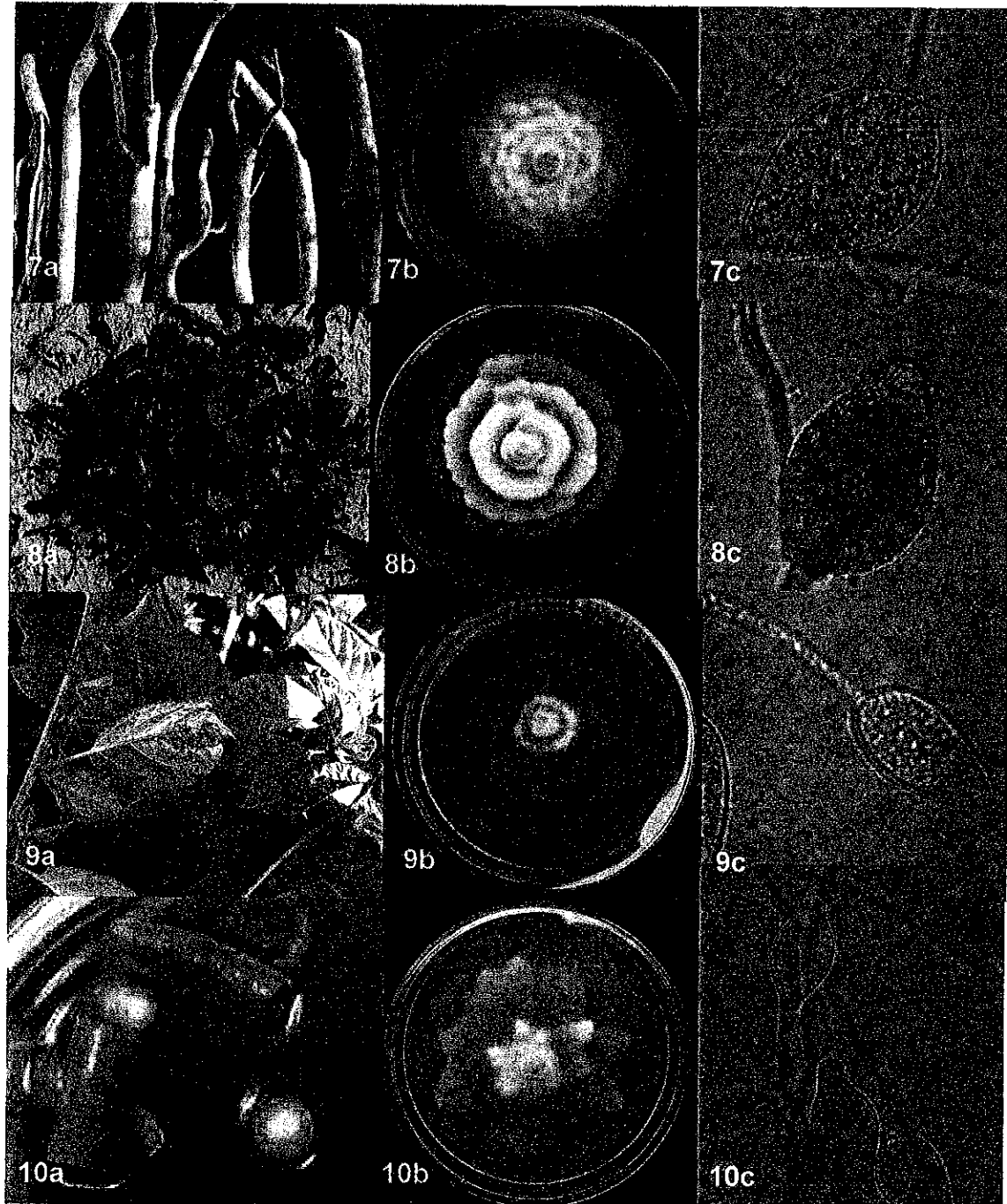
Fig. 1 Síntoma de la parte aislada, crecimiento de la colonia y estructura reproductiva de *Phytophthora* spp.; 1a) Cilíndro central rojo en raíces de fresa, 1b) Crecimiento micelial de *P. cactorum*, 1c) Esporangios de *P. cactorum*, 2a) Pudrición blanda en fruto de pepino, 2b) Crecimiento micelial de *P. capsici*, 2c) Esporangios de *P. capsici*.

Continuación Fig. 1



3a). Pudrición café suave en calabaza, 3b) Colonia de *P. capsici*, 3c) Esporangios de *P. capsici*, 4a) Pudrición de raíz y marchitez en chile, 4b) Colonia de *P. capsici*, 4c) Esporangios de *P. capsici*, 5a) Muerte regresiva o tristeza del aguacatero, 5b) Colonia de *P. cinnamomi*, 5c) Clamidosporas de *P. cinnamomi*, 6a) Pudrición de raíz en crisantemo, 6b) Crecimiento de la colonia, 6c) Esporangios de *P. cryptogea*.

Continuación Fig.1



7a) Pudrición de raíces de gerbera, 7b) Colonia de *P. cryptogea*, 7c) Esporangio de *P. Cryptogea*, 8a) Pudricion de raíz y marchitez en fresa, 8b) Colonia de *P. fragariae*, 8c) esporangio de *P. fragariae*, 9a) Tizón tardío en papa, 9b) Colonia de *P. infestans*, 9c) esporangio de *P. infestans*, 10a) Vainas de frijol con micelio algodonoso, 10b) colonia de *P. phaseoli* y 10c) esporangios de *P. phaseoli*.

4.2 Caracterización cultural y morfológica de las especies de *Phytophthora*.

Las especies de *Phytophthora* presentaron crecimientos excelentes en los medios de cultivo selectivos evaluados (cuadro 4), ya que se produjeron estructuras de reproducción libres de contaminantes lo cual es esencial para la extracción de ADN de buena calidad y concentración (Cooke and Duncan, 1997).

Cuadro 4. Evaluación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento y crecimiento de especies de *Phytophthora*.

Especie	PDA	Jugo de tomate	Jugo de verduras	Harina de maíz	Centeno
<i>P. cactorum</i>	Si	Bueno	Excelente	Escaso	Nulo
<i>P. capsici</i> de pepino	Si	Excelente	Excelente	Escaso	Nulo
<i>P. capsici</i> de calabaza	Si	Excelente	Excelente	Escaso	Nulo
<i>P. capsici</i> de chile	Si	Bueno	Excelente	Escaso	Nulo
<i>P. cinnamomi</i>	Si	Nulo	Nulo	Excelente	Nulo
<i>P. cryptogea</i> de gerbera	Si	Bueno	Excelente	Nulo	Nulo
<i>P. cryptogea</i> crisantemo	No	Escaso	Bueno	Nulo	Nulo
<i>P. fragariae</i>	No	Escaso	Bueno	Nulo	Nulo
<i>P. infestans</i>	No	Nulo	Nulo	Nulo	Excelente
<i>P. phaseoli</i>	Si	Escaso	Bueno	Escaso	Nulo

En medio de cultivo PDA crecieron cuatro de las siete especies de *Phytophthora* evaluadas en este trabajo; en jugo de tomate se aislaron y crecieron de forma excelente *P. capsici* de pepino, calabaza y chile, así como *P. cactorum* respectivamente. Mientras que en jugo de verduras (V8), casi todas las especies de *Phytophthora* crecieron de forma excelente y buena, a excepción de *P. cinnamomi* y *P. infestans*, así como otras. Además fue

necesario modificar los medios agregándoles antibiótico y fungicidas, con lo cual se obtuvieron estructuras reproductivas excelentes (Fig. 2) y así se logró la identificación de dichas especies.

