

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Agronomía
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:
IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE
PATOGENICIDAD DE OOMICETES PROVENIENTES DE
AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

JOSUÉ CÁRDENAS RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MOISÉS GILBERTO YÁÑEZ JUÁREZ

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

Culiacán, Sinaloa, México; noviembre de 2022

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JOSUÉ CÁRDENAS RODRÍGUEZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:

DR. MOISÉS GILBERTO YÁÑEZ JUÁREZ

CODIRECTOR:

DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

ASESOR:

DR. FELIPE AYALA TAFOYA

ASESOR:

DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUIDEZ

ASESORA:

DRA. LUZ LLARELY CÁZAREZ FLORES

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO; NOVIEMBRE DE 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa el día 31 del mes de octubre del año 2022, el que suscribe Josué Cárdenas Rodríguez alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias con número de cuenta 09186379, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Moisés Gilberto Yáñez Juárez y el Dr. Carlos Alfonso López Orona de acuerdo al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor, cede los derechos del trabajo titulado "IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD DE OOMICETES PROVENIENTES DE AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JOSUÉ CÁRDENAS RODRÍGUEZ



Dirección General de Bibliotecas



U n i v e r s i d a d A u t ó n o m a d e S i n a l o a

REPOSITORIO INSTITUCIONAL

UAS- Dirección General de

Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.



ANÁLISIS ANTIPLAGIO

El presente documento Titulado “Identificación Y Determinación De Patogenicidad De Oomicetes Provenientes De Agua Superficial De Ríos Y Canales En El Municipio De Culiacán, Sinaloa” fue sometido a un software antiplagio, el cual presentó un aproximado de 15% de similitud entre otros escritos, lo cual es considerado como óptimo para su publicación sin considerarse como plagio.



DEDICATORIA

A mis padres:

Fernando Cárdenas Aréchiga
Consuelo Emperatriz Rodríguez

A mis hermanos:

Fernando Miguel Cárdenas Rodríguez
Misael Cárdenas Rodríguez
Ricardo Cárdenas Rodríguez

A mis cuñadas:

Katty Leonora Naranjo Milán
Fernanda López Guzmán

A mis sobrinos:

Jesús Fernando Cárdenas Naranjo
†Luis Ricardo Cárdenas López†
Aimee Aracely Cárdenas Naranjo
José Miguel Cárdenas López
Diana Sofía Cárdenas López

AGRADECIMIENTOS

Ante todas las circunstancias doy gracias a Dios por haberme otorgado salud, paciencia y fuerza en esta trayectoria, y así lograr esta meta en mi vida.

Doy gracias al CONACYT por el financiamiento de los estudios de Josué Cárdenas Rodríguez y a la Universidad Autónoma de Sinaloa-Facultad de Agronomía por el apoyo en esta investigación.

A mi director de tesis, Dr. Moisés Gilberto Yáñez Juárez quien lleva a cargo el don de enseñar a las personas, brindar su gran sabiduría, amistad, paciencia, consejos, dedicación y sobre todo por su gran enseñanza a lo largo de este trabajo. Muchas gracias por todo.

Agradezco a mis asesores, Dr. Carlos Alfonso López Orona, Dr. Felipe Ayala Tafoya y Dra. Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz por sus sabios consejos, conocimientos, comprensión y su sincera amistad.

Agradezco al Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez, al Dr. Juan Campos y a Francisco Javier, por sus enseñanzas y haberme abierto las puertas durante la estancia escolar en el laboratorio de biotecnología de fermentaciones, Universidad Autónoma de Querétaro.

A mis amigos y compañeros Ricardo Castro, Norma Zazueta, Guillermo González, Berenice Quiñonez y Graciela Soto, por su apoyo universitario y personal ¡Muchas Gracias!

CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESÚMEN GENERAL	iv
GENERAL ABSTRACT	v
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1.1 Problema científico	3
1.1.2 Hipótesis	3
1.1.3 Objetivo general	3
1.1.4 Objetivos específicos	3
1.2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.2.1 Los oomicetes	4
1.2.1.1 Descripción taxonómica	5
1.2.1.2 Características morfológicas	5
1.2.1.3 Reproducción	6
1.2.1.4 Ciclo de vida	8
1.2.1.5 Distribución geográfica	9
1.2.1.6 Rango de hospedantes	9
1.2.1.7 Síntomas	9
1.2.1.8 Género <i>Phytophthora</i>	10
1.2.1.9 Género <i>Pythium</i>	11
1.2.1.10 Género <i>Phytopythium</i>	12
1.2.2 Importancia del estudio e identificación de oomicetes	12
1.2.3 Importancia de la biotecnología para el conocimiento de los oomicetes	14
1.2.4 Importancia del agua como fuente de inóculo y dispersión	16
1.2.5 El distrito de riego 010 Culiacán-Humaya	17

CAPÍTULO II. ESPECIES DE <i>Phytophthora</i> ASOCIADAS A AGUA DE IRRIGACIÓN EN EL VALLE DE CULIACÁN	20
2.1 INTRODUCCIÓN	20
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.2.1 Obtención, purificación y conservación de aislamientos <i>Phytophthora</i> spp	21
2.2.2 Características morfológicas y culturales	25
2.2.3 Identificación molecular	26
2.2.3.1 Extracción del ADN	26
2.2.3.2 Amplificación, purificación y secuenciación del ADN	27
2.2.4 Pruebas de patogenicidad	28
2.2.4.1 Obtención de plántulas	28
2.2.4.2 Pruebas de patogenicidad en plantas	28
2.2.4.3 Pruebas de patogenicidad en frutos	29
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
CAPÍTULO III. ESPECIES DE <i>Pythium</i> AISLADAS DE AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA	34
3.1 INTRODUCCIÓN	34
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.2.1 Obtención, purificación y conservación de aislamientos de <i>Pythium</i> spp	35
3.2.2 Características morfológicas	38
3.2.3 Identificación molecular	38
3.2.3.1 Amplificación, purificación y secuenciación del ADN	39
3.2.4 Pruebas de patogenicidad	40
3.2.4.1 Obtención de plántulas	40
3.2.4.2 Inoculación de plantas y frutos	40
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42

CAPÍTULO IV. <i>Phytophthium helicoides</i> ASOCIADO CON AGUAS PARA IRRIGACIÓN AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA	49
4.1 INTRODUCCIÓN	49
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
CAPÍTULO V. SENSIBILIDAD A METALAXIL DE OOMICETES AISLADOS DE AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA	60
5.1 INTRODUCCIÓN	60
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	60
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO VI. PLANTAS SILVESTRES HOSPEDANTES DE OOMICETES	64
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES	66
CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
2.1	Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para la obtención de aislamientos de <i>Phytophthora</i> spp., Culiacán, Sinaloa, 2018-2019.	23
2.2	Cebadores utilizados para la amplificación de ADN de <i>Phytophthora</i> spp. (Kroon <i>et al.</i> , 2004).	27
2.3	Características fenotípicas de los aislamientos de <i>Phytophthora</i> spp.	30
2.4	Especies de <i>Phytophthora</i> identificadas por aislamiento	31
3.1	Sitios de muestreo, Culiacán, Sinaloa, México	36
3.2	Cebadores utilizados para la amplificación de ADN de <i>Pythium</i> spp.	40
3.3	Localidad y coordenadas de sitios de muestreo donde se obtuvieron aislamientos del género <i>Pythium</i> .	43
3.4	Severidad del daño en plántulas de tomate, chile y pepino originada por cinco aislamientos de <i>Pythium</i> sp. obtenidos de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.	45
3.5	Severidad en frutos de tomate, chile y pepino originada por cinco aislamientos de <i>Pythium</i> spp. obtenidos de aguas para el uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.	46
4.1	Aislamientos obtenidos de aguas de uso agrícola y localización de los sitios de colecta.	54
4.2	Similitud a <i>Phytopythium helicoides</i> de los aislamientos obtenidos de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.	56
5.1	Inhibición del crecimiento radial de oomicetes con metalaxil.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Características generales de los oomicetes	6
1.2	Clados de las especies de <i>Phytophthora</i>	15
1.3	Fotografía satelital del DR010 CLN-Humaya, DR074 Mocerito y DR109 San Lorenzo	18
1.4	Uso y distribución del agua de riego en el DR010 CLN-Humaya	19
2.1	Principales sitios de muestreo en el municipio de Culiacán, Sinaloa	22
2.2	Material utilizado para la colecta de aislamientos	24
2.3	Estructuras sexuales y asexuales de los Oomycetes	31
2.4	Pruebas de patogenicidad de la especie <i>Phytophthora hydropathica</i>	32
3.1	Características morfológicas de <i>Pythium</i> spp	43
3.2	Árbol filogenético que integra las especies de <i>Pythium</i> obtenidas en esta investigación, elaborado con el método de máxima verosimilitud	44
3.3	Pruebas de patogenicidad de <i>Pythium aphanidermatum</i> aislamiento EC17	45
3.4	Temperatura promedio ($\pm 1^\circ\text{C}$) del agua en 39 puntos de muestreo en el periodo comprendido del 1 de septiembre de 2018 al 20 de febrero de 2019. Culiacán Sinaloa, México	46
4.1	Crecimiento de <i>Phytopythium helicoides</i> (PhyH11) sobre medio de cultivo A) HMA y B) V8A.	55
4.2	Estructuras morfológicas de <i>Phytopythium helicoides</i> (PhyH11). A-C) esporangios globosos, simples terminales; D-F) oosporas sin ornamentación.	55

4.3	Árbol filogenético resultante para los aislamientos de <i>Phytophthium helicoides</i> de aguas de uso agrícola de Culiacán, Sinaloa (Irrigation water-México), elaborado con el método de máxima verosimilitud y modelo Tamura-Nei. Como secuencia outgroup se colocó a <i>Saprolegnia diclina</i> .	57
4.4	Pruebas de patogenicidad: a la izquierda, plantas inoculadas con <i>Phytophthium helicoides</i> (PhyH11); a la derecha, plantas testigo. A) plantas de tomate; B) plantas de chile y C) plantas de pepino.	58
5.1	Interacción entre crecimiento radial	63
6.1	Plantas silvestres infectadas por oomicetes	65

RESUMEN GENERAL

Los oomicetes son un grupo de organismos acuáticos con características muy similares a los hongos verdaderos. Presentan alto potencial patogénico y distribución cosmopolita. Son causantes de cuantiosas pérdidas económicas al parasitar plantas cultivadas y en ambientes naturales. La diversidad de especies de oomicetes presentes en agua de uso agrícola y su influencia en la incidencia de enfermedades en plantas cultivadas es limitada en las regiones agrícolas de Sinaloa, así, esta investigación se realizó con el propósito de determinar la presencia de oomicetes fitopatógenos en aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa, además de conocer la sensibilidad que presentan al compuesto metalaxil y plantas silvestres donde se hospedan. Durante el periodo comprendido de septiembre de 2018 a enero de 2019, en diferentes redes hídricas agrícolas (presas, estanques, ríos y canales), se colocaron trampas flotantes elaboradas con bolsas de polipropileno y dos frutos de pera que sirvieron como cebo. Se obtuvieron 107 aislamientos de oomicetes, los cuales se identificaron en base a sus características morfológicas y secuencias de ADN (con los cebadores ITS 4/6, COX y NADH), también se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas y frutos de tomate, chile y pepino, además, se realizaron confrontaciones *in vitro* de los organismos con el fungicida metalaxil a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se realizó la búsqueda heurística de plantas silvestre hospedantes. Los organismos aislamientos e identificados fueron: *Phytophthora capsici*, *Phytophthora hydrophatica*, *Phytophthora lagoariana*, *Phytophthora parsiana*, *Phytophthora virginiana*, *Phytophythium helicoides*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium torulosum* y *Pythium pachycaule*. Las pruebas patogénicas fueron positivas para todos los aislamientos en plantas y frutos de tomate, chile y pepino, en las que originaron síntomas de marchitez y pudrición. Los resultado *in vitro* mostraron que metalaxil a concentración de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ logró la inhibición de todos los aislamientos, excepto a *Phytophythium helicoides*, por lo que se caracterizó como resistente a ese compuesto. El resultado de la búsqueda heurística mostró tres plantas hospederas de oomicetes identificadas como *Eichhornia crassipies*, infectada por *Pythium*

torulosum; *Polanisia dodecandra* colonizada por *Phytophthora capsici* y *Saggitaria lancifolia* hospedante de *Phytophthora hydropathica*.

Palabras clave: Ácidos nucleicos, metalaxil, oomicetes y patogenicidad.

ABSTRACT

The oomicetes are a group of aquatic organisms with characteristics very similar to real fungus. They show high pathogenic potential and cosmopolitan distribution. They cause a lot of economic losses when they infect crops and natural environments. The diversity of species from oomicetes on irrigation water for agriculture and the influence in the incidence of diseases on crops is limited in agriculture areas from Sinaloa, then, this investigation was performed with the propose to determinate the presence of phytopatogens oomicetes on water from Culiacán, Sinaloa, furthermore, to know the sensivity of isolates to metalaxil and hosts wild plants. During the period from september 2018 to january 2019, in differents water networks (dams, ponds, rivers and canals), they were placed floating traps made of polypropilene and two pears used as bait. There were collected 107 isolates of oomicetes, they were identified on base of their morphological characteristics and DNA sequences (with the initiators ITS 4/6, COX and NADH), pathogenic tests were performed on plants and fruits of tomato, pepper and cucumber, furthermore *in vitro* tests were of the isolates with the fungicide metalaxil at the contentrations of 0.1, 0.5, 1 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a heuristic exploration of wild plants. The isolates were identified as: *Phytophthora capsici*, *Phytophthora hydropathica*, *Phytophthora lagoariana*, *Phytophthora parsiana*, *Phytophthora virginiana*, *Phytopythium helicoides*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium torulosum* and *Pythium pachycaule*. The pathogenic tests were positive to all the isolates on plants and fruits of tomato, pepper and cucumber, symptoms as wilting and rotten were observed. *In vitro* tests showed that metalaxil at concentration of 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was effective to all isolates, except to *Phytopythium helicoides*, that were resistant to this fungicide. The result of heuristic exploration showed three host plants of oomicetes identified as *Eichhornia crassipies* infected

by *Pythium torulosum*; *Polanisia dodecandra* colonizing by *Phytophthora capsici* and *Sagittaria lancifolia* host of *Phytophthora hydrophatica*.

Keywords: Nucleic acids, metalaxil, oomycetes and pathogenicity

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas cultivadas están expuestas continuamente a factores bióticos y abióticos que afectan negativamente el rendimiento y la calidad de sus productos. Las plagas y enfermedades han originado pérdidas económicas hasta del 40% de la producción agrícola mundial (FAO, 2019). El desarrollo de los sistemas de agricultura protegida (invernaderos, malla sombra, etc.) fue una respuesta directa para disminuir factores adversos como plagas y enfermedades (Hahn, 2011), sin embargo, las condiciones ambientales generadas en su interior frecuentemente favorecen su presencia y desarrollo (Benítez *et al.*, 2019). Sinaloa destaca como estado agrícola ubicado en una región irrigada de México, poseedor de sistemas hidráulicos que cubren grandes extensiones de tierras fértiles, por lo que se propicia el desarrollo continuo de esa actividad (ACIS, 2014). El sector agrícola del Estado sustenta el 11% del producto interno bruto y emplea el 23% de la población activa, que cultiva una superficie de 1 067 526 ha, de las cuales 856 615 ha se destinan a la producción de granos, 57 782 ha para hortalizas y el resto a diversos cultivos (CODESIN, 2020). Sinaloa es también considerado el estado con mayor superficie destinada a la producción de hortalizas, donde hasta 14 611 ha se destinaron a la producción de tomate, 15 952 ha para chile y 4 695 ha para producir pepino (CODESIN, 2018; SIAP, 2021). Además, el 97% de la producción hortícola sinaloense es exportada a mercados internacionales como Estados Unidos, Canadá, España, Francia, Italia, Argentina, Japón y el 3% es para el mercado nacional (SIAP, 2021). Los horticultores de Sinaloa al igual que otros, enfrentan adversidades para lograr producir, una de ellas es el agua de riego como vehículo dispersor de inóculo de agentes fitopatógenos (Redekar *et al.*, 2018). Al respecto, diversos estudios han demostrado que el agua proveniente de presas, estanques, ríos, canales y reservorios utilizados para la irrigación agrícola transportan amplia variedad de organismos capaces de infectar numerosos cultivos (Hong *et al.*, 2010), así, se demostró que el agua es eficaz para diseminar agentes fitopatógenos como bacterias (Martins *et al.*, 2018; Álvarez *et al.*, 2019), virus (Plotnikov *et al.*, 2020;

Rivas *et al.*, 2020), nematodos (Hong *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2010), hongos (Jones *et al.*, 2014; Corrales *et al.*, 2018) y oomicetes (Meng *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2018), que implican riesgo para la producción agrícola (Reeser *et al.*, 2011).

Los oomicetes son un grupo de organismos fitopatógenos con alta capacidad patogénica y rango de hospedantes (Abad *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2020; Grijalba *et al.*, 2021). Su importancia radica en las pérdidas económicas y ambientales que han originado alrededor del mundo sobre ecosistemas naturales y artificiales (Martínez *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2021). La presencia de oomicetes fitopatógenos en agroecosistemas es extensa (Feng *et al.*, 2020; Jabiri *et al.*, 2021). Los géneros fitopatógenos que destacan son: *Phytophthora*, por parasitar encinos, ciprés, robles (Almaraz *et al.*, 2013), pinos, aguacates (Hansen, 2015), plantas ornamentales (Hong *et al.*, 2010), cítricos (Álvarez *et al.*, 2016), tomate (Meng *et al.*, 2014), chile, pepino (Granke *et al.*, 2011) y papa (Rekad *et al.*, 2016); *Pythium* por infectar cultivos como alfalfa (Díaz *et al.*, 2011), frijol (Zitnick *et al.*, 2015), maíz (Ochoa *et al.*, 2019), soya (Mathiensen *et al.*, 2016), tomate (Martínez *et al.*, 2015), chile (Morris *et al.*, 2016), pepino (Al sadi *et al.*, 2012), calabaza (Reyes *et al.*, 2018) y palma datilera (Velásquez *et al.*, 2018); así como el nuevo género *Phytopythium*, por infectar manglares (Bennet *et al.*, 2017), mandarina, begonias (Chen *et al.*, 2020), crisantemos, rosas (Marin *et al.*, 2019), kalanchos, frijol, soya (Rojas *et al.*, 2017), cítricos (Oviedo *et al.*, 2018), durians (Jabiri *et al.*, 2020), manzanas y peras (Thao *et al.*, 2020).

En México, la información que existe sobre oomicetes provenientes de agua de riego es escasa. En Sinaloa, actualmente existe sólo el reporte de Álvarez *et al.* (2016), quienes determinaron la presencia de *Phytophthora hydropathica* y *P. drechsleri* en guas de canales de riego agrícola de Culiacán.

1.1.1 Problema científico

La determinación de la diversidad de oomicetes fitopatógenos presentes en aguas de uso agrícola en el valle de Culiacán, Sinaloa, proporcionará información que sustente que el agua de riego debe ser un componente para considerar en la implementación del manejo integrado de enfermedades por los productores agrícolas. El limitado conocimiento sobre la diversidad de oomicetes fitopatógenos presentes en aguas de uso agrícola, su sensibilidad a fungicidas y plantas silvestres que los hospedan, contribuye al déficit productivo, ambiental y de salud pública de las prácticas agrícolas del valle de Culiacán, Sinaloa.