4.3 Mediciones de los esporangios e identificación

Las especies de *Phytophthora* proporcionaron los datos siguientes:

***P. cactorum*.** Mostró esporangios que midieron en promedio de 22.5 X 44.5 μm de ancho y largo, con una papila conspicua, esférica de paredes gruesas pleróticas de color amarillo paja (Fig 2), estos datos coincidieron con los que indicaro Romero, (1993) y Oudemans *et al.*, (1991).

***P. capsici*.** Produjo formas muy variadas de esporangios (fig. 2), con papila conspicua , con dos; su forma es ovoide y no en todas pero si en su mayoría guardan una relación de largo y ancho que en promedio fue de 18 μm , como lo indicó Ristaino (1990).

***P. cinnamomi*.** Desarrolló pocas clamidosporas (Fig1. 5c), que están en racimos como lo mencionó Zemtmeier *et al.*, (1966). Además se observó el crecimiento típico la colonia (cameliforme) (fig. 1 5b) como lo indicó Erwin and Ribeiro (1996).

***P. cryptogea*.** Mostró esporangios de 55 a 30 μm de largo por ancho en promedio, la forma de su base es muy redondeada y sin papila como lo señaló Ho *et al.*, (1992) (Fif 2).

***P. fragariae*.** Produjo una cantidad baja de esporangios, los cuales midieron en promedio de 45 a 28 μm de largo por ancho, sin papila, lo cual coincidió con los datos proporcionados por Miholland and Daykin (1993).

***P. infestans*.** Desarrolló esporangióforos, con inchamientos en las ramas (fig. 2), así como esporangios con papila incospicua y su tamaño fue en promedio de 33 X 21 μm de largo por ancho, dicha información fue similar a la proporcionada por Erwin and Ribeiro (1996), además solo se logró obtener el crecimiento en medio de cultivo de centeno.

***P. phaseoli*.** Mostró esporangios de forma muy alargada, a diferencia de lo que reporta Erwin and Ribeiro, (1996). Se observaron esporangios papilados (Fig. 2), sin embargo las dimensiones de los esporangios coinciden al proporcionar una medida en promedio de 37 a 23 μm de largo por ancho (Romero, 1993).

Fig 2. Esporangios, oogonios, micelio y esporangioforo de algunas especies de *Phytophthora* para la identificación de especies

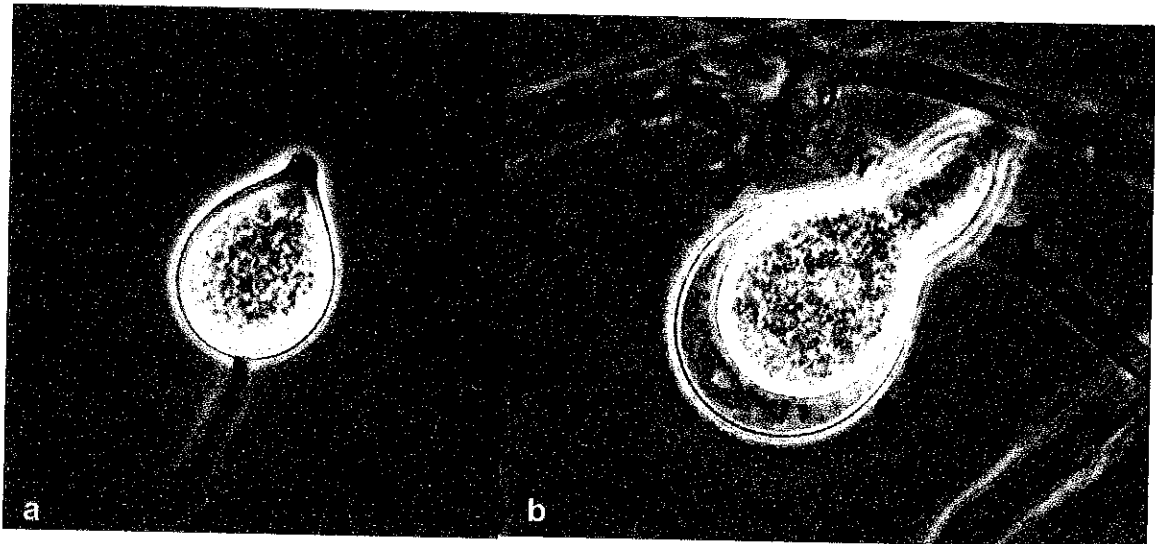


Fig. 2 Estructuras reproductivas, micelio y esporangióforo de especies de *Phytophthora*, a) Esporagio de *P. cactorum*, b) Esporangio de *P. phaseoli*, c) Esporangios de *P. cryptogea* en gerbera, d) Esporangio de *P. capsici* en pepino, e) Esporangios de *P. infestans*, f) Oogonio de *P. cactorum*, g) Esporangio de *P. capsici* en pepino, h) Esporangio de *P. capsici* en chile, i) Micelio turuloso de *P. cinnamomi*, j) Esporangióforo con hinchamientos de *P. infestans*, k) Esporangio de *P. cryptogea* en crisantemo