1.1.2 Hipótesis

Diversos oomicetes fitopatógenos se encuentran presentes en aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa y algunos de esos organismos presentan resistencia a fungicidas empleados para su control y se hospedan en plantas silvestres endémicas.

1.1.3 Objetivo general

Determinar la presencia de oomicetes fitopatógenos en aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa.

1.1.4 Objetivos específicos

1. Obtener aislamientos de oomicetes fitopatógenos en aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa.
2. Determinar la diversidad de géneros y especies de oomicetes fitopatógenos provenientes de aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa, mediante caracterización morfológica y secuenciación de ácidos nucleicos.

3. Conocer la severidad del daño que originan los géneros y especies de oomicetes fitopatógenos provenientes de aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa, en plantas de tomate, chile y pepino.
4. Conocer la susceptibilidad a metalaxil de oomicetes obtenidos de aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa.
5. Determinar la presencia de plantas silvestres hospedantes de oomicetes parásitos de tomate, chile y pepino, en construcciones de distribución de agua de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.

1.2 REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1 Los oomicetes

Los oomicetes, (mohos acuáticos, hongos huevo o pseudohongos) son un grupo de microorganismos eucariotas cuyas características morfológicas son similares a los hongos verdaderos (Richards *et al.*, 2006). Su linaje sigue bajo investigación y se relacionan con algunos protozoarios (Lara *et al.*, 2011; Bennet *et al.*, 2017), con estrecha relación con algas café y pardas (Matsiakh *et al.*, 2018). Este grupo de organismos alberga 74 géneros y alrededor 1000 especies parásitas de algas, moluscos, peces, animales, humanos y plantas (Judelson *et al.*, 2012; Kachour *et al.*, 2016). De los parásitos de plantas destacan por su importancia los géneros: *Peronospora*, *Pseudoperonospora*, *Plasmopara*, *Bremia*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Phytopythium* (De Cock *et al.*, 2015; Goncalves *et al.*, 2016; Benfradj *et al.*, 2017).

1.2.1.1 Descripción taxonómica

La taxonomía de los oomicetes es variable y su clasificación ha sido descrita por diferentes autores. La ubicación taxonómica más reciente es la siguiente:

Dominio: Eukarya

Reino: Protista-Stramenopila

Superfilo: Heterokonta

Filo: Pseudofungi

Clase: Oomycota (NCBI, 2022).

1.2.1.2 Características morfológicas

Los oomicetes desarrollan hifas cenocíticas (raramente aparecen septos sobre hifas senescentes) hialinas de 4 a 7 μm de diámetro, cuyas hifas poseen núcleos diploides o poliploides capaces de desarrollar haustorios y apresorios para alimentarse por absorción nutrimental (Afandi *et al.*, 2018); su pared celular está compuesta de por β -1,3 y β -1,6 glucanos, prolina y celulosa (compuestos que producen diferentes rutas de almacenamiento de polisacáridos, y así sintetizar metabólicamente lisina y esteroides) (Wang *et al.*, 2011). La fase reproductiva se efectúa de forma sexual y asexual. La fase sexual es comprendida por la formación de gametangios sexuales (oogonio=femenino y anteridio=masculino) que entran en contacto (contacto gametangial) y originan oosporas esféricas (estructura de resistencia de origen sexual) de 20 a 40 μm de diámetro (pueden ser lisas, rugosas, ornamentadas, pleróticas o apleróticas), capaces de sobrevivir por largos periodos en la materia orgánica o el suelo. La fase asexual es conformada por esporangióforos (base) y esporangios (cuerpos fructíferos) hialinos de 40 a 50 μm largo x 50 a 60 μm ancho (los esporangios pueden ser ovoides, irregulares, esféricos, con papila o desprovistos de papila), que internamente forman y liberan directa o indirectamente zoosporas nadadoras (esporas biflageladas). También se destaca la aparición de clamidosporas (estructuras de resistencia esféricas hialinas de origen asexual), hinchamientos irregulares y aglomeraciones de micelio, las cuales otorgan mayor estabilidad al patógeno a condiciones ambientales adversas

(Dick, 1972; Baten *et al.*, 2014). Las características sexuales y asexuales varían de género a género, inclusive entre especies (Yuzon *et al.*, 2020) (Figura 1.1).

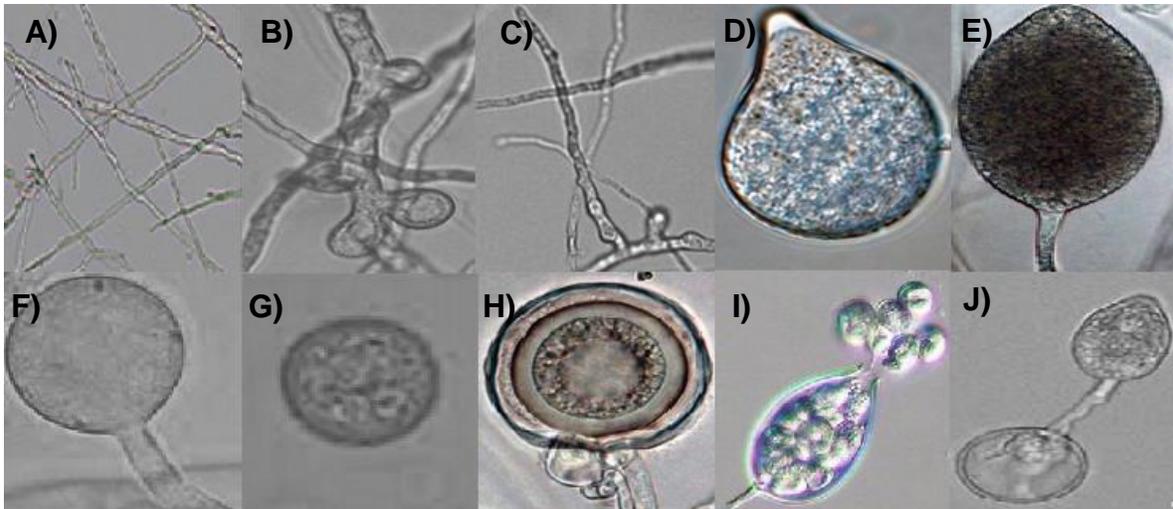


Figura 1.1. Características generales de los oomicetes. A) micelio cenocítico; B-F) ejemplos de esporangios; G) clamidospora; H) oospora; I) esporangio liberado zoosporas y J) oospora desarrollando esporangio.

1.2.1.3 Reproducción

La reproducción de los oomicetes tiene origen sexual y asexual. La reproducción sexual inicia con la producción y desarrollo de los gametangios (órganos sexuales de reproducción). Al gametangio femenino se le denomina oogonio, es de forma esférica y se desarrolla sobre los ápices hifales y ocasionalmente entre las hifas (intercalares), los cuales se delimitan del micelio mediante un septo grueso (Marano *et al.*, 2014). El anteridio es el gametangio masculino. Es de forma variable (esférico, oval, clavo o cilíndrico) y se desarrolla lateralmente o en la base del oogonio (Hunthriker *et al.*, 2019). Si el anteridio fertiliza al oogonio lateralmente es conocido como anteridio parágino y es anfígeno cuando el anteridio crece a través del oogonio y se desarrolla sobre la base del mismo (Fry *et al.*, 2009). La fecundación del oogonio por el anteridio se da mediante un tubo de fecundación (Stewart, 2011). Como resultado de la fecundación del oogonio se origina la oospora (espora de resistencia). La oospora es denominada oospora plerótica si desarrollada completamente llena la cavidad oogonial, por lo contrario, si la oospora desarrollada

sólo ocupa una porción de la cavidad del oogonio se denomina oospora aplerótica (Valencia, 2012; Baten *et al.*, 2014; Marano *et al.*, 2014). Durante la reproducción sexual, en algunas especies de oomicetes se distinguen por su tipo de apareamiento. Las especies homotáticas con gametangios (oogonios y anteridios) del mismo talo compatibles y las heterotáticas con gametangios auto incompatibles, es decir requieren de gametangios generados en talo diferente para la fecundación (Wen, 1988; Tomura *et al.*, 2016; Rekad *et al.*, 2017).

La reproducción asexual acontece al establecerse el patógeno en el hospedante, donde se desarrollan estructuras llamadas esporangióforos y esporangios. Estas estructuras son comunes en todas las especies de oomicetes. Los esporangióforos se forman sobre las hifas y dan origen a esporangios terminales que emergen al exterior del hospedante por medio de las estomas (Cheng *et al.*, 2019). En el interior de los esporangios se forman las zoosporas, mismas que son liberadas una vez que el esporangio madure (Zohara *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). En general los esporangióforos son hialinos y no se diferencian de las hifas (ocasionalmente pueden ser más anchos o delgados). Pueden desarrollarse individualmente (simpodio simple) o en aglomeraciones (simpodio compuesto) (Yuzon *et al.*, 2020).

Los esporangios suelen tener color amarillo tenue o hialinos y son variables en tamaño y forma. Se desarrollan esféricos, irregulares, ovoides (papilados, semipapilados o sin papila) y pueden ser caducos o no caducos (Tian *et al.*, 2016). Sobre la región papilar, se desarrolla un poro circular que promueve la liberación de 10 a 40 zoosporas (Granke *et al.*, 2010). Existen géneros que no emiten zoosporas, que germinan directamente emitiendo un tubo germinativo, comportándose como conidios (Fry *et al.*, 2019).

Las zoosporas son esporas que carecen de pared celular y poseen dos flagelos (Savory *et al.*, 2014). Existen dos tipos de zoosporas: las primarias de forma periforme y dos flagelos apicales, las cuales son consideradas más primitivas; y las secundarias, con aspecto reniforme con dos flagelos laterales, las cuales son

consideradas más evolucionadas (Sharma *et al.*, 2015). El flagelo anterior de las zoosporas es tipo pincel y el posterior tipo látigo. Ambos flagelos se unen en la región ventral o apical, y su función es promover motilidad a las zoosporas (Ridge *et al.*, 2013). Las zoosporas son capaces de nadar o moverse sobre en ambientes acuáticos, superficies de plantas, hojas y suelo por un largo periodo de tiempo. Posteriormente las zoosporas se fusionan con sus flagelos para formar una masa gelatinosa, enquistarse y adherirse a las superficies de sus hospedantes e iniciar el proceso de germinación y desarrollo de hifas infectivas. (Agris, 2005; Zhang *et al.*, 2012). Las zoosporas son las estructuras primarias causantes de nuevas infecciones en las raíces de las plantas y son capaces de desplazarse por largas distancias en aguas superficiales (Kong *et al.*, 2010; Galiana *et al.*, 2019).

Las clamidosporas son esporas asexuales multicelulares con paredes gruesas, esféricas y de color oscuro situadas sobre las hifas en posición terminal, individual o en cadena (Crone *et al.*, 2013). Constituyen un órgano de conservación y supervivencia a condiciones desfavorables. Las clamidosporas germinan emitiendo tubos germinativos generadores de hifas o tubos germinativos que producen esporangios con esporangióforos cortos (Rafiee *et al.*, 2013; Lacasa *et al.*, 2015).

Los hinchamientos hifales se desarrollan sobre el micelio, son amorfos y se presentan cualquier zona micelial. Son de carácter morfológico y su función es otorgar resistencia al micelio a condiciones adversas (Rafiee *et al.*, 2013; Lacasa *et al.*, 2015).

1.2.1.4 Ciclo de vida

Durante la fase epidemiológica, los oomicetes se dispersan al liberar oosporas, clamidosporas, esporangios y zoosporas, los cuales son acarreadas por agua y/o el viento (Meng *et al.*, 2014). Las estructuras de reproducción germinan de diferente forma. Las clamidosporas germinan directamente formando hifas y los esporangios proliferan de forma directa e indirecta con la liberación de zoosporas (Lamour *et al.*, 2012), la germinación se realiza dependiendo de las condiciones ambientales. Al

sucedir la germinación, las estructuras emiten tubos germinativos, los cuales desarrollan haustorios y apresorios para iniciar la penetración al hospedante. Posteriormente, sucede el crecimiento hifal inter-intracelular en la planta (Wang *et al.*, 2021). Después de aproximadamente 72 horas de alimentación del organismo, las hifas desarrollan nuevos esporangios para iniciar un nuevo proceso de diseminación e infección (Fawke *et al.*, 2015). Este proceso se repite en numerosas ocasiones, el organismo al detectar que las reservas de alimento se están agotando, empieza la fase de producción de oosporas y clamidosporas para garantizar su supervivencia (Blum *et al.*, 2010).

1.2.1.5 Distribución geográfica

El grupo oomicete agrupa organismos cosmopolitas y versátiles (Slater *et al.*, 2014). Los oomicetes poseen una gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y se encuentran dispersos alrededor del mundo colonizando ecosistemas terrestres y acuáticos (Ghimire *et al.*, 2011). La adaptación de los pseudohongos está demostrada, pues en diversos estudios se ha comprobado que esta clase de organismos colonizan ecosistemas extremos como la tundra y taiga; incluyendo los bosques, desiertos y océanos (Pais *et al.*, 2013; Bocco *et al.*, 2016).

1.2.1.6 Rango de hospedantes

Los oomicetes poseen la capacidad de infectar y causar estragos en la flora de los ecosistemas naturales y artificiales (Stassen *et al.*, 2011). Existe evidencia que estos organismos causan enfermedad y muerte en aproximadamente 5000 especies de árboles, flores y plantas (Álvarez *et al.*, 2016).

1.2.1.7 Síntomas

Los oomicetes poseen la capacidad de infectar plantas anuales, semiperennes y perennes. Algunos organismos solamente colonizan y debilitan a las plantas; otros infectan y causan la muerte de los cultivos. Estas especies infectan las raíces, tallos, hojas y frutos; los principales síntomas visuales son canchales, reducción de la lámina

foliar, amarillamiento en hojas, caída de hojas, engrosamiento de tallos y posterior marchitez. (Thines *et al.*, 2010).

1.2.1.8 Género *Phytophthora*

El significado de *Phytophthora* se deriva del vocablo griego “destructor de plantas”, cuyo grupo incluye a 313 especies patogénicas a diversas familias de plantas (McGowan *et al.*, 2020). Las características que destacan son micelio cenocítico, esporangióforos con crecimiento indeterminado, esporangios ovoides a limoniformes provistos o desprovistos de papilas, desarrollados sobre simpodio simple o compuesto, que internamente producen y liberan zoosporas biflageladas (Reeser *et al.*, 2011). La proliferación de los esporangios acontece de forma interna y externa, de manera cíclica o individual. Sobre el micelio se desenvuelven hinchamientos y clamidosporas. Los hinchamientos son amorfos con variabilidad en sus dimensiones y no se diferencian del micelio, localizados de modo inicial, intercalar o terminal (Barboza *et al.*, 2020). Las clamidosporas son esféricas y son fácil de confundirse con hinchamientos; pero la gran diferencia es que estas reorganizan su contenido citoplasmático, desarrollando dos muros celulares que delimitan sus septos (Abad *et al.*, 2011). La reproducción sexual acontece al entrelazarse oogonios y anteridios anfígenos o paraginos, cuyo resultado origina oosporas individuales. Normalmente se presenta un anteridio por oogonio. Las oosporas son esféricas, hialinas, pleróticas o appleróticas colocados de modo intercalar o terminal. Existen especies de *Phytophthora* homotáticas, heterotáticas (A1-A2) y estériles (A0) (Bi *et al.*, 2014; Danies *et al.*, 2014; Kiiker *et al.*, 2018). Todas las especies de *Phytophthora* son patogénicas y algunas poseen la capacidad de infectar hasta 5000 especies de plantas. *Phytophthora* ha causado grandes estragos en la agricultura; algunas especies han causado pérdidas económicas de 2000 MDD en los cultivos de soya y alfalfa (Álvarez *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2019), otras han ocasionado la pérdida de 200 000 ha de bosques en Australia (Nessbit *et al.*, 1979; Almaraz *et al.*, 2013; Álvarez *et al.*, 2016) y algunas son conocidas por ocasionar pérdidas de hasta 100% en la producción de solanáceas y cucurbitáceas (Quesada *et al.*, 2011; Drenth, 2013).

El tizón tardío es una enfermedad de origen histórico y económicamente la enfermedad más devastadora en los cultivos de papa y tomate, cuyo agente causal es *Phytophthora infestans* (Duarte *et al.*, 2018). La enfermedad se detectó por primera vez en 1843, en los puertos de Nueva York y Filadelfia. Dos años después, se informó que la enfermedad se extendió por Bélgica y después por toda Europa, incluyendo a Irlanda (Gachomo *et al.*, 2012), donde causó la pérdida de miles de hectáreas cultivadas con papa (Arora *et al.*, 2014). La pérdida de tubérculos originó el desabasto de alimento, como consecuencia los pobladores irlandeses empezaron a morir de hambre. Durante esta etapa, aproximadamente un millón de pobladores perdieron la vida. El evento fue catastrófico y es conocido como “la gran hambruna de Irlanda” (Tsedaley, 2014). El tizón tardío causa pérdidas anuales de 7.2 MMD, incluyendo los costos de inversión para su control (Martin *et al.*, 2013).

1.2.1.9 Género *Pythium*

El género *Pythium* incluye 355 especies parásitas inestables morfológicamente, lo cual dificulta su identificación solamente con el estudio de sus cuerpos fructíferos, incluso para los fitopatólogos expertos (Uzuhashi *et al.*, 2010). Las principales características morfológicas son micelio cenocítico, esporangios amorfos, globosos, subglobosos y ovoides (Uzuhashi *et al.*, 2015). En la región micelial se desarrollan estructuras como esporangios, hinchamientos, clamidosporas y oosporas. *Pythium* al desarrollar sus esporangios, internamente crea protoplasma nuclear, un tubo excretor y una vesícula externa, con el propósito de transferir el protoplasma hacia la vesícula. Una vez que el protoplasma se encuentra en el núcleo vesicular, se desarrollan y se diferencian zoosporas biflageladas. La vesícula al madurar, se fragmenta para iniciar el proceso de liberación de zoosporas. Este proceso es la principal característica diferencial entre los géneros *Phytophthora* y *Pythium* (Al-Sheikh, 2010; Kageyama, 2014). Los hinchamientos amorfos son capaces de germinar para originar nuevas hifas. Las clamidosporas esféricas son muy raras de observar. La reproducción sexual se compone de oogonios y anteridios. Los oogonios son variables en su forma y tamaño. Su localización es terminal o intercalar, diferenciados de las hifas por un muro oogonial grueso. Los anteridios

son sésiles e intercalados, y son monoclinos o paraginos. Las oosporas se desarrollan en grupos o individuales, y pueden ser pleróticas o appleróticas (Bala *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2017; Fatemeh *et al.*, 2019).

La mayoría de las especies de *Pythium* son homotáticas, excepto *P. catenulatum*, *P. heterotallicum*, *P. intermedium*, *P. macrosporum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum* y *P. flevoense* (Ho, 2018). *Pythium* posee numerosas especies fitopatógenas y han causado grandes estragos en la agricultura, por ejemplo: *P. aphanidermatum* causa pérdidas en la producción de tomate (Al sadi *et al.*, 2012), chile (Jankowiak *et al.*, 2015), pepino y calabaza (Dickie *et al.*, 2017).

1.2.1.10 Género *Phytopythium*

Phytopythium es un género novedoso, cuyas especies estuvieron agrupadas en *Pythium* (Bennett *et al.*, 2017). *Phytopythium* posee similitud morfológica con los géneros *Pythium* y *Phytophthora* (Bora *et al.*, 2017). Sus principales características son su micelio cenocítico, clamidosporas, hinchamientos, oosporas, esporangios ovoides, globosos y papilados (excepto *P. vexans* cuya papila solo puede ser observada en esporangios maduros). La proliferación esporangial ocurre tipo *Phytophthora*, pero la diferenciación de zoosporas es tipo *Pythium* (se desarrolla un tubo y vesícula externa) (Rodríguez *et al.*, 2018; Abdelzaher *et al.*, 2020). Durante la fase sexual se desarrollan oogonios largos-globosos de uno a dos anteridios paraginos colocados lateralmente al oogonio. Las oosporas son de pared gruesa, hialinas y lisas (Thao *et al.*, 2020; Tkaczyk, 2020). Todas las especies de *Phytopythium* son patogénicas y causan pérdidas en tomate (Bennet *et al.*, 2017), manglares (Marin *et al.*, 2018), cítricos (Chen *et al.*, 2016) y bosques (Hansen, 2015; Lehtijarvi *et al.*, 2017; Jabiri *et al.*, 2021).

1.2.2 Importancia del estudio e identificación de oomicetes

Este grupo de organismos es de los más estudiados debido a su taxonomía, genética y capacidad adaptativa (Kerio *et al.*, 2019). Su origen acuático podría catalogarlos como un grupo primitivo. La evolución de esta clase de microorganismos ha dependido de su contenido genómico y la habilidad de este para generar nuevo contenido (Lin *et al.*, 2020). El conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones de los oomicetes fitopatógenos es de absoluta importancia (Pais *et al.*, 2013). Existen organismos clones de las mismas especies que comparten más del 95% de su genoma, pero existen diferencias entre ellas, lo cual constituye una diversidad inter e intraespecífica (Ah-Fong *et al.*, 2017). Debido a la diversidad genética surge la necesidad de implementar nuevos métodos de control e identificación de patógenos; pues el uso incorrecto de materias sintéticas o su uso indiscriminado ha ocasionado la aparición de cepas resistentes; además de causar grandes impactos en la salud humana y en el ambiente (Ramadan *et al.*, 2018; Gómez *et al.*, 2021). Existe una cantidad de estudios para entender los cambios que ocurren en las poblaciones de hongos fitopatógenos (Del Castillo *et al.*, 2013). El conocimiento sobre los cambios que ocurren dentro y entre las poblaciones del patógeno tiene importantes aplicaciones, como predecir con qué rapidez puede evolucionar el hongo en un tiempo determinado (Chaloner *et al.*, 2020). La extracción del ADN, pruebas por PCR, microsatélites y marcadores moleculares son técnicas novedosas de la biología molecular (Zammouri *et al.*, 2018). Estas tecnologías permiten la identificación de patógenos, conocer la estructura genética de las poblaciones, estudiar los cambios y predecir la evolución poblacional en un tiempo determinado (Stewart *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Años atrás la identificación de patógenos se realizaba solo con estudios morfométricos, pero debido a la similitud entre las estructuras reproductiva generaban resultados erróneos (Ristaino *et al.*, 1998). Actualmente los fitopatólogos utilizan las pruebas morfométricas y han adoptado el uso de las técnicas biotecnológicas para realizar una correcta identificación de patógenos en menor tiempo (Kox *et al.*, 2007). Las pruebas por PCR utilizan cebadores específicos para cada organismo. El contenido genómico de las células eucariotas se sitúa en el núcleo. La región del ADN

mitocondrial y nuclear tienen mayor interés en estudios filogenéticos para la taxonomía de hongos (Sanzani *et al.*, 2014). Las secuencias génicas están separadas por espaciadores internos transcritos (ITS). Las secuencias ITS son las más utilizadas, pues amplifican regiones muy conservadas de los hongos (Ramírez *et al.*, 2021). En conjunto con las ITS se conocen otros cebadores, como la beta-tubulina, orotidina-descarboxilasa, quitina-sintetasa, actina, factor de elongación, citocromo-oxidasa (COX), y ubiquinona oxidoreductasa (NADH) (Shchena *et al.*, 2008; Legeay *et al.*, 2019). Estos cebadores se utilizan en conjunto para la amplificación e identificación de organismos y conocer la diversidad inter e intraespecífica. Una vez amplificada estas regiones, se secuencian y se comparan en bases de datos a nivel mundial (Kroon *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2006; Kammarnjesadakul *et al.*, 2011).

1.2.3 Importancia de la biotecnología para el conocimiento de los oomicetes

Históricamente los oomicetes eran conocidos como hongos, pero debido a sus características morfológicas, cuerpos fructíferos y composición química, fueron separados y actualmente son conocidos como pseudohongos (Abad *et al.*, 2011). La biotecnología y sus técnicas novedosas de ácidos nucleicos, han revolucionado la manera de identificar patógenos, pero actualmente en el caso de los oomicetes, diversas pruebas y resultados contundentes, han determinado a un nivel tan profundo que diversos géneros y especies previamente establecidas, han sido separadas en clados, incluso hasta el descubrimiento y consignación de nuevos géneros y especies (Trzewik *et al.*, 2016). *Phytophthora* históricamente es uno de los organismos más estudiados, y morfológicamente es muy parecido a *Pythium*, pero gracias a los estudios filogenéticos se puede concretar que *Phytophthora* está más relacionado con los mildiús (Abad *et al.*, 2008). A continuación, se muestra un estudio filogenético sobre las especies de *Phytophthora*, cuyas especies están separadas en 10 clados diferentes de acuerdo con su composición genética (Figura 1.2).

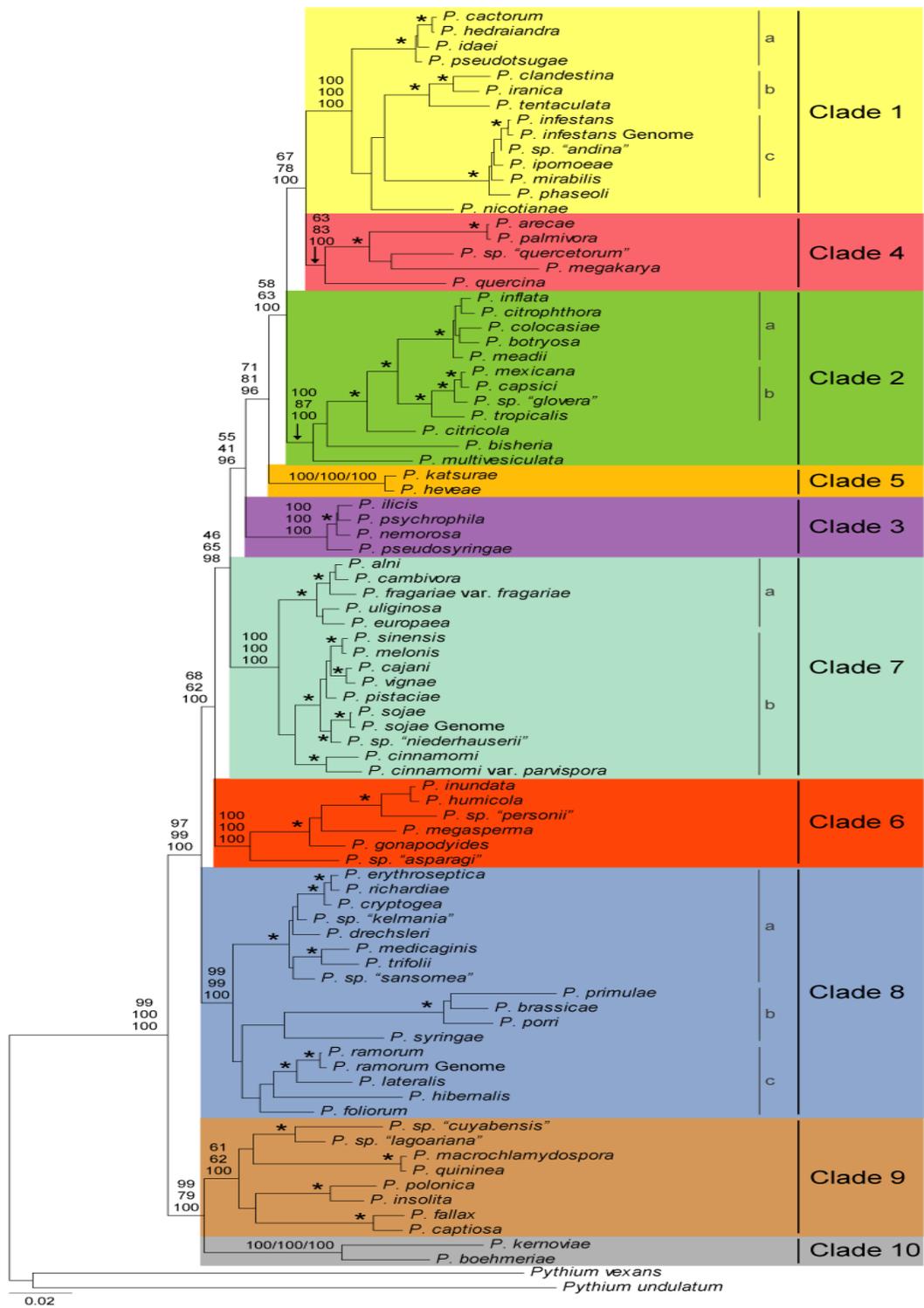


Figura 1.2. Clados de las especies de *Phytophthora*. Se observan 10 clados diferentes, las cuales contienen algunas especies más estudiadas de *Phytophthora* (Abad *et al.*, 2012).

Otro patógeno muy estudiado es *Pythium*, este patógeno posee características morfológicas muy similares a *Phytophthora*. Diferentes estudios nucleicos al género *Pythium*, originó la separación de algunas especies y la creación de un nuevo género conocido como *Phytopythium*, el cual es un género que posee características morfométricas entre *Phytophthora* y *Pythium*. Las especies separadas de *Pythium* ahora están presentes en el género *Phytopythium* (Ho, 2018).

1.2.4 Importancia del agua como fuente de inóculo y dispersión

Nuestro planeta está cubierto con el 70% de agua y los seres vivos que lo habitamos estamos compuestos del 80% de este vital líquido (Fernández, 2012). Este líquido es tan esencial que interviene en los procesos metabólicos y funcionales de estos seres (Carbajal *et al.*, 2012). Los humanos utilizan este vital líquido para numerosos procesos como beberla, la industria, ganadería, acuicultura y agricultura (Monforte *et al.*, 2009). Las plantas necesitan agua para la absorción de nutrientes del suelo y realizar la fotosíntesis (Medrano *et al.*, 2007). Además, sirve como hábitat para una gran variedad de organismos.

Cuando el agua no se encuentra disponible en el suelo por medio de fuentes naturales, se hace necesidad del riego. La irrigación es el suministro artificial de agua utilizado en el desarrollo de las plantas en la agricultura (Espinosa *et al.*, 2016). Diversos investigadores han demostrado que el agua de riego no solo es importante para producción agrícola, sino también es el principal agente dispersor de patógenos de plantas. Los organismos con mayor recurrencia en agua de riego son los oomicetes, debido a que son habitantes naturales de ambientes acuáticos (Hong *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2016; Aram *et al.*, 2018; Marciulynas *et al.*, 2020). Durante las lluvias, sucede el arrastre de tierra y plantas infectadas con esta clase de organismos; los cuales caen sobre las presas, ríos, canales, estanques; entre otros. Estos organismos son capaces de sobrevivir por largos periodos suspendidos en el agua o algunos hospedantes. El agricultor, al utilizar agua contaminada en sus cultivos, directamente añaden agua con la presencia de

patógenos y así empezar el ciclo de la enfermedad en las plantas (Cline *et al.*, 2008; Loyd *et al.*, 2014; Zappia *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Redekar *et al.*, 2019).

1.2.5 El distrito de riego 010 Culiacán-Humaya

Los distritos de riego en México y en el mundo tienen como objetivo administrar el uso y distribución del agua a través de la infraestructura hídrica en las regiones; cuya agua de riego es distribuida hacia los productores agrícolas a través de la Asociación de Usuarios del Agua (A.U.A) y la Asociación de Usuarios Productores Agrícolas (A.U.P.A). El estado de Sinaloa posee la mayor superficie agrícola regable del país y las actividades agrarias destacan en la región (Aguilar *et al.*, 2011). En el año de 1952, en Sinaloa, se creó el distrito de riego 010 Culiacán-Humaya (DR010 CLN-Humaya) para distribuir el agua y regar aproximadamente 769,000 ha (sistema Rosales: I-1 La palma, I-2 Bachimeto y I-3 Otameto; sistema Culiacán: II-1 Panac 7, II-2 Produagra y II-3 El grande; y sistema Humaya: IV-1 Culiacancito, IV-2 El Tamarindo, IV-3 La Guamuchilera, IV-4 Montelargo, V-1 Chinitos y V-2 Norte valle de Angostura) (Ramírez *et al.*, 2021). El DR010 CLN-Humaya obtiene precipitaciones pluviales anuales de 928.2 mm (SIAP, 2020) y abarca los municipios de Culiacán, Navolato, Mocorito, Angostura y Salvador Alvarado con una superficie de 2089 km² y beneficia a 18 688 usuarios (Moreno *et al.*, 2018). El DR010 forma parte del sistema hidráulico de los ríos Humaya, Culiacán y Tamazula; y se abastece principalmente de las presas Sanalona y Adolfo López Mateos, cuya capacidad de las presas es de 1 963 562 millones de m³ (Norzagaray *et al.*, 2010; Aispuro *et al.*, 2013; Quevedo *et al.*, 2016, CONAGUA, 2018; Montiel *et al.*, 2021). El DR010 CLN-Humaya se encuentra interconectado con los DR074 Mocorito y DR109 San Lorenzo, cuyos distritos de riego se abastecen de las presas José López Portillo y Eustaquio Buelna (Figura 1.3).

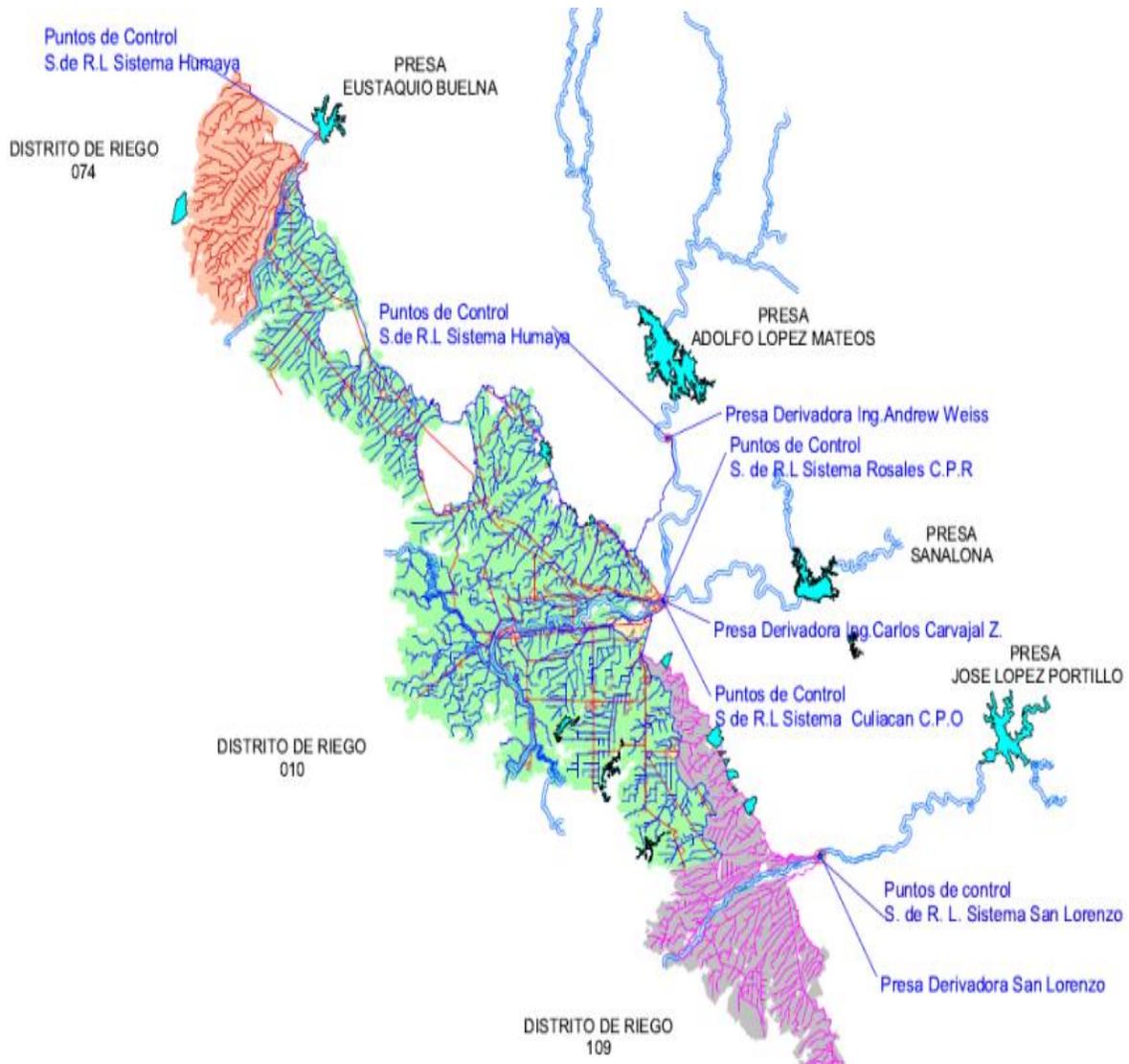


Figura 1.3. Fotografía satelital del DR010 CLN-Humaya, DR074 Mocorito y DR109 San Lorenzo (fotografía otorgada por la Comisión Nacional del Agua, CONAGUA).

En el DR010 CLN-Humaya cada año otorga un volumen de 1917.40 millones de m³ para riegos agrícolas, el equivalente a una lámina superficial de 98 cm/ha (CONAGUA, 2018). A continuación, la siguiente Figura 1.4 muestra el promedio de 15 años del uso y distribución del agua para uso agrícola en el DR010 CLN-Humaya.