Continuación de la Fig. 2

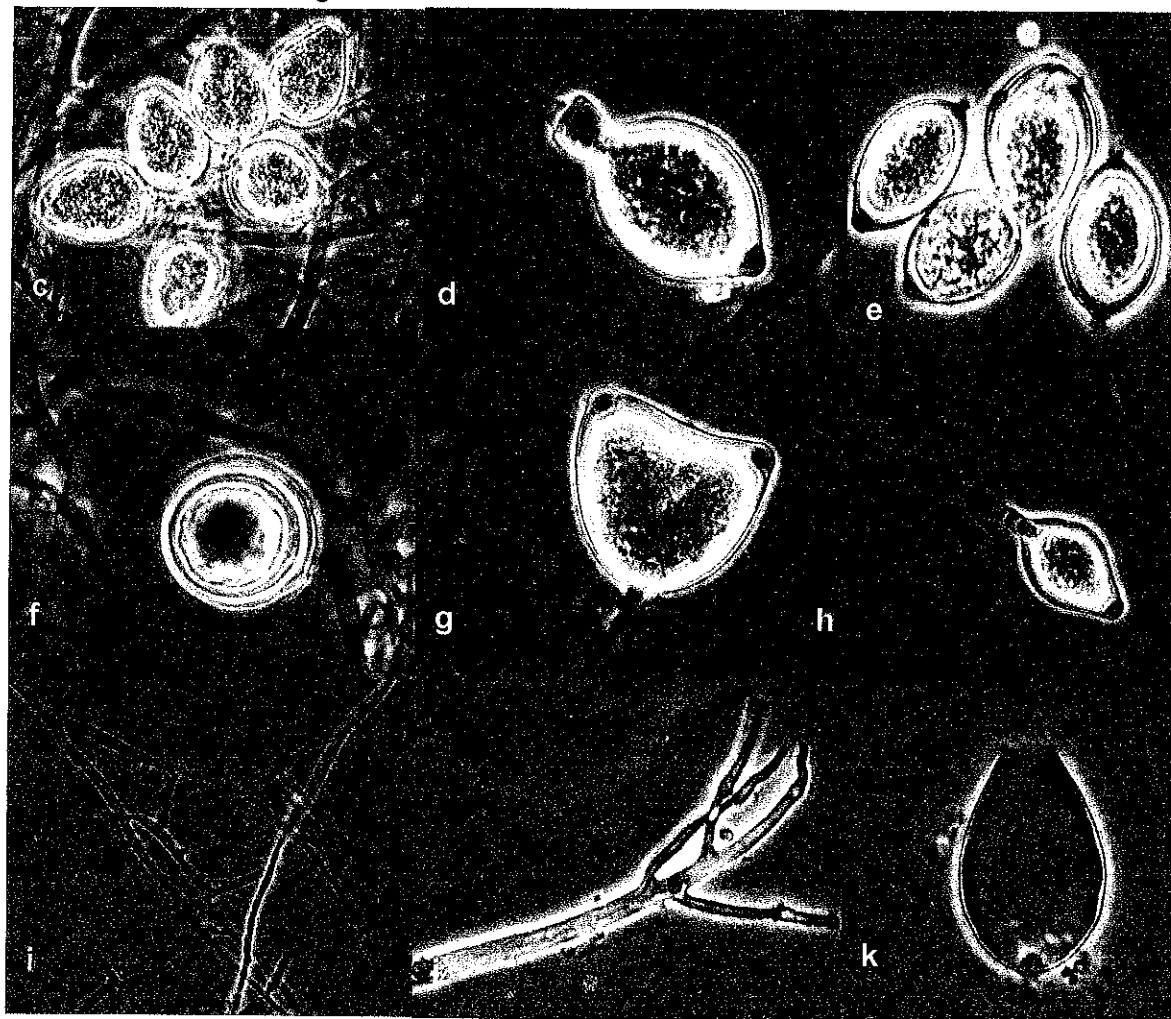


Fig. 2 Estructuras reproductivas, micelio y esporangi6foro de especies de *Phytophthora*, a) Esporagio de *P. cactorum*, b) Esporangio de *P. phaseoli*, c) Esporangios de *P. cryptogea* en gerbera, d) Esporangio de *P. capsici* en pepino, e) Esporangios de *P. infestans*, f) Oogonio de *P. cactorum*, g) Esporangio de *P. capsici* en pepino, h) Esporangio de *P. capsici* en chile, i) Micelio turuloso de *P. cinnamomi*, j) Esporangioforo con hinchamientos de *P. infestans*, k) Esporangio de *P. cryptogea* en crisantemo.

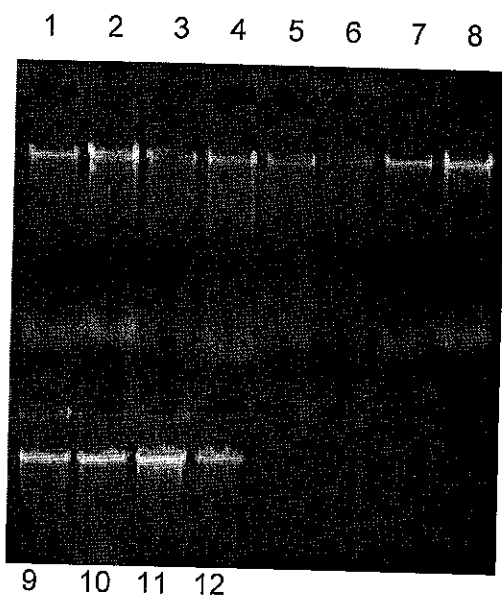
4.4 Caracterización genética

4.4.1 Evaluación del ADN total para llevar acabo la PCR.

4.4.1.1 Estimación de la degradación del ADN total

Utilizando el método de PlantDNAzol se logró obtener un ADN integro (no degradado), como se observa en la figura 3, que muestra los geles no desnaturalizantes de agarosa al 1%, que contiene una alícuota de 2 μ g de ADNtotal; que fue básico para llevar acabo la Reacción en cadena de la polimerasa (Sambrook y cols, 1989).

Repetición 1



Repetición 2

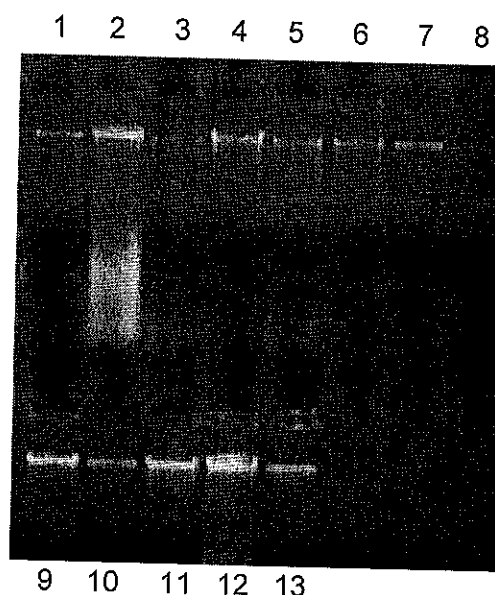


Fig. 3 ADN total obtenido por el método PlantDNAzol, a partir de micelio de especies de *Phytophthora*, visualizados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, línea 1 de repetición 1, 2 y 3 *P. cinnamomi*; línea 2 *P. cryptogea* de gerbera; línea 3 *P. cryptogea* de crisantemo; línea 4 *P. fragariae*; línea 5 *P. infestans*; línea 6 *P. capsici* de pepino; línea 7 *P. capsici* de chile; línea 8 *P. capsici* de calabaza; línea 9 *P. phaseoli*; línea 10 *P. cactorum*; línea 11 *P. erythroseptica* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 repetición 1 *P. cinnamomi* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 en repetición 2 y 3 *P. citricola* CNRDF; línea 13 repetición 2 y 3 *P. capsici* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

Repetición 3

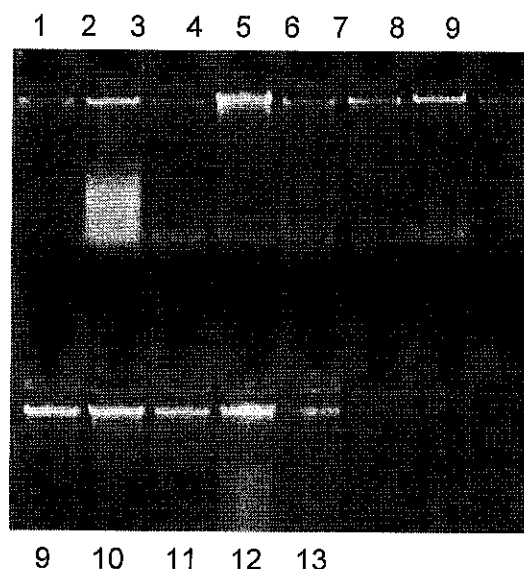


Fig. 3 ADN total obtenido por el método PlantDNAzol, a partir de micelio de especies de *Phytophthora*, visualizados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, línea 1 de repetición 1, 2 y 3 *P. cinnamomi*; línea 2 *P. cryptogea* de gerbera; línea 3 *P. cryptogea* de crisantemo; línea 4 *P. fragariae*; línea 5 *P. infestans*; línea 6 *P. capsici* de pepino; línea 7 *P. capsici* de chile; línea 8 *P. capsici* de calabaza; línea 9 *P. phaseoli*; línea 10 *P. cactorum*; línea 11 *P. erythrosepica* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 repetición 1 *P. cinnamomi* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 en repetición 2 y 3 *P. citricola* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 13 repetición 2 y 3 *P. capsici* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

4.4.1.2. Estimación de cantidad y calidad (pureza) del ADN.

Se obtuvo una concentración muy alta del ADN total de cada especie de *Phytophthora* como se observa en los cuadros 4, 5 y 6, por consiguiente se realizaron diluciones hasta obtener 50 ng del ADN templado en 1 mL de agua libre de nucleasas como lo indicó Trout *et al* (1997), que es la cantidad requerida para realizar la técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa.

Cuadro 5. Calidad (pureza) y concentración del ADN de las especies de *Phytophthora* correspondientes a la repetición 1

Especie	260nm	280nm	Concentración	Calidad
<i>P. cinnamomi</i>	0.487	0.251	48.7 µg/µL	1.940
<i>P. cryptogea</i> gerbera	0.910	0.553	75.8 µg/µL	1.890
<i>P. cryptogea</i> crisantemo	0.103	0.042	11.7 µg/µL	1.964
<i>P. fragariae</i>	0.176	0.093	17.6 µg/µL	1.892
<i>P. infestans</i>	0.503	0.227	53.0 µg/µL	1.876
<i>P. capsici</i> pepino	0.312	0.164	29.7 µg/µL	1.993
<i>P. capsici</i> chile	0.352	0.197	31.7 µg/µL	1.957
<i>P. capsici</i> calabaza	2.133	1.023	212.1 µg/µL	1.766
<i>P. phaseoli</i>	0.314	0.201	24.5 µg/µL	1.856
<i>P. cactorum</i>	1.182	0.571	117.7 µg/µL	2.008
<i>P. erytopseptica</i> CNRDF	0.103	0.042	11.7 µg/µL	2.089
<i>P. cinnamomi</i> CNRDF	0.974	0.540	88.9 µg/µL	1.954

CNRDF : Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fotisanitario.

nm: nivel de absorvancia

µg: microgramos

µL: microlitros

Cuadro 6. Calidad (pureza) y concentración del ADN por especies de *Phytophthora* correspondientes a la repetición 2.

Especie	260nm	280nm	Concentración	Calidad
<i>P. cinnamomi</i>	0.350	0.292	13.0 µg/µL	1.806
<i>P. cryptogea</i> gerbera	1.077	0.584	102.1 µg/µL	1.934
<i>P. cryptogea</i> crisantemo	0.479	0.251	49.2 µg/µL	1.864
<i>P. fragariae</i>	0.575	0.323	52.4µg/µL	1.926
<i>P. infestans</i>	0.285	0.138	28.0 µg/µL	2.005
<i>P. capsici</i> pepino	0.546	0.286	53.90µg/µL	1.932
<i>P. capsici</i> chile	0.156	0.88	15.1µg/µL	1.819
<i>P. capsici</i> calabaza	0.200	0.091	22.7µg/µL	1.924
<i>P. phaseoli</i>	0.565	0.343	46.9µg/µL	1.899
<i>P. erythrosepica</i> CNRF	0.621	0.335	60.1 µg/µL	1.908
<i>P. citricola</i> CNRF	0.683	0.372	65.2 µg/µL	1.912
<i>P.cactorum</i>	0.254	0.142	23.2 µg/µL	1.933
<i>P. capsici</i> CNRF	0.189	0.098	18.5 µg/µL	1.968

Cuadro 7. Calidad (pureza) y concentración del ADN total por especies de *Phytophthora* correspondientes a la repetición 3.

Especie	260nm	280nm	Concentración	Calidad
<i>P. cinnamomi</i>	0.221	0.110	23.3 µg/µL	1.894
<i>P. cryptogea</i> gerbera	0.498	0.300	40.7 µg/µL	1.947
<i>P. cryptogea</i> crisantemo	0.315	0.200	25.5 µg/µL	1.821
<i>P. fragariae</i>	0.135	0.142	12.7µg/µL	1.981
<i>P. infestans</i>	0.352	0.227	31.6 µg/µL	1.987
<i>P. capsici</i> pepino	0.278	0.162	26.0 µg/µL	1.806
<i>P. capsici</i> chile	0.081	0.040	8.6 µg/µL	1.911
<i>P. capsici</i> calabaza	0.200	0.091	22.7 µg/µL	1.924
<i>P. phaseoli</i>	0.565	0.343	46.9 µg/µL	1.899

<i>P. cactorum</i>	0.84	0.420	82.2 µg/µL	1.794
<i>P. erythrosepica</i> CNRF	0.266	0.164	20.9 µg/µL	1.953
<i>P. citricola</i> CNRF	0.614	0.314	61.7 µg/µL	1.946
<i>P. capsici</i> CNRF	0.031	0.010	4.3 µg/µL	1.955

La calidad del ADN total obtenido, cumplió con el parámetro óptimo, el cual debe de estar entre 1.7 y 2.0 para considerarse de buena calidad, el cual puede observarse en los cuadros 4, 5 y 6, ya que si existe contaminación con proteínas o fenol, no es posible la cuantificación correcta del ADN total (Sambrock y cools., 1989). Estos resultados indicaron que el método PlantDNAzol, es efectivo para la eliminación de compuestos fenolicos, proteínas y otras sales que pudieran interferir en la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (Aguilar, 2004).

4.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los productos de PCR obtenidos produjeron bandas consistentes y libres de inespecificidades; y como se observó en la Fig 4, el tamaño de las banda oscila entre los 800 y 950 pb que es lo esperado según indica Cooke and Duncan (1997), ya que mencionaron que el tamaño oscila entre 862 pares de bases para *P. capsici* y 941 pb para *P. fragariae*.

Sin embargo en la fig. 4 se observó en la, que todas las especies casi presentan el mismo tamaño de banda, lo cual no ayudaría mucho en a la indentificación entre las especies de *Phytophthora* y solo se puede determinar a nivel de género, debido a que para realizar la identificación sólo por PCR es necesario utilizar praimers específicos. Sin embargo se obobtuvieron buenos productos de PCR y se realizó la identificación de especies a través del análisis SSCP.