Volumen Distribuido y Superficie Física Regada (ha) en el Distrito de Riego 010 Culiacán-Humaya, Sinaloa

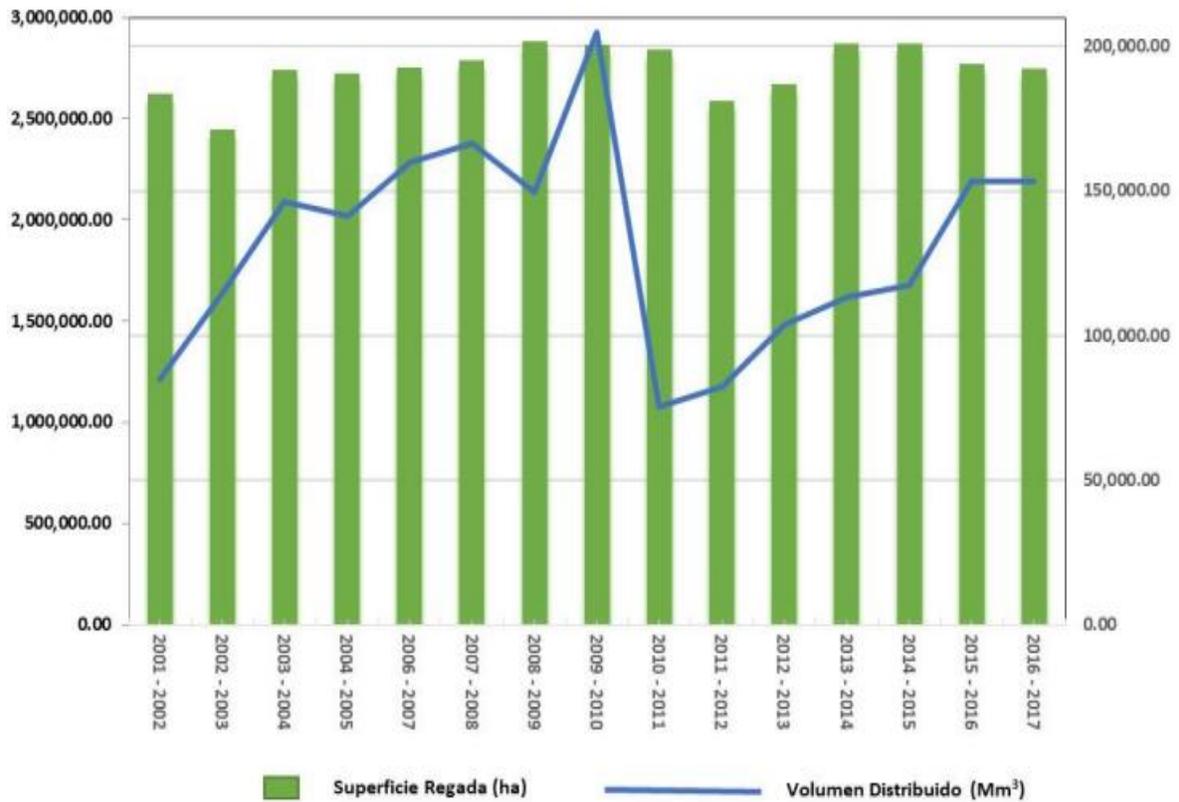


Figura 1.4. Uso y distribución del agua de riego en el DR010 CLN-Humaya (gráfico proporcionado por la CONAGUA, 2019).

CAPÍTULO II. ESPECIES DE *Phytophthora* ASOCIADAS A AGUA DE IRRIGACIÓN EN EL VALLE DE CULIACÁN¹

2.1 INTRODUCCIÓN

Los organismos del género *Phytophthora*, pertenecen al reino Chromista o Stramenopila, son habitantes de ambientes acuáticos y terrestres, con alta capacidad de reproducción, diseminación y supervivencia, particularidades que facilita su establecimiento en campos de explotación agrícola o forestal (Erwin y Ribeiro, 1996; Chen *et al.*, 2017, Hon, 2018; Judelson *et al.*, 2019). En ese género, se incluyen especies con amplio rango de hospedantes como *P. cinnamomi* que es capaz de parasitar alrededor de 5000 especies de plantas (Hardham *et al.*, 2018) y *P. capsici*, conocida por originar pérdidas económicas en plantaciones de solanáceas y cucurbitáceas cultivadas alrededor del mundo (Vega *et al.*, 2017).

Alrededor de 30 especies de *Phytophthora* fueron colectadas en cuerpos de agua como estanques, ríos, canales, reservorios y cultivos hidropónicos (Aram y Rizo, 2018). Además, el género *Phytophthora*, al igual que otros oomicetes fitopatógenos, requiere estrictamente de agua para su reproducción, la cual inicia con la formación de esporangióforos y esporangios, dentro de los cuales se forman las zoosporas para su posterior liberación y diseminación; dichas zoosporas, son capaces de infectar plantas susceptibles e iniciar el ciclo de una enfermedad (Kang *et al.*, 2017).

Las zoosporas son el propágulo infeccioso diseminado por agua libre, por ello, es posible recuperarlas con regularidad de aguas superficiales (Hon, 2018). Algunos ejemplos de especies aisladas de agua con frecuencia son: *P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. citricola*, *P. gonapodyides*, *P. cambivora*, *P. hydropathica* y *P. drechsleri*, entre otras (Lloyd, 2014; Redekar y Park, 2018; Ristvey *et al.*, 2019). En México, existen alrededor de 17 especies pertenecientes al género *Phytophthora*

¹ Artículo científico publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (ISSN: 2007-9230).12(3): 473-494. 2021. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2619>.

reportadas como parásitos de plantas de importancia agrícola, las más comunes son: *P. capsici*, *P. infestans* y *P. cinnamomi*; sin embargo, es escasa la información sobre la atribución del agua superficial como fuente de inóculo y dispersión de organismos del género *Phytophthora*.

Así, Álvarez *et al.* (2016) lograron aislar e identificar las especies *P. hydropathica* y *P. drechsleri* de distintos canales de agua de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa, México. Por otro lado, comúnmente la identificación de géneros y especies de oomicetes está basada en sus características morfológicas y culturales; sin embargo, fueron frecuentes las identificaciones erróneas, debido a que algunas especies comparten dichas características. Actualmente, esas prácticas son complementadas mediante técnicas biotecnológicas basadas en la extracción y secuenciación de ácidos nucleicos, lo cual permite la identificación de organismos de forma eficaz y concreta (Trzewik *et al.*, 2016).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la incidencia de especies del género *Phytophthora* en aguas superficiales de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa y determinar su potencial patogénico en plantas cultivadas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Obtención, purificación y conservación de aislamientos *Phytophthora* spp.

Dispuesto el mapa de ubicación de presas, diques, estanques, ríos y canales de almacenamiento y distribución del agua empleada en actividades agropecuarias, de la zona de influencia del distrito de riego número 010 del valle de Culiacán, Sinaloa, otorgado por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) (Figura 2.1), fueron seleccionados al azar 37 sitios de muestreo en 28 localidades (Cuadro 2.1).



Figura 2.1. Principales sitios de muestreo en el municipio de Culiacán, Sinaloa. (Imagen proporcionada por la CONAGUA).

Cuadro 2.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para la obtención de aislamientos de *Phytophthora* spp., Culiacán, Sinaloa, 2018-2019.

Localidad	Coordenadas del sitio de muestreo	Aislamiento
Presa Adolfo López Mateos	25°10'08" N 107°26'10" W 25°09'10" N 107°26'11" W 25°09'56" N 107°26'30" W	PV1, PV2, PV3, PV4, PV5, PV6, PV7, PV8, PV9, PV10, PV11 y PV12
La Presita	24°55'49" N 107°25'39" W	PR13, PR14, PR15 y PR16
Empaque Castro	24°55'28" N 107°31'59" W	EC17, EC18, EC19 y EC20
El Tamarindo	24°55'07" N 107°33'32" W 24°55'11" N 107°32'57" W	TR21, TR22, TR23 y TR24
Empaque Valle del sol	24°53'20" N 107°29'17" W	EVS25, EVS26, EVS27 y EVS28
Presa Sanalona	24°48'37" N 107°08'11" W 24°48'46" N 107°08'14" W 24°48'49" N 107°08'30" W	PS33, PS34, PS35, PS36, PS37, PS38, PS39, PS40, PS41, PS2, PS43
Río Tamazula	24°49'00" N 107°11'16" W 24°48'53" N 107°21'29" W	RT44, RT45, RT46, RT47, RT48 y RT49
Río Humaya	24°51'48" N 107°24'25" W	RH50, RH51, RH52, RH53, RH54 y RH55
Jardín Botánico	24°49'23" N 107°23'06" W 24°49'24" N 107°23'04" W	JB56, JB57, JB58, JB59, JB60 y JB61
Imala	24°51'21" N 107°13'11" W	IMA62, IMA63, IMA64 y IMA65
Tres Ríos	24°48'43" N 107°24'24" W 24°48'24" N 107°24'33" W	3R66, 3R67, 3R68, 3R69, 3R70 y 3R71
Bellavista	24°48'45" N 107°27'56" W	BELL74 y BELL75
Bachigualato	24°46'59" N 107°26'48" W	BACH76 y BACH77
Aguaruto	24°47'49" N 107°30'24" W	AGUA78 y AGUA79
Campo Batan	24°46'10" N 107°30'19" W	CB80 y CB81
Campo Moroleón	24°41'14" N 107°31'09" W	CM82 y CM83
Campo Cardenal	24°45'10" N 107°28'39" W	CC84 y CC85
Dique Primavera	24°43'48" N 107°24'10" W	DP86 y DP87
Estación Hazera	24°43'32" N 107°27'24" W	HAZ88 y HAZ89
Estación Enza Zaden	24°40'58" N 107°28'47" W	EZ90 y EZ91
Estación Monsanto	24°40'37" N 107°28'50" W	MON92 y MON93
Campo Divemex	24°39'46" N 107°26'58" W	DIV94 y DIV95
Estación Agriseeds	24°38'11" N 107°26'38" W	US96 y US97
Estación Syngenta	24°37'08" N 107°26'41" W	SYN98 y SYN99
Estación Rijk Zwaan	24°36'12" N 107°26'41" W	RZ100 y RZ101
Estación Bayer	24°36'14" N 107°27'22" W	BAY102 y BAY103
Dique Costa Rica	24°35'44" N 107°18'33" W	CR104 y CR105

El periodo de muestreo comprendido de septiembre de 2018 a enero de 2019, por sitio de muestreo se colocó una trampa elaborada con bolsa tipo red de polipropileno, cerrada de la parte anterior con una cuerda del mismo material, conjuntamente, esa cuerda se utilizó para fijar la trampa en algún punto del talud (Figura 2.2).



Figura 2.2. Material utilizado para la colecta de aislamientos. (A) Trampa flotante para muestreo de peras y (B) peras infectadas recuperadas de las trampas.

Esas trampas, en su interior contenían dos frutos de pera libres de lesiones, lavados con agua simple y desinfectados superficialmente con etanol de 96% (Soto *et al.*, 2017). Las trampas permanecieron 48 h en suspensión, posteriormente se colectaron y se transportaron al laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Los frutos con lesiones evidentes fueron lavados con agua destilada estéril, secados con papel estroza estéril y desinfectados con etanol de 96%.

Los aislamientos se realizaron a partir de cortes de 1 cm² tomados de las lesiones cafés en los frutos (Figura 2.2) y cada cinco fragmentos fueron colocados de forma equidistante en cajas de Petri que contenían medio de cultivo selectivo elaborado con harina de maíz-agar (HMA, 17 g·L⁻¹), penicilina (10 µg·L⁻¹), ampicilina (200 µg·L⁻¹), rifampicina (10 µg·L⁻¹), pentacloronitrobenceno (PCNB, 25 µg·L⁻¹) (PARP) (Jeffers, 2006; Soto *et al.*, 2017).

Las cajas de Petri se dejaron dos días a temperatura ambiente (26 ±2 °C). Con la finalidad de purificar y conservar cepas individuales a partir de las colonias desarrolladas del tejido enfermo, se transfirió a medio de cultivo HMA mediante la técnica de punta de hifa, colocadas 48 h a temperatura ambiente. Una vez

desarrolladas las colonias, con sacabocado se tomó individualmente de cada aislamiento cinco trozos de 0.5 cm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial para posteriormente colocarlos en tubos microviales (5 mL) que contenían agua destilada estéril y se conservaron a 15 °C para posteriores estudios (Jeffers, 2006; Abad *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2017).

2.2.2 Características morfológicas y culturales

Para realizar la caracterización morfológica de los organismos, de las cepas conservadas en tubos microviales se tomó individualmente fragmentos de micelio que fueron sembrados en medio de cultivo que contenía agua destilada (800 mL), jugo V8 (200 mL), CaCO₃ (2 g) y agar (15 g) (V8A), con la finalidad de inducir el crecimiento y reproducción del patógeno. Las cajas de Petri permanecieron 72 h a temperatura ambiente, posteriormente, con sacabocado se tomó de cada aislamiento cinco fragmentos de 0.5 cm de diámetro que fueron colocados en cajas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían agua destilada y extracto acuoso de suelo que sirvió para la inducción a la formación de esporangios.

Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 72 h (Martin *et al.*, 2004; Jeffers, 2006; Soto *et al.*, 2017) con el propósito de inducir otras estructuras morfológicas como: clamidosporas, hinchamientos hifales, anteridios, oogonios y oosporas. De las cepas conservadas en tubos microviales se tomaron individualmente fragmentos de micelio que fueron sembrados en cajas de Petri que contenían medio de cultivo V8A clarificado (jugo V8 sometido a 4000 rpm durante 20 min, V8AC) y puestas durante 21 días bajo condiciones de temperatura ambiente y oscuridad.

Se determinó el tipo de compatibilidad sexual reproductiva, para lo cual cada aislamiento se confrontó con linajes de referencia de *P. capsici* y *P. drechsleri* con afinidad A1/A2 (organismos proporcionados del cepario de hongos fitopatógenos de la Universidad Autónoma de Occidente, Campus Los Mochis, Sinaloa). Todas las cepas conservadas fueron confrontadas en medio de cultivo V8AC, para lo cual se

sembró un cilindro de 0.5 cm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial en un extremo de la caja y en el extremo opuesto se colocó individualmente un cilindro de la cepa A1 o A2, para después mantenerlas a temperatura ambiente y oscuridad durante 21 días (Jeffers, 2006; Abad *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2017). La caracterización morfológica de aislamientos se realizó mediante la observación de las estructuras desarrolladas con microscopio óptico (Leica DM100 con medidor ocular) y comparación con una clave pictórica de especies del género *Phytophthora* (Abad *et al.*, 2012).

2.2.3 Identificación molecular

2.2.3.1 Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB), que consiste en una serie de pasos presentados a continuación. Se colectaron 100 a 200 mg de micelio desarrollado sobre medio papa dextrosa agar (39 g·L⁻¹, PDA). El micelio se colocó sobre morteros individuales, se añadió nitrógeno líquido a cada muestra y se trituraron con un pistilo hasta obtener un polvo fino.

El polvo se transfirió individualmente a tubos Eppendorf de 2 mL sostenidos en congelación y se añadió 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, TRISH-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 mM, β-mercaptoetanol 2%). Los tubos se colocaron en un agitador tipo vortex durante un minuto. Luego los tubos se insertaron en una centrifuga a 12 000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se transfirió individualmente a nuevos tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 1 mL de solución cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), se mezcló el contenido de los tubos con la fase recuperada.

Se colocaron las muestras en vortex por 10 min. Se realizó una segunda recuperación de fase acuosa y una segunda transferencia a nuevos tubos Eppendorf. Se añadió acetato de sodio 3M con 1 mL de alcohol isopropílico con valor 1/10 del volumen recuperado y se almacenaron los tubos a -20 °C por 20 min

(los tubos pueden ser almacenados hasta por 24 h para maximizar la obtención de ADN). Se centrifugaron los tubos a 12 000 rpm por 15 min, posteriormente se decantaron sin desperdiciar el contenido de ADN precipitado. Se añadió 1 mL de etanol individualmente y se centrifugaron las muestras por 3 min. Se extrajo el sobrenadante sin tocar la fase sólida, se colocaron los tubos con la fase solida a temperatura ambiente para la evaporación de líquidos.

El ADN fue disuelto en 50 µL de buffer TE. Las características del ADN se cuantificaron con Nanodrop 8000 a 260 nM, la calidad se estimó con las proporciones 280/260, la integridad se visualizó en una cámara de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con una solución amortiguadora de 1X TAE.

2.2.3.2 Amplificación, purificación y secuenciación del ADN

La mezcla de reacción consistió en 1 µL de ADN (50 ng µL⁻¹), 0.5 µL de dntp's, 0.25 de Taq ADN polimerasa, 2.5 µL de buffer, 0.625 µL de cada cebador, 20.175 µL de agua en un volumen total de reacción de 25 µL. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador (Bio Rad T100). La secuencia del termociclador fue la siguiente: una inicial desnaturalización a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s (60 s para COX y NADH), alineamiento por 30 s y extensión a 72 °C por 60 s, la extensión final a 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento fue de 52°C para COX, 53 °C para NADH y 62 °C para ITS (Cuadro 2.2), cuya amplificación exitosa fue confirmada por el gel de electroforesis.

Cuadro 2.2. Cebadores utilizados para la amplificación de ADN de *Phytophthora* spp. (Kroon *et al.*, 2004).

Cebador	Secuencia del cebador	Tamaño (pb)
ITS4C0569/ITS6C0	TCCTCCGCTTATTGATATGC/GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	930
COXF4N/COXR4N	GTATTTCTTCTTTATTAGGTG/CGTGAAGTAATGTTACATATAC	972
NADHF1/NADHR1	CTGTGGCTTATTTTACTTTAG/CAGCAGTATACAAAAGCAAC	897

Los productos de PCR se purificaron mediante el kit wizard SV Gel and PCR CleanUp System (Promega, USA). Ambas cadenas del amplicón se secuenciaron en las instalaciones de Macrogen, Korea. Los resultados de los aislamientos se analizaron por Blast comparando secuencias de aislamientos depositadas en la base de datos especializada de Phytophthora (www.phytophthoradb.org, www.phytophthora-ID.org) y en NCBI (www.NCBI.com) para determinar el porcentaje de similitud.

2.2.4 Pruebas de patogenicidad

2.2.4.1 Obtención de plántulas

Con la finalidad de comprobar la patogenicidad de cada uno de los aislamientos, se produjeron plántulas de tomate saladette (cv SV-3543), chile bell (cv Caravaggio) y pepino tipo slicer (cv Luxell). Las semillas de cada especie se sembraron individualmente en charolas de poliestireno con 256 cavidades rellenas con sustrato peat moss humedecido (Berger), una vez sembradas, las charolas permanecieron en condiciones de invernadero.

Siete días después de la emergencia de plántulas, fueron trasplantadas en macetas de plástico que contenían 2 kg de sustrato peat moss y se fertirregaron cada tres días a concentración de 1 mL·L⁻¹ de Maxigrow (composición porcentual g·L⁻¹: extractos orgánicos 112, auxinas 0.09, giberelinas 0.1, citoquininas 1.5, nitrógeno 6.6, fósforo 13.3, potasio 13.3, calcio 2, magnesio 4, hierro 17.2, zinc 26.5, manganeso 13.3 y cobre 13.3).

2.2.4.2 Pruebas de patogenicidad en plantas

Para la inoculación de las plántulas cada aislamiento se transfirió a cajas de Petri con medio PARP y se incubaron por 10 días, posteriormente, de cada aislamiento se tomaron cortes de 1 cm² de medio de cultivo con crecimiento micelial y se colocó individualmente sobre los tallos de las plantas al ras del sustrato (25 días después del trasplante), inmediatamente se cubrió el inóculo con sustrato; cinco días después de la inoculación, los riegos fueron más abundantes para favorecer la

infección. Se determinó la patogenicidad de los aislamientos mediante observación diaria en un periodo de 20 días.