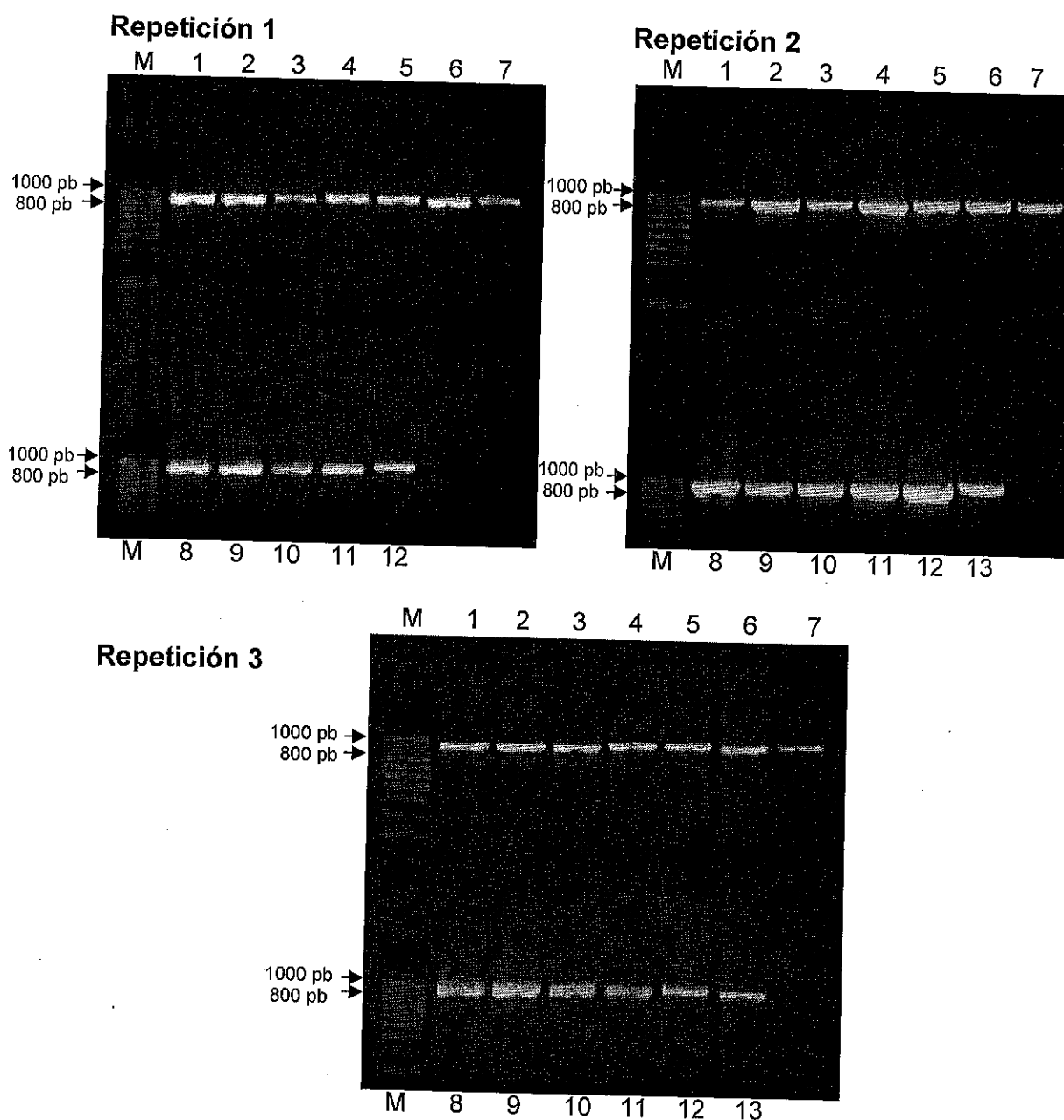


Fig 4. Representación de los fragmentos amplificados por PCR usando los praimers ITS4 e ITS6, amplificando fragmentos que van de 862 pb a 941 pb de diferentes especies de *Phytophthora*. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 GIBCO BRL; línea 1 de repetición 1, 2 y 3 *P. cinnamomi*; línea 2 *P. cryptogea* de gerbera; línea 3 *P. cryptogea* de crisantemo; línea 4 *P. fragariae*; línea 5 *P. infestans*; línea 6 *P. capsici* de pepino; línea 7 *P. capsici* de chile; línea 8 *P. capsici* de calabaza; línea 9 *P. phaseoli*; línea 10 *P. cactorum*; línea 11 *P. erythrosepica*; línea 12 repetición 1 *P. cinnamomi* CNRDF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 12 en reptición 2 y 3 *P. citricola* CNRE (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario); línea 13 reptición 2 y 3 *P. capsici* CNRDF(Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

4.4.3 Polimorfismos Conformationales de Cadena Sencilla (SSCP)

En las figuras 5, 6 y 7 se presentan los patrones polimórficos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) de especies de *Phytophthora* en tres repeticiones, amplificadas con los iniciadores ITS4 e ITS6. En la repetición 1, figura 5 se observó que la especie *P. capsici* (carril 7, 8 y 9), que se aisló de diferentes hospedantes (pepino, calabaza y chile), presentaron una migración electroforética similar, en contraste con el resto de las especies, de la misma manera en la repetición 2, figura 6 (carril 5, 6, 7 y 9), donde además se incluyó a *P. capsici* proporcionada por el CNRF y en la repetición 3, figura 7 (carril 7, 8, 9 y 10), todas migraron de forma similar, por lo que para este estudio se agrupó a *P. capsici* obtenida de diferentes hospedantes como "electroferogrupo 1". *P. cinnamomi* también marca una gran diferencia en la migración al resto de las especies, esto se observó en la repetición 1 figura 5 (carril 5 y 6) donde se analizó a *P. cinnamomi* aislada de raíces de aguacate y se comparó con el aislamiento proporcionado por el CNRDF; también en la repetición 2, figura 6 (carril 4) y repetición 3 (carril 6) donde se encontró *P. cinnamomi* de aguacate, y donde la separación de los patrones fue similar; sin embargo en la repetición 2 figura 6 (carril 3) donde se ubicó a *P. phaseoli*, la separación fue poco similar a *P. cinnamomi*, de la misma forma en la repetición 3, figura 7 (carril 6), por lo tanto *P. cinnamomi* se agrupó en "electroferogrupo 2". Otra especie que determinó la diferenciación fue *P. cryptogea*, aislada de crisantemo y de gerbera. En la repetición 1, figura 5 (carril 11 y 12), repetición 2, figura 6 (carril 10 y 11) y repetición 3 figura 7 (carril 3 y 4) en donde todos los aislamientos de *P. cryptogea* migraron de forma similar, pero con movilidad electroforética diferente a los electroferogrupos 1 y 2; considerando así este último como "electroferogrupo 3".

El resto de las especies, aisladas de un sólo hospedante presentaron una migración similar en cada una de sus repeticiones; pero se observaron

diferencias en la migración al comparar los patrones con la nueve especies de *Phytophthora* en una sola repetición.