2.2.4.3 Pruebas de patogenicidad en frutos

Frutos de tomate, chile y pepino con madurez comercial (libres de lesiones superficiales), lavados con agua destilada estéril y desinfectados con etanol de 70%, se inocularon y se colocaron dentro de cámaras húmedas en recipientes plásticos, se inocularon con cortes de 1 cm² de medio de cultivo PARP con 10 días de crecimiento y se les añadió agua destilada estéril para a crear un ambiente favorable al organismo.

Tres días después de la inoculación, la severidad de la enfermedad se determinó en base a la medición de la superficie dañada (cm²) por el patógeno. En las pruebas de patogenicidad de plantas y frutos se utilizaron cuatro repeticiones y su respectivo control (sin inoculación del patógeno). Se realizaron reaislamientos a partir de tejido enfermo tomado de plantas inoculados para comprobar los postulados de Koch.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 17 aislamientos pertenecientes al género *Phytophthora*, los cuales se clasificaron en dos grupos tomando en cuenta su similitud morfológica (Cuadro 2.3). El primer grupo lo conformaron 14 aislamientos que desarrollaron esporangióforos simples, esporangios ovoides no papilados con dimensiones promedio largo y ancho de 47.5 a 60 x 26.25 a 32.5 µm (TR21, PS36, 3R68, CR104 y AGUA79), 47.5 a 57.5 x 26.25 a 32.5 µm (PV1, PV11, JB61, CC84 y CC85), 45 a 60 x 22.5 a 32.5 µm (RT45 y RT47) y 45 a 57.5 x 25 a 32.5 µm (JB61 y 3R70), con proliferación anidada y extendida, esporangióforos simples e hinchamientos irregulares presentes (Cuadro 2.3). No se logró identificar el tipo de compatibilidad de esos aislamientos con cepas de afinidad A1 y A2 de *P. drechsleri* y *P. capsici*.

Cuadro 2.3. Características fenotípicas de los aislamientos de *Phytophthora* spp.

Grupo	Aislamiento	Forma esporangial	Proliferación esporangial	Deformaciones miceliales	Dimensiones (µm)	Afinidad	Oosporas
1	TR21, PS36, 3R68, CR104 y AGUA79	Ovoides sin papila	Anidada y extendida	+	47.5-60 x 26.25-32.5	-	-
1	PV1, PV11, JB61, CC84 y CC85	Ovoides sin papila	Anidada y extendida	+	47.5-57.5 x 26.25-32.5	-	-
1	RT45 y RT47	Ovoides sin papila	Anidada y extendida	+	45.0-60.0 x 22.5-32.5	-	-
1	JB61 y 3R70	Ovoides sin papila	Anidada y extendida	+	45-57.5 x 25-32.5	-	-
2	PC107, MJB72 y MPV31	Ovoides con papila	Simple	-	40.0-68.0 x 17.0-30.0	A1	Pleróticas sin ornamenta

El segundo grupo compuesto por tres aislamientos (PC107, MJB72 y MPV31), los que desarrollaron esporangios ovoides papilados, dimensiones promedio largo y ancho de 40 a 68 x 17 a 30 µm, esporangióforos simples, esporangios simples (sin proliferación) y papilados; sin presencia de hinchamientos en las hifas. Reproducción sexual con afinidad A1 de *P. capsici*, con formación de oosporas pleróticas, sin ornamentas y diámetro promedio de 22 a 31 µm (Figura 2.3).

La comparación de esas características con las descritas en las claves taxonómicas de Erwin y Ribeiro (1996) y de Abad *et al.* (2012), coinciden con las especies *Phytophthora parsiana*, *P. virginiana*, *P. lagoariana*, *P. hydropathica* y *P. capsici*. Las reacciones de PCR con los cebadores ITS (4-6) amplificaron un producto aproximado a 941 pb, con los cebadores COX 972 pb y con los cebadores NADH 897 pb.

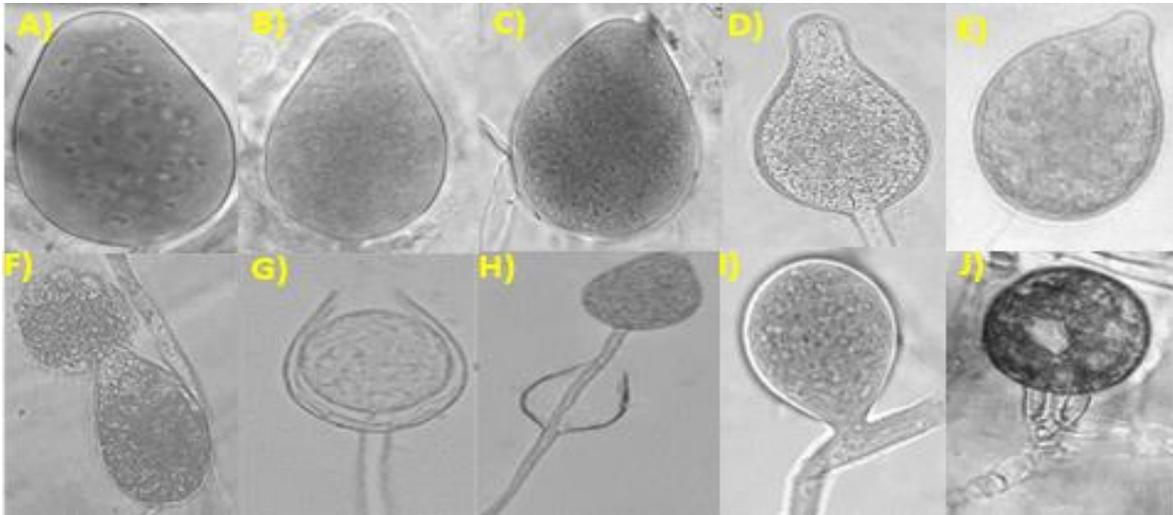


Figura 2.3. Estructuras sexuales y asexuales de los oomicetes. A-D) esporangios ovoides de *Phytophthora* spp.; E) esporangio papilado de *P. capsici* (PC107); F) liberación de zoosporas (TR21); G) proliferación anidada (PV11); H) proliferación extendida (JB61); I) hinchamiento del micelio intercalar (RT45) y J) oospora de *P. capsici* (MPV31).

Las secuencias consenso mostraron resultados con porcentajes de similitud a *Phytophthora virginiana*: de 99.42 (PV1), 99.47 (PV11), 99.52 (JB61), 99.60 (CC84) y 99.78 (CC85), para *Phytophthora parsiana*: de 99 (RT45) y 99.22 (RT47), para *Phytophthora lagoariana*: de 98 (JB61) y 98.52 (3R70), para *Phytophthora hydropathica* de 97 (TR21), 98 (PS36), 98.5 (3R68), 99 (CR104) y 99.64 (AGUA79) y para *Phytophthora capsici* de 99.48 (PC107), 99.7 (MJB72) y 100% (MPV31) (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4. Especies de *Phytophthora* identificadas por aislamiento

Aislamientos	Género	No. de acceso	Similitud (%)
PV1, PV11, JB61, CC84 y CC85	<i>Phytophthora virginiana</i>	MT232849	99.42-99.78
RT45 y RT47	<i>Phytophthora parsiana</i>	MT232850	99-99.22
JB61 y 3R70	<i>Phytophthora lagoariana</i>	MT232839	98-98.52
TR21, PS36, 3R68, CR104 y AGUA79	<i>Phytophthora hydropathica</i>	MT339042	97-99.64
PC107, MJB72 y MPV31	<i>Phytophthora capsici</i>	MT232875	99.48-100

Las especies identificadas en esta investigación son encontradas de manera regular en agua superficial (Zappia *et al.*, 2014; Yang y Hong, 2015). Los 17 aislamientos obtenidos fueron patogénicos, debido a que después de la inoculación todos originaron síntomas de marchitez en plántulas y necrosis de raíz; en frutos causaron síntomas de pudrición (Figura 2.4).

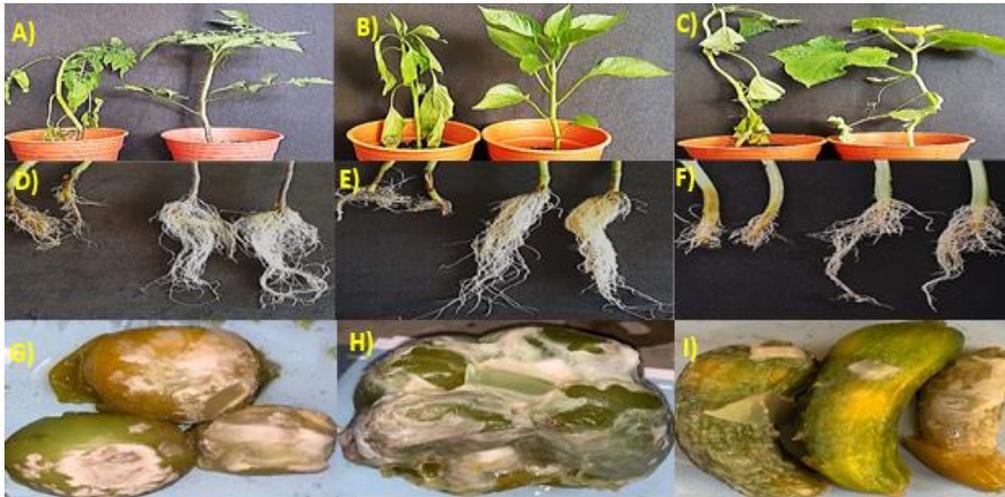


Figura 2.4. Pruebas de patogenicidad de la especie *Phytophthora hydropathica*. A-C) plantas de tomate, chile y pepino, izquierda plantas inoculadas y derecha plantas testigo. D-F) tallos y raíces de plantas de tomate, chile y pepino, izquierda plantas inoculadas y derecha plantas testigo. G-I) frutos inoculados de tomate, chile y pepino.

Los aislamientos de *P. capsici* originaron marchitez de plantas tres días después de la inoculación, mientras esos mismos síntomas aparecieron 10 días después de la inoculación con el resto de las especies. Estos resultados corroboran el reporte de patogenicidad de *Phytophthora parsiana*, *P. virginiana*, *P. lagoariana*, *P. hydropathica* y *P. capsici* sobre plantas de tomate, chile y pepino descritos por Cline (2008), Lamour *et al.* (2012) y Álvarez *et al.* (2016).

Esta investigación comprueba la existencia de especies fitopatógenas no reportadas y que representan un riesgo para la sanidad de cultivos hortícolas en la región. La extracción, amplificación y secuenciación de regiones del ADN de los organismos mediante las técnicas moleculares empleadas en esta investigación

(ITS, COX Y NADH), permitió su identificación al determinar niveles de homología entre >97=100% en la base de datos NCBI y con eso, mayor eficiencia que con la tradicional identificación mediante caracterización morfológica.

Este estudio en agua superficial demuestra la presencia en ese hábitat de *Phytophthora virginiana*, *P. parsiana*, *P. lagoariana*, *P. hydropathica* y *P. capsici*; asimismo, la importancia que juega el agua como fuente de inóculo y dispersión de esos patógenos. A su vez, se amplía el rango de estudios para futuras investigaciones sobre la supervivencia de este tipo de patógenos, descubrir nuevos hospedantes naturales en la zona, determinar otros posibles medios de diseminación, la búsqueda de nuevos hospedantes de importancia económica, identificar si existe la presencia de otro tipo de patógenos de importancia agrícola en agua, y de este modo considerar el riesgo potencial que este tipo organismos representa para la agricultura de la región.

CAPÍTULO III. ESPECIES DE *Pythium* AISLADAS DE AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA²

Artículo científico publicado en la Revista Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 9(1): e3117, 2022. DOI: <https://doi.org/10.19136/era.a9n1.3117>.

3.1 INTRODUCCIÓN

La marchitez prematura o “damping off” es una enfermedad que se presenta en plántulas, originada por diversos agentes fitopatógenos, se manifiesta con síntomas de estrangulamiento, marchitez, declive del crecimiento y muerte repentina (Vásquez *et al.*, 2009, Robledo, 2016; Stouvenakers *et al.*, 2020). El grupo de organismos denominados oomicetes, acoge especies señaladas como causantes predominantes de la marchitez prematura de plántulas, especialmente las pertenecientes al género *Pythium* (Sweet, 2020). Para ese género se han descrito aproximadamente 160 especies cosmopolitas, versátiles y patogénicas (Grijalba y Ridao 2017; Marciulynas *et al.* 2020). La mayoría de las especies de *Pythium* son homotáticas y se caracterizan por formar estructuras de origen sexual y asexual; desarrollan micelio hialino con hifas cenocíticas, hinchamientos, oosporas, esporangios globosos o irregulares que liberan zoosporas como fuente de inóculo (Del Castillo *et al.*, 2019). Esas zoosporas tienen capacidad de desplazamiento y dispersión a largas distancias en ambientes acuáticos, lo que facilita su obtención con cebos trampa colocados en dichos hábitats (Oudemans, 1999; Bush *et al.*, 2003; Redekar *et al.*, 2020). Algunos ejemplares encontrados en aguas superficiales son: *P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. debaryanum*, *P. deliense*, *P. mamillatum* y *P. ultimum* (Pratt y Green, 1971; Hong y Moorman, 2005; Nongnuch *et al.*, 2014; Slavov *et al.* 2018). Por otro lado, West *et al.* (2003) señalan que las enfermedades originadas por *Pythium* spp. son comunes y originan pérdidas estimadas en miles de millones de dólares en todo el mundo. Especies como: *P. lutarium*, *P. oopapillum*, *P. sylvaticum* y *P. torulosum* causaron pérdidas del 20 % en soya y maíz (Zitnick y Nelson, 2015; Matthiesen *et al.*, 2016; Dimbi, 2021). *Pythium aphanidermatum* originó pérdidas del 75 % en plántulas de pepino (Al-Balushi *et al.*, 2018; Morris *et al.*, 2016). En México, *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare*, *P. ultimum*, *P. splendens*, *P.*

arrhenomanes y *P. amazonianum* causaron pérdidas económicas en plantas de ornato, alfalfa, frijol, maíz, chile, tomate y aguacate (Vázquez *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2016; Rivera y Fernández, 2017; Ochoa *et al.*, 2018; Reyes *et al.*, 2018; Velásquez *et al.*, 2018). Por otro lado, la identificación de organismos fitopatógenos convencionalmente se realizaba mediante observación y medición de estructuras vegetativas y de origen sexual o/y asexual, también por observación y comparación mediante el uso de microscopio óptico y claves pictóricas, respectivamente; pero actualmente se sabe que algunas especies comparten características morfológicas, razón por la que su identificación y diagnóstico como agentes fitopatógenos pueden resultar erróneo con esas prácticas (Díaz *et al.*, 2011). No obstante, técnicas de laboratorio basadas en extracción, amplificación y secuenciación de regiones específicas de ácidos nucleicos, contribuyen a la identificación concreta y eficaz de organismos (Robledo, 2016; Trzewik *et al.*, 2016). Por otra parte, con la finalidad de detectar o monitorear oomicetes presentes en agua o suelo, se emplearon frutos, hojas o semillas de diversas especies vegetales, con el propósito de atraer zoosporas que infecten el tejido vegetal y a partir del tejido infectado aislarlos (Rajput *et al.*, 2020; Bennet y Thines, 2020; Frankel *et al.*, 2020; Rai y Guest, 2020; Riolo *et al.*, 2020; Thao *et al.*, 2020). Por la información anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de especies fitopatógenas del género *Pythium* en aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa, México.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Obtención, purificación y conservación de aislamientos de *Pythium* spp

Del 1 de septiembre de 2018 al 20 de febrero de 2019, se recorrió y muestreó en 28 localidades un total de 39 puntos de muestreo en sitios de almacenamiento y transporte de agua para uso agrícola (presas, ríos, canales, diques, etc.) pertenecientes a la red hídrica del municipio de Culiacán, Sinaloa, México. Los sitios (Cuadro 3.1), se localizaron con información sobre fuentes de almacenamiento y distribución de agua de uso agrícola disponible en la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA).

Cuadro 3.1. Sitios de muestreo, Culiacán, Sinaloa, México.

Localidad	Coordenadas del sitio de muestreo	Aislamiento
Presa Adolfo López Mateos	25°10'08" N 107°26'10" W 25°09'10" N 107°26'11" W 25°09'56" N 107°26'30" W	PV1, PV2, PV3, PV4, PV5, PV6, PV7, PV8, PV9, PV10, PV11 y PV12
La Presita	24°55'49" N 107°25'39" W	PR13, PR14, PR15 y PR16
Empaque Castro	24°55'28" N 107°31'59" W	EC17, EC18, EC19 y EC20
El Tamarindo	24°55'07" N 107°33'32" W 24°55'11" N 107°32'57" W	TR21, TR22, TR23 y TR24
Empaque Valle del sol	24°53'20" N 107°29'17" W	EVS25, EVS26, EVS27 y EVS28
Presa Sanalona	24°48'37" N 107°08'11" W 24°48'46" N 107°08'14" W 24°48'49" N 107°08'30" W	PS33, PS34, PS35, PS36, PS37, PS38, PS39, PS40, PS41, PS2, PS43
Río Tamazula	24°49'00" N 107°11'16" W 24°48'53" N 107°21'29" W	RT44, RT45, RT46, RT47, RT48 y RT49
Río Humaya	24°51'48" N 107°24'25" W	RH50, RH51, RH52, RH53, RH54 y RH55
Jardín Botánico	24°49'23" N 107°23'06" W 24°49'24" N 107°23'04" W	JB56, JB57, JB58, JB59, JB60 y JB61
Imala	24°51'21" N 107°13'11" W	IMA62, IMA63, IMA64 y IMA65
Tres Ríos	24°48'43" N 107°24'24" W 24°48'24" N 107°24'33" W	3R66, 3R67, 3R68, 3R69, 3R70 y 3R71
Bellavista	24°48'45" N 107°27'56" W	BELL74 y BELL75
Bachigualato	24°46'59" N 107°26'48" W	BACH76 y BACH77
Aguaruto	24°47'49" N 107°30'24" W	AGUA78 y AGUA79
Campo Batan	24°46'10" N 107°30'19" W	CB80 y CB81
Campo Moroleón	24°41'14" N 107°31'09" W	CM82 y CM83
Campo Cardenal	24°45'10" N 107°28'39" W	CC84 y CC85
Dique Primavera	24°43'48" N 107°24'10" W	DP86 y DP87
Estación Hazera	24°43'32" N 107°27'24" W	HAZ88 y HAZ89
Estación Enza Zaden	24°40'58" N 107°28'47" W	EZ90 y EZ91
Estación Monsanto	24°40'37" N 107°28'50" W	MON92 y MON93
Campo Divemex	24°39'46" N 107°26'58" W	DIV94 y DIV95
Estación Agriseeds	24°38'11" N 107°26'38" W	US96 y US97
Estación Syngenta	24°37'08" N 107°26'41" W	SYN98 y SYN99
Estación Rijk Zwaan	24°36'12" N 107°26'41" W	RZ100 y RZ101
Estación Bayer	24°36'14" N 107°27'22" W	BAY102 y BAY103
Dique Costa Rica	24°35'44" N 107°18'33" W	CR104 y CR105
Facultad de Agronomía	24°37'28" N 107°26'34" W	PP106 y PC107

Trampas flotantes (selladas con cuerdas de polipropileno y poliestireno para permanecer suspendidas) que sujetaban dos frutos de peras inocuos (desinfectados con alcohol etílico de 96% y libre de lesiones), se colocaron sobre las periferias de cada sitio por 48 h (frutos desinfectados y sin desinfectar se mantuvieron en condiciones de laboratorio como testigos libres de oomicetes fitopatógenos). La temperatura del agua se registró con la inmersión de un termómetro de mercurio (Thomas -10 a 150 °C) en cada punto de muestreo al momento de la instalación y retiro de la trampa (entre las 8:00 y 10:00 h del día) (Frankel *et al.*, 2020). Posteriormente, las trampas colectadas se transportaron al laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Los frutos se extrajeron y bajo observación se logró identificar síntomas de infección (lesiones de color café). Los frutos lesionados fueron lavados con agua destilada estéril y desinfectados con alcohol etílico de 96%. De cada fruto, se tomaron aleatoriamente cinco cortes de pericarpio infectado de 1 cm² de diámetro y 5 mm de profundidad. El tejido vegetal enfermo se depositó sobre cajas Petri con medio de cultivo PARP, para lo cual se empleó como base el medio harina de maíz agar (HMA, BD Difco) 17 g·L⁻¹ de agua destilada estéril, al cual se le agregaron: 200, 25, 10 y 10 µg·L⁻¹ de ampicilina, pentacloronitrobenzeno, penicilina y rifampicina, respectivamente (Jeffers y Martin, 1986; Soto *et al.*, 2017) y se incubaron a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por 48 h. Posteriormente, cultivos puros se obtuvieron con transferencias hifales individuales (técnica de punta de hifa) sobre placas con medio de cultivo HMA incubadas por 48 h a temperatura ambiente. Una vez obtenido el aislamiento y con la finalidad de conservación, se efectuaron cinco cortes de 0.5 cm de diámetro con sacabocados sobre las colonias puras activas, y se colocaron en tubos Eppendorf con 5 mL de agua destilada estéril. Los tubos se almacenaron en una incubadora a 15 °C para posteriores estudios de laboratorio (Jeffers y Martin, 1986; Martin *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2017).

3.2.2 Características morfológicas

Los estudios de morfología se realizaron a partir de las cepas almacenadas. Crecimiento micelial de 48 h fue colocado individualmente sobre cajas Petri con los medios de cultivo HMA o V8-agar (agua destilada 800 mL, jugo V8 200 mL, CaCO_3 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y agar $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Una vez que el organismo llenó por completo la superficie de la caja, se agregó agua destilada estéril; las cajas con crecimiento de los organismos se conservaron en condiciones ambientales de laboratorio ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante cinco días para inducir el crecimiento y la reproducción de estructuras sexuales y asexuales de los organismos (Jeffers y Martin, 1986; Martin *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2017). Adicionalmente y con la finalidad de inducir la formación de estructuras de reproducción, cilindros de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo y crecimiento micelial de 48 h se colocaron en cajas de Petri que contenían agua destilada estéril. Un microscopio óptico (Leica DM100) se utilizó para observar y caracterizar la morfología de cada aislamiento. La inducción al crecimiento y reproducción de los aislamientos fue realizada en tres diferentes ocasiones con cinco replicas cada uno.

3.2.3 Identificación molecular

La extracción de ADN genómico se realizó con el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), propuesto por Doyle (1990), al cual se realizaron modificaciones con la finalidad de optimizar la extracción y pureza del ADN. Inicialmente se procedió a desarrollar cepas sobre medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, $39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua destilada estéril), cinco días después se colectaron 100 a 200 mg de micelio con una punta esterilizada y se depositaron en morteros individuales que contenía nitrógeno líquido; se maceró el micelio congelado hasta obtener polvo fino. El polvo de cada muestra se colocó en microtubos fríos, posteriormente se añadió 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, TRISH-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 mM, β -mercaptoetanol 2%) a cada tubo. Se utilizó un agitador tipo vortex para homogenizar el contenido de los tubos durante un minuto. Los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min. El sobrenadante se recuperó, se transfirió a nuevos tubos Eppendorf y se homogenizaron con 1 mL de

cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Las muestras se centrifugaron por 10 min. Se recuperó la fase acuosa, cuidando de no perturbar la interface, y se transfirió a nuevos tubos Eppendorf para mezclarse con 100 μL de acetato de sodio 3M y 1 mL de alcohol isopropílico, se incubaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min, la fase líquida se decantó cuidando de no perturbar la pastilla de DNA. A los tubos se les añadió 1 mL de etanol y se centrifugaron por 3 min. La fase acuosa se eliminó sin perturbar la fase sólida, los tubos se colocaron 10 min boca abajo a temperatura ambiente para la eliminar los restos líquidos, la pastilla de ADN se disolvió en 50 μL de buffer TE. La concentración del ADN se midió por Nanodrop 8000 a 260 nm, su calidad se determinó con las proporciones 280/260 y la integridad se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 0.8 % con solución amortiguadora 1X TAE.

3.2.3.1 Amplificación, purificación y secuenciación del ADN

La mezcla de PCR se preparó con 2.5 μL de buffer específico para la Taq (10X), 1.25 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL de mezcla de DNTP's (200 mM), 0.625 μL de cada cebador individual (0.25 μM) (Cuadro 3.2), 1 μL de ADN ($50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.25 μL de Taq ADN polimerasa ($5\text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$), todo se disolvió en agua de grado molecular suficiente para completar el volumen total de 25 μL . El ADN se amplificó con un termociclador (Bio Rad T100). Condiciones utilizadas en el termociclador: desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s a ITS (60 s COX y NADH), alineamiento por 30 s, extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s y extensión final $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. La temperatura de alineamiento fue de $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ITS, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ para COX y $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ para NADH. La amplificación se verificó con electroforesis en gel de agarosa 0.8% con solución amortiguadora 1X TAE.

Cuadro 3.2. Cebadores utilizados para la amplificación de ADN de *Pythium* spp.

Cebador	Secuencia del cebador	Tamaño (pb)
ITS4C0569/ITS6C0570	TCCTCCGCTTATTGATATGC/GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	930
COXF4N/COXR4N	GTATTTCTTCTTTATTAGGTG/CGTGAAGTAATGTTACATATAC	972
NADHF1/NADHR1	CTGTGGCTTATTTACTTTAG/CAGCAGTATACAAAAAGCAAC	897

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System (Promega, USA). Las dos cadenas del amplicón fueron enviadas para ser secuenciadas en MacroGen, Korea. Las secuencias se compararon en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology information (NCBI, 1988).

El árbol filogenético y el historial evolutivo se construyeron partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), utilizando 848 pares de bases correspondientes al espacio transcrito del ADNr (los gaps/missing se consideraron como deleciones completas) y con la máxima verosimilitud posible. La búsqueda heurística se aplicó automáticamente con los algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ para emparejar las distancias estimadas utilizando el modelo de Tamura-Nei y después seleccionar el valor de máxima topología posible. Para establecer los valores de confianza entre las agrupaciones del árbol resultante, se utilizaron 1000 bootstraps. Este análisis filogenético se realizó empleando el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

3.2.4 Pruebas de patogenicidad

La actividad patogénica de los aislamientos se comprobó mediante la inoculación de plántulas y frutos de tomate saladette cv. SV-3543, chile bell cv. Caravaggio y pepino slicer cv. Luxell.

3.2.4.1 Obtención de plántulas

Las semillas de cada especie (tomate, chile y pepino) se sembraron por separado en charolas de poliestireno con 256 cavidades y sustrato peat moss (Berger), se regaron y condujeron bajo condiciones de invernadero. La emergencia de plántulas

ocurrió siete días después de la siembra, esas plántulas se trasplantaron a macetas plásticas (15 días después de la emergencia) con capacidad de 2 kg con sustrato peat moss. Los riegos se efectuaron diariamente y se fertilizó cada tres días con una mezcla de agua y fertilizante Maxi-grow ® Excel (concentración 1 mL·L⁻¹) (COSMOCEL, composición g·L⁻¹: extractos orgánicos 112, auxinas 0.09, giberelinas 0.10, citoquininas 1.5, nitrógeno 6.6, fósforo 13.3, potasio 13.3, calcio 2.0, magnesio 4.0, hierro 17.2, zinc 26.5, manganeso 13.3 y cobre 13.3).

3.2.4.2 Inoculación de plantas y frutos.

Los aislamientos se transfirieron individualmente a cajas Petri con medio de cultivo PARP y se incubaron por 10 días. Transcurridos 25 días después del trasplante, la inoculación se realizó mediante un cilindro de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo y crecimiento de micelio, colocado en la base del tallo en cada plántula inoculada (para el caso de plántulas testigo se colocó sólo cilindro con medio de cultivo sin crecimiento de patógeno). El inóculo se cubrió con sustrato para evitar su degradación. Cinco días después de la inoculación, los riegos se efectuaron con mayor intensidad con el propósito de favorecer la infección del patógeno. La actividad patogénica de los aislamientos se determinó 20 días después de la inoculación mediante observación para lo cual, se empleó la escala propuesta por Molina *et al.* (2010), donde: 0= sin síntomas, 1= ligera marchitez o ligero daño en tallo, 2= severa marchitez o severo daño en tallo y 3= muerte de planta.

Con la finalidad de demostrar que los organismos inoculados fueron patogénicos, se realizaron los postulados de Koch, para lo cual, muestras individuales de tejido enfermo de las plantas inoculadas con los aislamientos fueron transferidos a cajas de Petri con medio de cultivo (PARP) y permanecieron a temperatura ambiente (25 a 32 °C).

La actividad patogénica de los aislamientos en frutos se comprobó mediante frutos inocuos, inmaduros, de tomate, chile y pepino. Previa a la inoculación de los aislamientos, los frutos fueron lavados con agua destilada estéril y desinfectados con etanol de 70%. Cada fruto se inoculó con cilindros de 0.5 cm de diámetro, con medio de cultivo y crecimiento micelial (para el caso de frutos testigo se colocó sólo cilindro con medio de cultivo sin crecimiento de patógeno); los frutos inoculados, se colocaron dentro de cámaras húmedas, elaboradas con recipientes de plástico y algodón humedecido con agua destilada estéril. La severidad se determinó a las 48 h después de la inoculación, con base a la cantidad de tejido dañado por el patógeno (diámetro promedio de tejido dañado). Las pruebas de patogenicidad se establecieron en un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones y su respectivo tratamiento control. Las pruebas de patogenicidad se establecieron en cámara de incubación con temperatura que fluctuó de 25 a 32 °C y humedad relativa de 100 %. Concluidas las evaluaciones, del tejido enfermo en las plantas inoculadas se reaislaron los organismos para comprobar su patogenicidad mediante los postulados de Koch.

Los datos de ambas pruebas patogénicas fueron procesados con el software INFOSTAT, y se realizó prueba de normalidad y homogeneidad de los datos para posteriormente analizarlos mediante análisis de varianza y prueba de separación de medias (Tukey, $P \geq 0.05$).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se obtuvieron 107 aislamientos de oomicetes, sin embargo, sólo cinco aislamientos (Cuadro 3.3) mostraron características morfológicas pertenecientes al género *Pythium*, tales como: micelio hialino, cenocítico, esporangios lobulados terminales, intercalares y presencia de oosporas apleróticas (Figura 3.1).

Cuadro 3.3. Localidad y coordenadas de sitios de muestreo donde se obtuvieron aislamientos del género *Pythium*.

Nombre del aislamiento	Localidad	Coordenadas del punto de muestreo
EC17	Empaque Castro	24°55'28" N 107°31'59" W
JB56	Jardín Botánico	24°49'23" N 107°23'06" W
PP106	Facultad de Agronomía	24°37'28" N 107°26'34" W
PV1	Presa Adolfo López Mateos	25°10'08" N 107°26'10" W
PS33	Presa Sanalona	24°48'46" N 107°08'14" W



Figura 3.1. Características morfológicas de *Pythium* spp. a) esporangios lobulados (EC17); b) oosporas apleróticas y anteridio intercalar (aislamiento JB56) y c) grupo de oosporas en tejido de pepino (aislamiento PP106).

Las secuencias individuales de cada aislamiento se compararon con secuencias depositadas en el GenBank. El análisis por BLAST del NCBI, mostró 99.8% de similitud a *Pythium aphanidermatum* para las secuencias de los aislamientos EC17, JB56 y PP106 (números de acceso MW488307, MW486431 y MT232874, respectivamente), de 98.0% a *P. pachycaule* para el aislamiento PV1 (número de acceso MT261893) y de 98.0% de similitud a *P. torulosum* para el aislamiento PS1 (número de acceso MT232848). El árbol filogenético creado (Figura 3.2) permite observar la relación estrecha que existe entre las secuencias obtenidas con otras de distintas regiones del mundo. Ese árbol separó diferentes clados con las especies del género *Pythium*: el Clado I, incluyó al aislamiento PV1 que corresponde a *P. pachycaule*; en el Clado II al aislamiento PS1 de *P. torulosum* y el Clado III incluyó los aislamientos EC17, JB56 y PP106 de *P. aphanidermatum*.

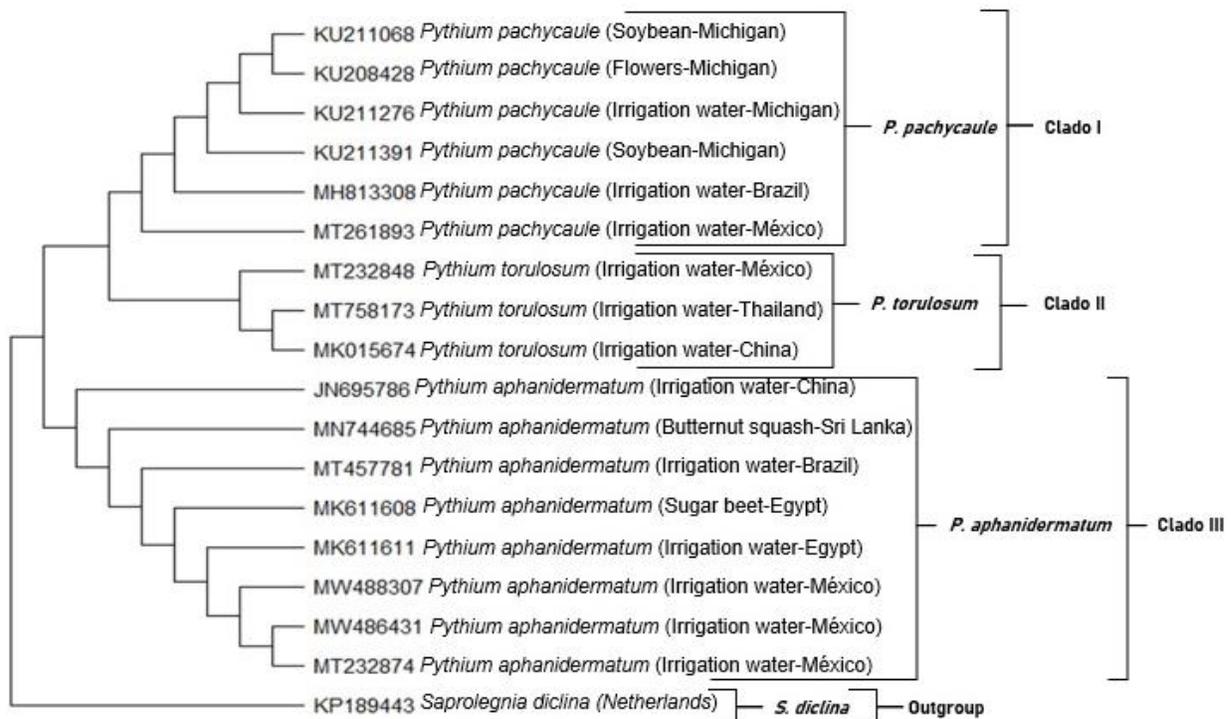


Figura 3.2. Árbol filogenético que integra las especies de *Pythium* obtenidas en esta investigación, elaborado con el método de máxima verosimilitud. Los aislamientos colectados de agua de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa, están marcados con la leyenda de “Irrigation water-México”. Los aislamientos pertenecen a *P. aphanidermatum* (número de acceso MW488307-EC17, MW486431-JB56 y MT232874-PP106); *P. pachycaule* (número de acceso MT261893-PV1) y *P. torulosum* (número de acceso MT232848-PS1). Como secuencia outgroup se colocó a *Saprolegnia diclina*.

Los cinco aislamientos de *Pythium* fueron patogénicos en plántulas de tres semanas de edad (Cuadro 3.4). La Figura 3.3 muestra el daño originado por el aislamiento EC17 (*P. aphanidermatum*) sobre plántulas de tomate, chile y pepino. La severidad en plantas de tomate y chile originada por *P. aphanidermatum* (aislamientos PP106, JB56 y EC17) fue significativamente superior ($P \geq 0.05$) a la ocasionada por *P. torulosum* (aislamiento PS1), pero semejante a la originada por *P. pachycaule* (aislamiento PV1). En contraste, la severidad inducida por los cinco aislamientos en plantas de pepino fue estadísticamente igual.

Cuadro 3.4. Severidad del daño en plántulas de tomate, chile y pepino originada por cinco aislamientos de *Pythium* sp. obtenidos de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.

Aislamiento	Especie	Tomate	Chile	Pepino
PS1	<i>P. torulosum</i>	1.5 a*	1.5 a	2.5 a
PV1	<i>P. pachycaule</i>	1.8 ab	2.0 ab	1.8 a
PP106	<i>P. aphanidermatum</i>	3.0 b	3.0 b	2.3 a
JB56	<i>P. aphanidermatum</i>	3.0 b	3.0 b	3.0 a
EC17	<i>P. aphanidermatum</i>	3.0 b	3.0 b	3.0 a

* Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes según Tukey ($P \geq 0.05$).



Figura 3.3. Pruebas de patogenicidad de *Pythium aphanidermatum* aislamiento EC17: A) plántulas de tomate; B) plántulas de chile y C) plántulas de pepino.

En frutos, todos los aislamientos de *Pythium* fueron patogénicos (Cuadro 3.5). La severidad en frutos de tomate, chile y pepino originada por los tres aislamientos de *P. aphanidermatum* (aislamientos PP106, JB56 y EC17) fue estadísticamente igual ($P \geq 0.05$); en tanto que, con *P. pachycaule* (aislamiento PV1) dicha severidad fue significativamente inferior únicamente en frutos de tomate con el aislamiento JB56. Con *P. torulosum* (aislamiento PS1), la severidad fue estadísticamente igual a la originada por *P. pachycaule* y *P. aphanidermatum*, excepto en frutos de tomate con el aislamiento JB56, y en frutos de chile y pepino con el aislamiento EC17.

Cuadro 3.5. Severidad en frutos de tomate, chile y pepino originada por cinco aislamientos de *Pythium* spp. obtenidos de aguas para el uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.

Aislamiento	Especie	Tomate	Chile	Pepino
Diámetro (cm)				
PS1	<i>P. torulosum</i>	4.5 a*	5.3 a	5.0 a
PV1	<i>P. pachycaule</i>	4.8 a	7.5 ab	6.3 ab
PP106	<i>P. aphanidermatum</i>	7.5 ab	8.5 ab	5.5 ab
JB56	<i>P. aphanidermatum</i>	7.5 ab	8.50 ab	5.5 ab
EC17	<i>P. aphanidermatum</i>	7.3 ab	9.8 b	8.5b

*Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes según Tukey ($P \geq 0.05$).