Repetición 1

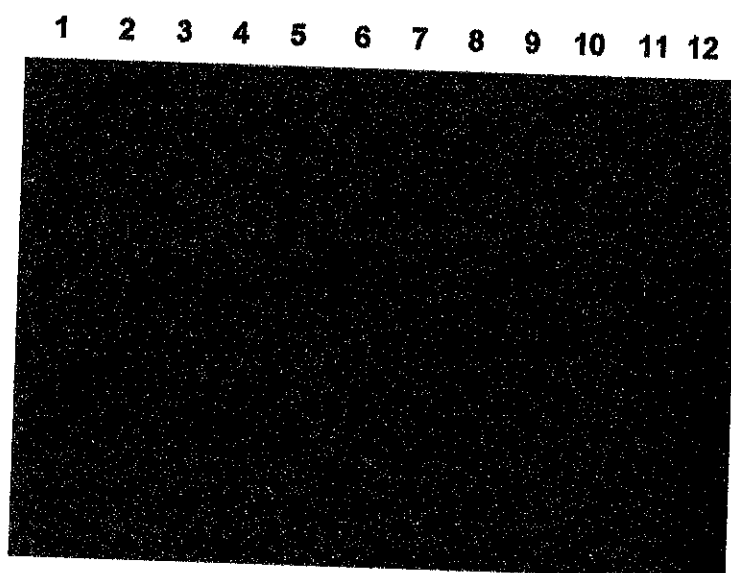


Fig. 5 Análisis de patrones SSCP de los productos amplificados mediante PCR a partir de los praimers ITS4 e ITS6 de 8 especies de *Phytophthora*: Línea 1 *P. fragariae*, línea 2 *P. infestans*, línea 3 *P. phaseoli*, línea 4 *P. cactorum*, línea 5 *P. cinnamomi*, línea 6 *P. cinnamomi* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 7 *P. capsici* de pepino, línea 8 *P. capsici* de chile, línea 9 *P. capsici* de calabaza, línea 10 *P. erytroseptica*, línea 11 *P. cryptogea* de gerbera y línea 12 *P. cryptogea* de crisantemo.

Repetición 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

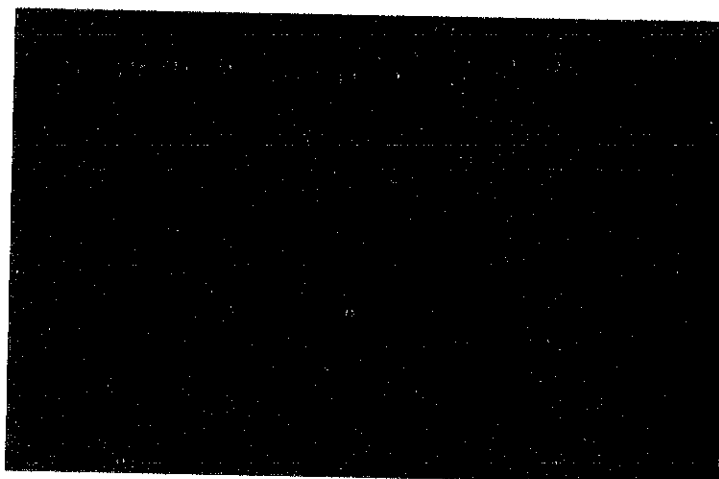


Fig. 6 Análisis de patrones SSCP de los productos amplificados mediante PCR de 9 especies de *Phytophthora*: Línea 1 *P. fragariae*, línea 2 *P. infestans*, línea 3 *P. phaseoli*, línea 4 *P. cinnamomi*, línea 5 *P. capsici* de pepino, línea 6 *P. capsici* de chile, línea 7 *P. capsici* de calabaza, línea 8 *P. erytroseptica* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 9 *P. capsici* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 10 *P. cryptogea* de gerbera, línea 11 *P. cryptogea* de crisantemo, línea 12 *P. cactorum* y línea 13 *P. citricola* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

Repetición 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

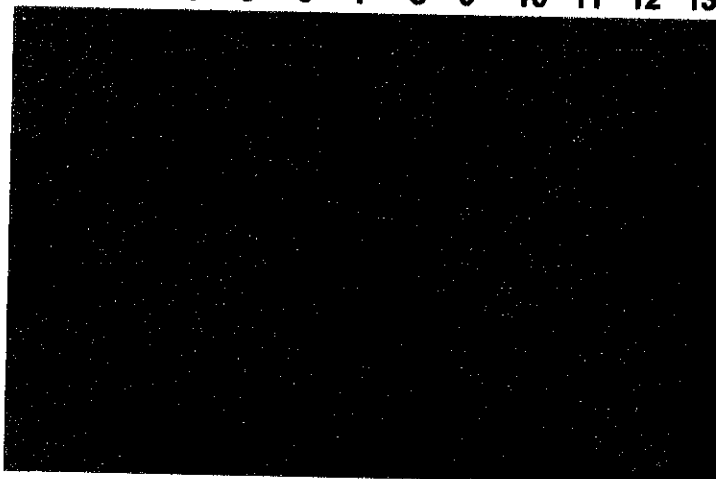


Fig. 7 Análisis de patrones SSCP de los productos amplificados mediante PCR de 9 especies de *Phytophthora*: Línea 1 *P. fragariae*, línea 2 *P. infestans*, línea 3 *P. cryptogea* de gerbera, línea 4 *P. cryptogea* de crisantemo, línea 5 *P. phaseoli*, línea 6 *P. cinnamomi*, línea 7 *P. capsici* de pepino, línea 8 *P. capsici* de chile, línea 9 *P. capsici* de calabaza, línea 10 *P. capsici* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 11 *P. erytroseptica* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario), línea 12 *P. cactorum* y línea 13 *P. citricola* CNRF (Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario).

En la última década, el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), se han utilizado por ser considerado como un método sensible, económico y rápido para detectar la variación de las secuencias de ADN (Niblett, *et al.*, 2000).

El método se basa en la detección electroforética de los cambios de conformación del DNA monocatenario, resultado de mutaciones puntuales u otras formas de cambio en la secuencia (Orita *et al.*, 1989).

Aunque Yap and McGee (1994) mencionaron que se puede tener un mejor resultado al utilizar productos de PCR menores a 400 pb. La aplicación de esta técnica a 500, 600 y 800 pb de PPCR por Aguilar (2004) mostró eficientes resultados al caracterizar aislamientos mexicanos del Virus de la Tristeza de los Cítricos. Por esta razón y considerando un análisis previo de los PPCR de las especie de *Phytophthora* (862 a 946 pb) se decidió utilizar esta técnica para la diferenciación de especies.

SSCP es un método de detección por mutación, basado en la habilidad para detectar variación en las secuencias de fragmentos de ADN amplificados a por medio de PCR. Una o pocas diferencias de nucleótidos entre los segmentos de ADN templado puede causar agudos cambios en la conformación y de esta manera los diferentes grados de movilidad en el gel, permitiéndolo su diferenciación. La aplicación de esta técnica a fragmentos con tamaños mayores a 400 pb de ADN de la región ITS, mostró ser método un eficiente para diferenciar especies de *Phytophthora* asociadas a diferentes hospedantes.

La diferenciación de especies de *Phytophthora* a nivel molecular ya ha sido estudiada en investigaciones con otros métodos. En un estudio realizado con especies de *Phytophthora* del grupo IV, basado en la comparación de las secuencias de pequeños fragmentos de la región ITS2. La variación encontrada

permitió poca diferenciación de los aislamientos (Tooley *et al.*, 1996), por lo que este autor concluyó que la restricción por medio del análisis de PCR amplificando la región ITS2 puede ser usado como un método adjunto a criterios morfológicos para la identificación de especies de *Phytophthora*.