La temperatura promedio del agua entre los 5 y 10 cm de profundidad, al momento de la instalación de las trampas osciló de 21 a 32 °C, mientras que al momento del retiro osciló de 20 y 33 °C. Las temperaturas más bajas se registraron durante el mes de diciembre con $20 \pm 1^\circ\text{C}$; mientras que las temperaturas más altas se registraron en septiembre $33 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 3.4).

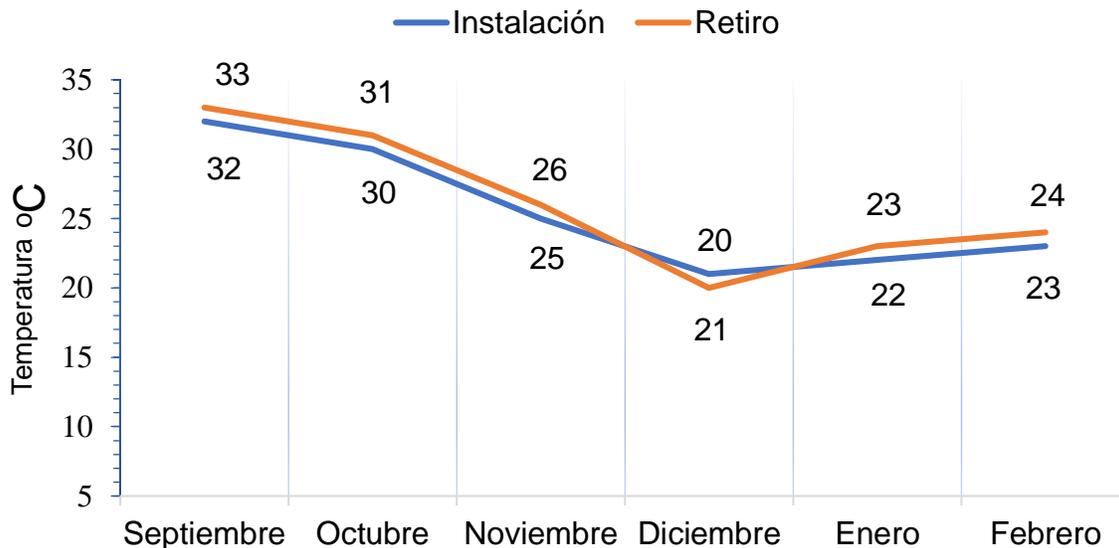


Figura 3.4. Temperatura promedio ($\pm 1^\circ\text{C}$) del agua en 39 puntos de muestreo en el periodo comprendido del 1 de septiembre de 2018 al 20 de febrero de 2019. Culiacán Sinaloa, México.

Las características morfológicas de micelio, esporangio y oosporas, registradas en esta investigación, son congruentes con lo descrito por Díaz *et al.* (2011), Al-Sheikh y Abdelzaher (2012) y Saelee *et al.* (2021) para *P. aphanidermatum*, *P. pachycaule* y *P. torulosum*. Se ha descrito que las especies *P. pachycaule* y *P. torulosum*, forman oosporas apleróticas en la reproducción sexual, al igual que *P. aphanidermatum* (Abdelzaher y Kageyama, 2020). Sin embargo, es posible que las condiciones en las cuales se realizó la identificación morfológica no permitieron que esa estructura se formara, no obstante, la secuenciación de los ácidos nucleicos permitió la identificación del género y especie de cada aislamiento. Lo cual es congruente con lo descrito por Díaz *et al.* (2011), quienes señalan que la caracterización morfológica de estos organismos debe complementarse con la técnica molecular debido a que dentro del mismo género existe la posibilidad de similitud morfológica entre especies (Herrero *et al.*, 2020). Así, la identificación morfológica de los aislamientos se confirmó con los resultados obtenidos de la secuenciación de las regiones ITS, análisis por BLAST del NCBI y construcción del árbol filogenético.

Por otro lado, las especies *P. aphanidermatum*, *P. torulosum* y *P. pachycaule* se han encontrado en ambientes acuáticos con temperaturas fluctuantes de 30 a 40 °C (Watanabe *et al.*, 2007; De Cock *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2016; Kachour *et al.*, 2016; Redekar *et al.*, 2019; Salmaninezhad y Ghalamfarsa, 2019), lo cual es congruente con lo obtenido en esta investigación.

Se determinó que las tres especies encontradas fueron capaces de infectar tanto plántulas como frutos de tomate, chile y pepino, que la severidad del daño fue diferente para cada especie de planta y que existió diferencia en el nivel de severidad interespecífica, pero no se presentó dicha diferencia entre los aislamientos de una misma especie.

Tanto *P. aphanidermatum* como *P. pachycaule* y *P. torulosum* son organismos que, en investigaciones previas a ésta, ya se habían obtenido de aguas de uso agrícola en otras regiones del mundo (Al-Sheikh y Abdelzaher, 2012; Parke *et al.*, 2019; Redekar *et al.*, 2019; Abdelzaher y Kageyama, 2020). Sin embargo, a saber, en México es la primera vez que se determina la patogenicidad en plantas de interés hortícola de los organismos *P. pachycaule* y *P. torulosum*.

Los resultados obtenidos en el estudio morfológico, identificación molecular y pruebas de patogenicidad en plántulas y frutos de tomate, chile y pepino, permitió confirmar la presencia en aguas de uso agrícola en el valle de Culiacán, Sinaloa, de tres especies fitopatógenas del oomycete *Pythium*, y con ello se proporciona información que sustenta que el agua de riego debe ser un componente a considerar en la implementación del manejo integrado de enfermedades en plantas susceptibles.

CAPÍTULO IV. *Phytophthium helicoides* ASOCIADO CON AGUAS PARA IRRIGACIÓN AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA

4.1 INTRODUCCIÓN

El agua empleada para cultivar plantas es frecuentemente almacenada y distribuida por medio de infraestructuras construidas con la finalidad de facilitar y optimizar su uso, sin embargo, se ha comprobado que esas prácticas favorecen la dispersión de agentes fitopatógenos desde y hacia espacios de explotación agrícola (Zappia *et al.*, 2014; Corrales *et al.*, 2018). Los oomicetes son un grupo diverso de microorganismos con más de 1500 especies descritas, presentes en hábitats acuáticos, suelos húmedos (Judelson y Ah-Fong, 2019; Nam y Choi, 2019) y agua destinada para cultivar plantas (Álvarez *et al.*, 2017; Marčiulynas *et al.*, 2020), razones por las que son amenaza persistente para plantas cultivadas (Agrios, 2005), ya que está documentada la existencia de oomicetes fitoparásitos (Adhikari *et al.*, 2013; Aram y Rizzo, 2018; Judelson y Ah-Fong, 2019).

El descubrimiento de nuevos linajes de oomicetes, ha favorecido la investigación sobre su evolución, diversidad y relación filogenética, así, el género *Phytophthium* fue descrito por Bala *et al.* (2010) y ubicado como oomicete miembro de la familia Pythiaceae, orden Peronosporales, con 19 especies adjuntas (De Jesus *et al.*, 2016; Sevda *et al.*, 2021). Las especies del género *Phytophthium* se desarrollan favorablemente en ambientes húmedos, cuando la temperatura fluctúa entre 15 y 40 °C. Forman micelio cenocítico, esporangios ovoides o globosos papilados, con proliferación interna, liberación de zoosporas en vesícula y oosporas sin ornamentación (Baten *et al.*, 2014; De Cock *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Entre los hospedantes susceptibles a este organismo se reportaron plantas de *Actinidia chinensis* (Donati *et al.*, 2020), *Citrus reticulata* (Chen *et al.*, 2016), *Durio zibethinus* (Thao *et al.*, 2020), *Fragaria ananassa* (Marin *et al.*, 2018), *Malus domestica* (Jabiri *et al.*, 2021), *Persea americana* (Rodríguez *et al.*, 2018), *Platanus orientalis* (Dervis *et al.*, 2020), *Prunus dulcis* (Beluzán *et al.*, 2022), *Pyrus communis* (Jabiri *et al.*, 2021), *Rhizophora* spp. (Bennet *et al.*, 2017) y *Zea mays* (Xie *et al.*, 2021).

Dado lo novedoso del género *Phytophthium*, en México existen limitadas referencias científicas donde se determine su potencial patogénico, rango de hospedantes y especies presentes en agroecosistemas, así, esta investigación se planteó con el objetivo de determinar la presencia de especies fitopatógenas del género *Phytophthium* en aguas empleadas para la irrigación agrícola en el valle de Culiacán, Sinaloa, México.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Obtención, aislamiento y purificación de los organismos

Durante el periodo comprendido del 1 de septiembre de 2018 al 31 de enero de 2019, en 39 puntos ubicados con información disponible en la Comisión Nacional del agua (<https://www.gob.mx/conagua>) sobre infraestructuras empleadas para almacenamiento y distribución de agua para la agricultura (presas, estanques, ríos y canales) del distrito de riego número 010 del valle de Culiacán, Sinaloa, se colocaron trampas flotantes elaboradas con bolsas de polipropileno y dos frutos de pera que sirvieron como cebo. Después de 48 h, los frutos fueron extraídos con visibles síntomas de infección (lesiones de color café sobre el epicarpio de los frutos). Los frutos con lesiones fueron lavados con agua destilada estéril y desinfectados con alcohol etílico al 96%. De cada fruto, se tomaron aleatoriamente cinco cortes de pericarpio infectado de 1 cm² de diámetro y 5 mm de profundidad. El tejido vegetal enfermo se depositó sobre cajas Petri con medio de cultivo PARP, para lo cual se empleó como base el medio harina de maíz agar (HMA, BD Difco), a razón de 17 g·L⁻¹ de agua destilada estéril, al cual se agregaron 200, 25, 10 y 10 µg·L⁻¹ de ampicilina, pentacloronitrobenzeno, penicilina y rifampicina, respectivamente, y se incubaron a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por 48 h (Jeffers, 2006; Soto *et al.*, 2017). Posteriormente, se obtuvieron cultivos puros mediante transferencias hifales individuales (técnica de punta de hifa) sobre placas con medio de cultivo HMA incubadas por 48 h a temperatura ambiente (27 ± 2 °C). Una vez obtenido el aislamiento y con la finalidad de su conservación, se efectuaron cinco cortes de 0.5 cm de diámetro con sacabocados sobre las colonias puras activas, y se colocaron en tubos Eppendorf con 5 mL de agua destilada estéril. Los

tubos se almacenaron en una incubadora a 15 °C para posteriores estudios de laboratorio.

4.2.2 Caracterización morfológica

Se realizó identificación morfológica a partir de colonias desarrolladas sobre medio de cultivo V8A (800 mL de agua destilada, 200 mL de jugo V8, 2 g de CaCO₃ y 15 g de agar). Así, de cada aislamiento se tomaron fragmentos de 0.5 cm de diámetro que fueron colocados, individualmente por 24 h, en extracto acuoso de suelo bajo condiciones ambientales de laboratorio (27 ± 2 °C) durante cinco días, para inducir crecimiento y producción de estructuras sexuales y asexuales de los organismos. Un microscopio óptico (Leica DM100) con medidor ocular integrado se utilizó para observar, medir y caracterizar la morfología de los aislamientos (Chen *et al.*, 2021).

4.2.3 Identificación molecular

4.2.3.1 Extracción de ADN

Colonias individuales de cada aislamiento fueron desarrolladas sobre medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, BD Difco), a razón de 39 g·L⁻¹ de agua destilada estéril, a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por 72 h, para después tomar muestras de 100 a 200 mg de micelio para la extracción del ADN. Cada muestra fue sumergida en nitrógeno líquido sobre un mortero y se trituró con pistilo hasta obtener un polvo fino el cual se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL sostenidos en congelación y se les adicionó 1 mL de buffer bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 2%, TRISH-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 mM, β-mercaptoetanol 2%). Se colocaron los tubos en vortex durante un minuto y después se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min. El sobrenadante se recuperó y se transfirió individualmente a nuevos tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 1 mL de solución cloroformo-alcohol isoamílico (49:1) y se mezcló el contenido de los tubos con la fase recuperada. Se colocaron las muestras en vortex por 10 min. Se realizó una segunda recuperación de fase acuosa y una segunda transferencia a nuevos tubos Eppendorf. Se añadió acetato de sodio 3M con 1 mL de alcohol isopropílico con valor 1/10 del volumen recuperado y se almacenaron los tubos a -20 °C por 20 min

(los tubos pueden ser almacenados hasta por 24 h para maximizar la obtención de ADN). Se centrifugaron los tubos a 12 000 rpm por 15 min, posteriormente se decantaron sin desperdiciar el contenido de ADN precipitado. Se añadió 1 mL de etanol y se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm por 3 min. Se extrajo el sobrenadante sin tocar la fase sólida, se colocaron los tubos con la fase sólida a temperatura ambiente para la evaporación de líquidos. El ADN (fase sólida) fue disuelto en 50 μ L de buffer TE. Las características del ADN se calcularon con Nanodrop 8000 a 260 nm, la calidad se estimó con la proporción 280/260, la integridad se visualizó en una cámara de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con una solución amortiguadora de 1X TAE.

4.2.3.2 Amplificación, purificación y secuenciación del ADNr

La mezcla para PCR se preparó con 2.5 μ L de buffer específico para la Taq (10X), 1.25 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 0.5 μ L de mezcla de dNTPs (200 mM), 0.625 μ L de cada iniciador individual (0.25 μ M), 1 μ L de ADN (50 ng μ L⁻¹), 0.25 μ L de Taq ADN polimerasa (5 UI mL⁻¹), todo se disolvió en agua de grado molecular, suficiente para completar el volumen total de 25 μ L. El ADN se amplificó con un termociclador (Bio-Rad T100). Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s a ITS 930 pb (ITS4F: TCCTCCGCTTATTGATATGC; ITS6R: GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG), 60 s a COX 972 pb (COXF: GTATTTCTTCTTTATTAGGTG; COXR: CGTGAAGTAATGTTACATATAC) y 60 s a NADH 897 pb (NADHF: CTGTGGCTTATTTTACTTTAG; NADHR: CAGCAGTATACAAAAGCAAC), alineamiento por 30 s, extensión a 72 °C por 60 s y extensión final a 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento fue de 62 °C para ITS, 52 °C para COX y 53 °C para NADH. La amplificación se verificó mediante electroforesis en gel (Choi *et al.*, 2015; Cooke *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2021). La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System (Promega, USA). Las dos cadenas del amplicón fueron enviadas para ser secuenciadas en Macrogen, Korea. Las secuencias se compararon en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information

(NCBI). El árbol filogenético y el historial evolutivo se construyeron partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), para 848 pares de bases correspondientes al espacio transcrito del ADNr (los gaps/missing se consideraron como deleciones completas) y con la máxima verosimilitud posible. La búsqueda heurística se aplicó automáticamente con los algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ para emparejar las distancias estimadas utilizando el modelo de Tamura-Nei y después seleccionar el valor de máxima topología posible. Para establecer los valores de confianza entre las agrupaciones del árbol resultante, se utilizaron 1000 bootstraps. Este análisis filogenético se realizó empleando el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

4.2.4 Pruebas de patogenicidad

La actividad patogénica de los aislamientos se comprobó mediante su inoculación a plántulas de tomate saladette 'SV-3543', chile bell 'Caravaggio' y pepino slicer 'Luxell'. Previamente, semillas de cada especie vegetal fueron sembradas en charolas de poliestireno de 256 cavidades rellenas con sustrato peat moss (Berger) y conservadas en condiciones de invernadero. Cuando las plántulas completaron 7 días después de la emergencia fueron trasplantadas individualmente a macetas de plástico de 3 kg de capacidad rellenas con sustrato peat moss previamente esterilizado. Las plántulas fueron abastecidas diariamente con solución nutritiva (composición g·L⁻¹: extractos orgánicos 112, auxinas 0.09, giberelinas 0.10, citoquininas 1.5, nitrógeno 6.6, fósforo 13.3, potasio 13.3, calcio 2.0, magnesio 4.0, hierro 17.2, zinc 26.5, manganeso 13.3 y cobre 13.3). La inoculación de las plantas se realizó 15 días después del trasplante con un cilindro de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo y crecimiento de micelio, colocado en la base del tallo en cada plántula inoculada (para el caso de plántulas testigo se colocó un cilindro con medio de cultivo sin crecimiento de patógeno). El inóculo se cubrió con sustrato peat moss para evitar su degradación. Cinco días después de la inoculación, los riegos se efectuaron con mayor intensidad con el propósito de favorecer la infección del patógeno. Con la finalidad de demostrar que los organismos inoculados fueron patogénicos, se realizaron los postulados de Koch, para lo cual, muestras

individuales de tejido enfermo de las plantas inoculadas con los aislamientos fueron transferidos a cajas de Petri con medio de cultivo (PARP) y permanecieron a temperatura ambiente (24 ± 2 °C).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 11 aislamientos que pertenecen a organismos del género *Phytophthium* (Cuadro 4.1). Los aislamientos desarrollaron micelio blanquecino irregular en los medios de cultivo HMA y V8A, sin formación de micelio aéreo sobre medio HMA, pero sí sobre medio V8A (Figura 4.1). Todos los organismos aislados desarrollaron micelio cenocítico, esporangióforos simples, esporangios globosos terminales, con dimensiones de 30 a 45 μm de largo (promedio de 37.5 μm) y de 15 a 20 μm de ancho (promedio de 17.5 μm). También formaron oosporas sin ornamentación con diámetro que fluctuó de 30 a 35 μm (promedio 32.5 μm) (Figura 4.2).

Cuadro 4.1. Aislamientos obtenidos de aguas de uso agrícola y localización de los sitios de colecta.

Aislamiento	Localidad	Coordenadas
PhyH1	Presa Adolfo López Mateos	25°10'08" N 107°26'10" W
PhyH2	Presa Adolfo López Mateos	25°09'10" N 107°26'11" W
PhyH3	Presa Adolfo López Mateos	25°09'10" N 107°26'11" W
PhyH4	Río Humaya	24°51'48" N 107°24'25" W
PhyH5	Empaque Castro (estanque)	24°55'28" N 107°31'59" W
PhyH6	Empaque Castro (estanque)	24°55'28" N 107°31'59" W
PhyH7	La Presita	24°55'49" N 107°25'39" W
PhyH8	Presa Sanalona	24°48'46" N 107°08'14" W
PhyH 9	Río Tamazula	24°49'00" N 107°11'16" W
PhyH10	Río Tamazula	24°48'53" N 107°21'29" W
PhyH11	Jardín Botánico (estanque)	24°49'24" N 107°23'04" W

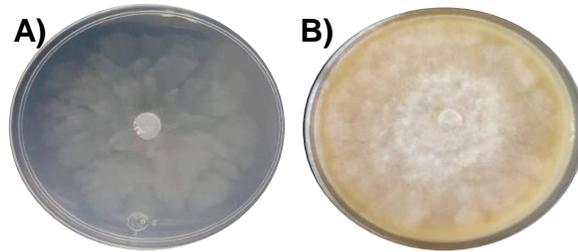


Figura 4.1. Crecimiento de *Phytophthium helicoides* (PhyH11) sobre medio de cultivo A) HMA y B) V8A.