La razón fundamental para la aplicación de los SSCP en la diferenciación de las nueve especies de *Phytophthora*, radicó en el conocimiento sobre el origen y biología en cuanto a su relación con los hongos y su diversidad genética.

Aunque la técnica PCR-SSCP permitió diferenciar a nueve especies de *Phytophthora*, fue necesario optimizar las condiciones del laboratorio como: tipo de gel (archilamida o bisacrilamida), condiciones de la electroforesis (principalmente a la temperatura en que se corre, tiempo, formamida y concentración de glicerol, tamaño de la banda, dimensión del gel, etc. La movilidad electroforetica del ADN de una sola cadena, depende fuertemente de las condiciones ambientales. Cuando se aplican las condiciones necesarias, se obtiene una buena migración de las bandas. Todos los aislamientos de la misma especie en diferentes hospedantes proporcionaron una misma separación de los patrones. La diferencia se observó en la movilidad que realizaron los diferentes aislamientos de su respectivo hospedante asociado, que tuvieron una movilidad electroforetica diferente, esto nos proporcionó cumplir con el objetivo de diferenciar las nueve especies de *Phytophthora* aisladas de diferentes hospedantes, mediante Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla.

5. CONCLUSIONES

- 1.- De los síntomas de pudrición de frutos de calabaza, y pepino y pudrición de raíz en chile, se aisló en medio de cultivo jugo de tomate-agar e identificó a *Phytophthora capsici* debido al desarrollo de esporangios de formas muy variadas y con dos papilas.
- 2.- De plantas de fresa con síntomas de pudrición en raíz y cuello se aisló a *P. fragariae* y *P. cactorum*, esta última con más facilidad y buen crecimiento en medio de cultivo jugo de verduras V8-agar, y además produjo una gran cantidad de esporangios papilados, arreglados en simpodio simple y oosporas pleróticas de color amarillo paja, mientras que *P. fragariae* con escaso crecimiento, proporcionó pocos esporangios sin papila, y el crecimiento micelial fue cameliforme.
- 3.- *P. cryptogea* se obtuvo de pudrición de raíz y cuello de gerbera y crisantemo respectivamente y su aislamiento fue más fácil ya que mostró una esporulación buena en agua destilada esteril. *P. cryptogea* desarrolló esporangios sin papila, en forma de racimos.
- 4.- *P. cinnamomi* se obtuvo de raíces necróticas de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva, mostrando crecimientos cameliformes típicos, micelio turuloso y presencia de escasas clamidosporas en racimo en el medio.

- 5.- *P. infestans* fue la más difícil de obtener, ya que exclusivamente creció en medio de cultivo centeno-agar y generó esporangios con papilla inconspicua en esporangióforos con inchamientos.
- 6.- *P. pahseoli* se aisló fácilmente de ejotes (Con crecimiento algodonoso de micelio blanco), en medio de cultivo PDA y su esporulación se logró en agua destilada estéril con trozos de ejote. *P. phaseoli* mostró esporangios puntiagudos con papila inconspicua y base inchada.
- 7.- Los medios de cultivo selectivos (centeno-agar, harina de maíz-agar, jugo de tomate-agar y jugo de verduras V8-agar) son esenciales para la producción de estructuras reproductivas, las cuales son básicas para la identificación .
- 8.- Con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) , no se logró diferenciar las especies de *Phytophthora* ya que el tamaño del producto obtenido (850-950), se visualizó muy similar a las nueve especies.
- 9.- Los Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP), obtenidos a partir de productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), permitieron diferenciar a las nueve especies de *Phytophthora*, ya que cada una de ellas mostró un patrón conformacional diferente (distancias electroforéticas diferentes).
- 10.- Los tres aislamientos de *P. capsici* (calabaza, pepino y chile), presentaron el mismo movimiento electroforético, aunque fueron de hospedante diferente. Lo mismo ocurrió con *P. cinnamomi* y *P. cryptogea*, considerándose a cada una de estas especies en un electroferogrupos diferentes (1, 2 y 3 respectivamente).

11.- La técnica de Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR- SSCP) es fácil de llevar a cabo y de interpretación sencilla que adjunto con los criterios morfológicos permitieron la identificación y diferenciación de las nueve especies de *Phytophthora*.

VI. LITERATURA CITADA

- Abad, Z.G., and Abad, J.A.** 2003. Advances in the integration of morphological and molecular characterization in the genus *Phytophthora*: The case *P. niederhauseria*. *Phytopathology* 93:S1. Publication no. P-2003-0002-AMA.
- Agrios, N.G.** 2001. *Fitopatología*. Editorial Limusa. México, D.F. 838 pp.
- Aguilar, J.R.** (2004). Caracterización de Aislamientos Mexicanos del Citrus Tristeza Closterovirus Mediante Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla. Tesis de Maestría. UACH, Parasitología Agrícola. Chapingo México.
- Andrison, D.** 1995. Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* 85: 1053-1056.
- Appiah, A.A., Flood, J., Bridge, P.D., Archer, S.A.** 2003. Inter and intraespecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology* 52,168-80.
- Arbos, A.M.** 1992. El crisantemo, cultivo, multiplicación y enfermedades. *Agroguías Mundi-prensa*. Madrid. España. 170 p.

- Baños, A.S., Romo, J.A.F. Hernández y A.G., Benavente-García.** 1993. Gerbera, Liliun, Tulipan y Rosa. Editorial Mundi-Prensa. Madrid españa pp. 56-57.
- Boccas, B., and Zentmyer, G.A.** 1976. Genetical studies with interespecific crosses between *P. cinnamomi* and *P. parasitica*. *Phytopathology* 66:477-48.
- Bonants, P.J.M., Hagenaar-de Weerd, M., Man in't Veld, W.A., and Baayen, R.P.** 2000. Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology* 90: 867-874.
- Café-Filbo, A.C., Duniway, J.M., and Davis, R.M.** 1995. Effect of the frequency of Furrow irrigation on root and fruits rots of squash caused by *Phytophthora capsici*. *Plant. Dis.* 79:44-48.
- Cahill, D.M., and Hardham, A. R.** 1994. Exploitation of zoospore taxis in the development of novel dipstick immunossay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 84:193-200.
- Cohen, Y., and Coffey, M.D.** 1973. Stage specificity in streptomycin action against some plant pathogenic Peronosporales. *Phytopathology* 63:1172-1180.
- Cooke, D.E.L., and Duncan, J.M.** 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Myn. Res.* 101, 667-677.
- Erwin, D.C., and Ribeiro, O.K.** 1996. *Phytophthora* Diseases World Wide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

- Espinoza, L.L.** (1999). Etiología de la pudrición de Raíz y cuello del chile. Tesis de Licenciatura. UACH, Parasitología Agrícola. Chapingo México.
- Gabor, B.K., O'Gara, E.T., Philip, B.A., Horan, D.P., and Hardham, A.R.** 1993. Specificities of monoclonal antibodies to *Phytophthora cinnamomi* in rapid diagnostic assays. Plant Disease. 77:1189-1197.
- Galindo, A. J.** 1962. Marchitez de las plantas de chile causado por *Phytophthora capsici* L. Revista de fitopatología Mexicana.
- Galindo, A.J., and Zentmyer, G.A.** 1964. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 54:238-239.
- Grove, G.G., Ellis, M.A., Madden, L.V., and Schmitther, A.F.** 1985. overwinter survival of *Phytophthora cactorum* in infected strawberry fruit. Plant Dis. 69:514-515.
- Goodwin, P.H., Kirkpatrick, B.C., Duniway, J.M.** 1989. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 79:716-721.
- Hassis, F.A., and Nelson, R.R.** 1963. Studies on the biological relationship of species of *Phytophthora* as measured by oospore formation in intra- and interspecific crosses. Plant Dis. Rep. 47:705-709.
- Hayashi, K.** 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods and Applications 1:34-38.
- Ho, H.H.** 1992. Keys to the species of *Phytophthora* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 1: 104-109.

- Hooker, W.J.** 1981. Compendium of Potato Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Jeffers, S.N., and Martin, S.B.** 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease 70:1038-1043.
- Jones, J.B., Stall, R.E., Zitter, T.A.** 1991. Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota 55121-2097, USA. 73p.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., and Stalpers, J.A.** 2001. Dictionary of the fungi. 9th Edition. CABI Publishing. 665 p.
- Kendrick, B.** 2000. The fifth Kingdom. Third Edition. Focus Publishing. 374 p.
- Kurt, W., Hide, N., Kirsten, W., and Wieland, M.** 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida. 321 pp.
- Leonian, L.H.** 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov. Phytopathology 12:401-408.
- Lee, S.B., White, T. J., Taylor, J.W.** 1993. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spaces. Phytopathology 83:177-181.
- Linde, C., Drenth, A., Kemp, G.H.J., Wingfield, M.J., Von Broembsen, S.L.** 1997. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. Phytopathology 87, 822-7.

- Madden, L.V., Ellis, M.A., Grove, G.G., Reynolds, K.M., and Wildson, L.L.** 1991. Epidemiology and control of leather rot of strawberries. *Plant Dis.* 75: 439-446.
- Madden, L.V., and Ellis, M.A.** 1990. Effect of ground cover on splash dispersal of *Phytophthora cactorum* from strawberry fruits. *Journal of Phytopathology*. 129:170-174.
- Mendoza, Z. C.** 1996. Diagnostico de Enfermedades Fungosas. Parasitología agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Méx. pp 168.
- Mendoza, Z. C.** 1993. Diagnostico de enfermedades fungosas. UACH. Depto. de Parasitología agrícola Chapingo, México.
- Milhollan, R.D.** 1994. A Monograph of *Phytophthora fragariae* and the Red Stele Disease of Strawberry. Department of Plant Pathology North Carolina State University Raleigh, North Carolina. Technical Bulletin 306.
- Milhollan, R.D., and Daykin M.E.** 1993. Colonization of roots of strawberry cultivars with different levels of susceptibility to *Phytophthora fragariae* on selected strawberry genotypes. *Phytopathology* 83:583-542.
- Miller, S. A., and Martín, R.R.** 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology*. 26:409-432.
- Moricca, S., Borja, I., Vendramin, G.G., and Raddi, P.** 2000. Differentiation of *Seiridium* species associated with virulent cankers on cypress in the Mediterranean region by PCR-SSCP. *Plant Pathology* 49, 774-781.

- Moricca, S., and Ragazzi, A.** 1998. Use of RFLP and SSCP analysis to differentiate the pine rust *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. *Micological Research* 102, 666-670.
- Niblet, C.L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G., Bonacalza, B., Manjunath, K.L., Febres, V.J., Pappu, H.R., Lee, R.F.** 2000. Progress on strain differentiation of citrus tristeza and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Research* 71:97-160.
- Ortega R.** (1999). Resistencia a *Phytophthora capsici* Loen. En Pimiento. Colección tesis Doctorales INIA 89. MAPA, Madrid.
- Orita, M., Suzuki, Y., Seyika, T. and Hayashi, K.** 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms. *Genomics* 5:874-879.
- Ristaino, J.B.** 1990. Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. *Phytopathology* 80:1253-1259.
- Ristaino, J.B., Gumperz, M.L.** 2000. New Frontiers in the Study of Dispersal and Spatial Analysis of Epidemics Caused by Species in the Genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 38:207-39.
- Robin, C., Desprez-Loustau, M.L. and Delatour, C.** 1992. Spatial and temporal enlargement of cankers of *Phytophthora cinnamomi* in red oak. *Can.J.For.Res.* 22:3:362-366.

- Rojas, M.R.I.** (1998). Identificación del fitoplasma de la filodia del cempazúchil (*Tagetes erecta* L.) mediante PCR y RFLP'S y alteraciones fisiológicas en plantas sintomáticas. Tesis de Doctor en Ciencias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.
- Romero, S.C.** 1993. Hongos fitopatogenos , Universidad Autónoma Chapingo, México. 347p.
- Romero, S.C.** 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. Universidad Autónoma Chapingo, México. 244p.
- Smith I.M., J. Dunez., P.H., Phyllips., R.A., Lelliott and S.A., Archer** 1992. Manual de enfermedades de plantas. Editorial Mundi-España. Pp. 247-248.
- Stamps, D.J., waterhouse, G.M. Newhook, F.J., and Hall,G.S.** 1990. Resised Tabular Key to the species of *Phytophthora*. CABI Mycology Inst.Mycol. Pap. No. 162.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H.** 2002. Plagas y enfermedades de los cítricos. Editorial Mundi-prensa. México. D.F. 95 pp.
- Trout, C.L., Ristaino, J.B., Madritch, M., and Wangsmboondee, T.** 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. Plant Dis. 81: 1042-1048.
- Tooley, P.W., Carras, M.M., and Falkenstein.** 1996. Relationships Among Group IV *Phytophthora* Species Inferred by Restriction Analysis of the ITS2 Region. J. Phytopathology 144. 363-369.

- Tyler, B.M.** 2002. Molecular Basis of Recognition Between *Phytophthora* Pathogens and Their Host. Annual Review of Phytopathology 40:137-67.
- Waterhouse, G.M.** 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Common. Mycol. Inst., Kew, UK.
- Wilcox, W.F.** 1989. Identity, Virulence, and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. Causing root rot of raspberry in New York. Phytopathology 79:93-101.
- Williams, J.G.K., Kubelik, R.A., Livak, J.K., Ralfaski, A.J., and Tingey, V.S.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markes. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
- Xie, J., Wehner, T.C. and Conkling, M.A.** 2002. PCR based Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Analysis to clone nine Aquaporin Genes in Cucumber. J. Amer. Soc. Hort. SCI.127(6):925-930.
- Yañez-Morales, M.J.** (2001). Molecular and morphological analyses of *Alternaria* and *Stemphylium* from onion. P.h.D. Tesis Doctoral. Cornell University. Itaca, NY. USA. 261p.
- Yap, E.P.H., and McGee, J. O. D.** 1994. PCR Technology. CRC Press Inc. 20, 165-177.
- Zentmyer, G.A., Mircetich, S.M.** 1966. Saprophytims and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 56, 710-2.

Zentmyer, G.A., Jefferson, L., Hickman, C.J., and Yung, C.H. 1974. Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea Americana*. Mycologia 66:830-84