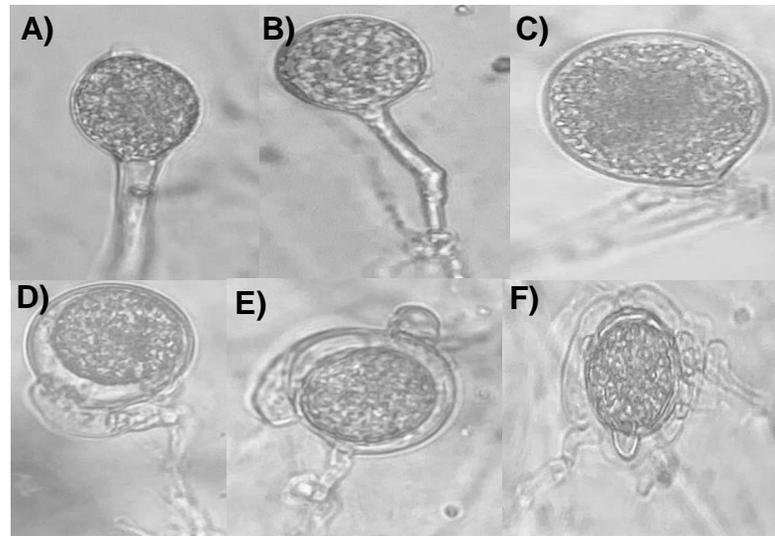


Figura 4.2. Estructuras morfológicas de *Phytophthium helicoides* (PhyH11). A-C) esporangios globosos, simples terminales; D-F) oosporas sin ornamentación.

El resultado del BLAST del NCBI coincidió con secuencias de aislamientos obtenidos en otros países, con porcentajes de identidad para *Phytophthium helicoides* que varió desde 97 hasta 100% (Cuadro 4.2). El análisis filogenético demostró que los aislamientos obtenidos en Culiacán, Sinaloa (registrados como: irrigation water-México), se emparejaron en el clado específico para *P. helicoides* (Figura 4.3).

Cuadro 4.2. Similitud a *Phytopythium helicoides* de los aislamientos obtenidos de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.

Aislamiento	Número de acceso	Similitud	Género y especie
PhyH1	MT322872	97.0%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH2	MT322863	99.0%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH3	MT322864	100%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH4	MT322862	100%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH5	MT322861	98.7%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH6	MT322869	99.0%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH7	MT322865	97.9%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH8	MT322873	99.3%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH9	MT322866	98.6%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH10	MT322867	99.0%	<i>Phytopythium helicoides</i>
PhyH11	MT322871	100%	<i>Phytopythium helicoides</i>

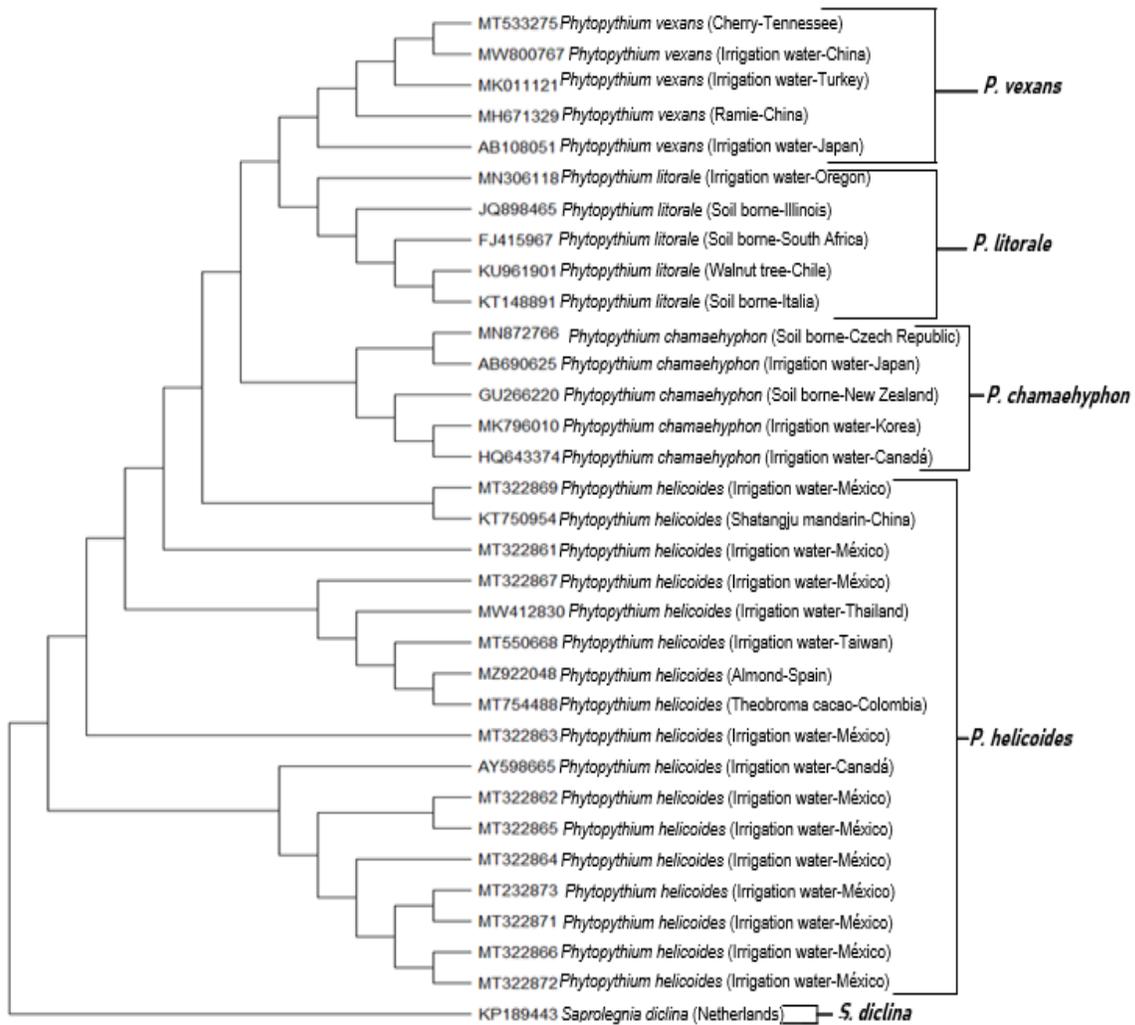


Figura 4.3. Árbol filogenético resultante para los aislamientos de *Phytophthium helicoides* de aguas de uso agrícola de Culiacán, Sinaloa (Irrigation water-México), elaborado con el método de máxima verosimilitud y modelo Tamura-Nei. Como secuencia outgroup se colocó a *Saprolegnia diclina*.

Los 11 aislamientos de *P. helicoides* resultaron patogénicos para las plantas de tomate, chile y pepino, los cuales produjeron síntomas de necrosis de tallo y raíces después de siete días posteriores a la inoculación (Figura 4.4). Los postulados de Koch comprobaron que el organismo inoculado fue el causante de los daños observados en las plantas.



Figura 4.4. Pruebas de patogenicidad: a la izquierda, plantas inoculadas con *Phytophthora helicoides* (PhyH11); a la derecha, plantas testigo. A) plantas de tomate; B) plantas de chile y C) plantas de pepino.

Las características morfológicas de los 11 aislamientos estudiados fueron semejantes entre sí y coincidieron con las características descritas por Chen *et al.* (2021) para *P. helicoides*, no obstante, esos autores no observaron el desarrollo de oosporas. La formación de oosporas en cultivos simples (homotálicos) observadas en esta investigación es congruente con lo descrito por Chen *et al.* (2016) para *P. helicoides*. Así, todos los aislamientos fueron tentativamente identificados como *P. helicoides* y esa identificación fue confirmada con los resultados obtenidos de la secuenciación de las regiones ITS, el BLAST del NCBI y por la construcción del árbol filogenético. En el árbol filogenético construido, las secuencias de los aislamientos obtenidos de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa, se agruparon dentro del clado correspondiente al género y especie *P. helicoides*, donde además se situaron aislamientos de países como Canadá, Colombia, Tailandia y Taiwán (Figura 4.3).

Las secuencias ITS 4-6, COX y NADH mostraron que, entre los aislamientos, los porcentajes de identidad genética fluctuaron de 97 a 100%. La heterogeneidad genética de *P. helicoides*, también fue reportada por Xie *et al.* (2021). El mismo análisis mostró que en tres aislamientos la identidad fue de 100% (aislados PhyH3, PhyH4 y PhyH11), lo cual indica que se trató de aislados clon. Es pertinente señalar que dichos aislamientos se obtuvieron de sitios con coordenadas distintas, lo que sugiere una alta relación con la fuente de origen del agua que explicaría la dispersión a distancia de *P. helicoides*.

La totalidad de los aislamientos mostraron ser patogénicos a las plántulas de tomate, chile y pepino. El oomicete *P. helicoides* fue previamente reportado como parásito de plántulas de *Fragaria ananassa* (Marin *et al.*, 2018) y *Citrus reticulata* (Chen *et al.*, 2016), además del arbusto *Rhododendron pulchrum* (Chen *et al.*, 2021). En esta investigación se determinó la presencia en el valle de Culiacán, Sinaloa, de *P. helicoides* y su patogenicidad a plantas hortícolas cultivadas en la región, además, contribuye con nuevos conocimientos sobre el estudio y manejo del agua empleada para la irrigación agrícola, como espacio que alberga y disemina organismos fitopatógenos.

CAPÍTULO V. SENSIBILIDAD A METALAXIL DE OOMICETES AISLADOS DE AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN CULIACÁN, SINALOA

5.1 INTRODUCCIÓN

Los oomicetes son un grupo de microorganismos donde se incluyen algunos de importancia fitopatógena (Abdelzaher y Kageyama, 2020). Por otro lado, la existencia de organismos con resistencia a fungicidas es un problema favorecido por su uso inapropiado. La presencia de organismos resistentes a fungicidas ocasiona que en las regiones agrícolas se opte por aumentar la concentración de los fungicidas empleados para el control de problemas fitopatológicos, lo que adicionalmente incrementa los costos de inversión, mayor impacto negativo a la salud pública y el medioambiente. La presencia de oomicetes con resistencia a fungicidas en una región agrícola, favorece el uso inapropiado de los compuestos empleados para su control, en consecuencia, contribuye a la aparición de nuevas cepas resistentes y sus consecuencias adversas. Así, la presente investigación se planteó con el objetivo de determinar la sensibilidad al fungicida metalaxil de oomicetes aislados de aguas de uso agrícola del valle de Culiacán, Sinaloa.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de hongos y nematodos de la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, en Culiacán, Sinaloa, México. Se emplearon nueve aislamientos de oomicetes obtenidos de aguas de uso agrícola de la zona de influencia del distrito de riego número 010 del valle de Culiacán, Sinaloa. Dichos aislamientos, previamente estudiados mediante técnicas moleculares y morfológicas, se identificaron como: *Phytophthora hydropathica*, *Phytophthora virginiana*, *Phytophthora parsiana*, *Phytophthora lagoariana*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium torulosum*, *Pythium pachycaule* y *Phytophythium helicoides* (Cárdenas-Rodríguez et al., 2021; Cárdenas-Rodríguez et al., 2022).

Para conocer la sensibilidad de los organismos a metalaxil, se prepararon cajas de Petri con medio de cultivo V8 [(agua destilada (800 mL), jugo V8 (200 mL), CaCO_3 (2 g), agar (15 g)], con cuatro concentraciones del compuesto metalaxil (Ridomil®, 46.5 %): 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Álvarez, García, Valdez, León y Allende, 2018). A las cajas con medio de cultivo V8 + metalaxil, se le colocó al centro un cilindro de medio de cultivo con crecimiento del organismo. Así, individualmente cada organismo fue confrontado a las cuatro diferentes concentraciones de metalaxil, además, se hizo crecer cada organismo en medio de cultivo sin metalaxil (testigo absoluto).

La investigación se estableció en condiciones de laboratorio con diseño experimental completamente al azar. Por cada tratamiento-organismo se sembraron ocho cajas de Petri (cada caja se tomó como una repetición). Como variable de respuesta se evaluó el crecimiento de las colonias de los organismos, ese crecimiento se midió por nueve días cada 24 h. Las categorías de sensibilidad, susceptible y resistente, se determinaron mediante el crecimiento colonial en la concentración de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Si el crecimiento del diámetro superó el 40 % de la superficie total de la caja, ese aislamiento se consideró resistente; mientras que, si el crecimiento de la colonia fue igual o inferior a ese porcentaje, el organismo se consideró susceptible (Hu y Li, 2014; Matson, Small, Fry y Judelson, 2015). Con los datos obtenidos sobre el crecimiento de los organismos y las concentraciones a las que fueron confrontados, se realizó análisis de regresión polinomial entre ambas variables.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transcurridos nueve días después de la siembra en medio de cultivo V8 con metalaxil a concentraciones de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, todos los aislamientos de oomicetes crecieron y alcanzaron a cubrir el 100 % de la superficie de crecimiento (datos no presentados). En tanto que, solo *Phytophthora hidropática*, *Pythium pachycaule* y *Pythium torulosum* fueron susceptibles a metalaxil a la concentración de 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, puesto que transcurridos nueve días después de la siembra su

crecimiento fue únicamente de 34.4, 26.7 y 21.1 %, respectivamente (Cuadro 5.1). De acuerdo con el crecimiento alcanzado con metalaxil a $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, solo *Phytophthora helicoides* ocupó el 94.4 % de la superficie dispuesta para su crecimiento (Cuadro 5.1). Así, de acuerdo con lo descrito por Hu y Li (2014) y Matson et al. (2015) *Phytophthora helicoides* resultó resistente al fungicida.

Cuadro 5.1. Inhibición del crecimiento radial de oomicetes con metalaxil.

Aislamiento	Concentración de metalaxil ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Máximo crecimiento (mm)	Inhibición del crecimiento (%)
<i>Phytophthora helicoides</i>	5.0	85	5.6
<i>Pythium torulosum</i>	1.0	24	73.3
<i>Pythium pachycaule</i>	1.0	19	78.9
<i>Pythium aphanidermatum</i>	5.0	30	66.7
<i>Phytophthora hydrophatica</i>	1.0	31	65.6
<i>Phytophthora capsici</i>	5.0	18	80.0
<i>Phytophthora parsiana</i>	5.0	20	77.8
<i>Phytophthora lagoariana</i>	5.0	22	75.6
<i>Phytophthora virginiana</i>	5.0	24	73.3

Los organismos estudiados mostraron diferente respuesta de crecimiento en medio de cultivo V8 con metalaxil, ya que el análisis de correlación polinomial entre el crecimiento radial y la concentración de metalaxil indicó una relación negativa (Figura 5.1), de tal manera que la reducción del crecimiento en: *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora helicoides*, *Pythium torulosum*, *Phytophthora hydrophatica*, *Phytophthora virginiana*, *Phytophthora lagoariana*, *Phytophthora parsiana*, *Pythium pachycaule* y *Phytophthora capsici* se explicó ($P=0.05$) en 99.99, 99.99, 99.76, 98.19, 100, 97.95, 99.62, 88.11 y 99.93 %, respectivamente.

La resistencia de *Phytophthora helicoides* a metalaxil, encontrada en esta investigación, coincide con lo reportado por Feng et al. (2020), quienes obtuvieron que dicho organismo creció cuando metalaxil se agregó al medio de cultivo a concentración de $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

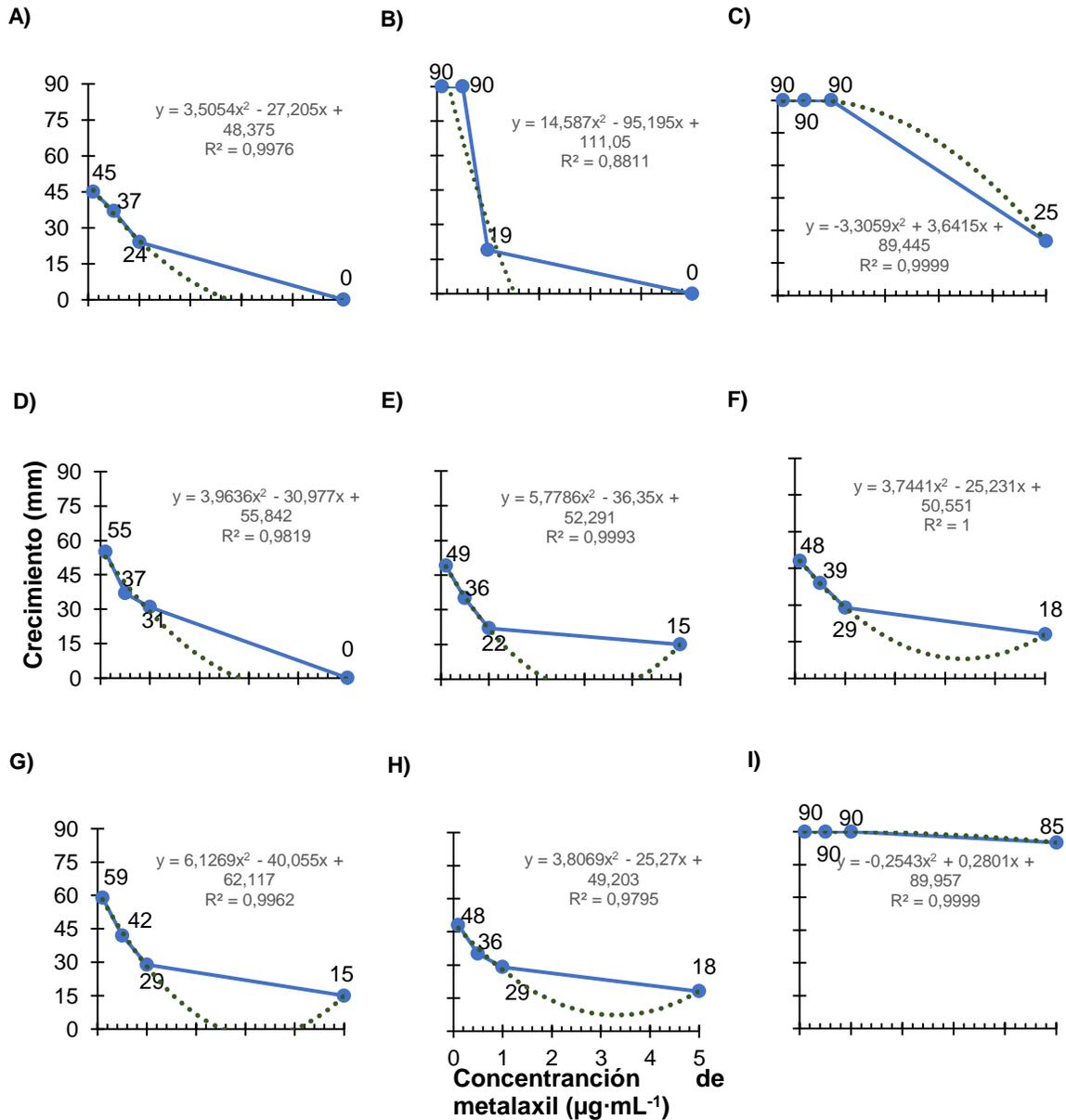


Figura 5.1. Interacción entre crecimiento radial de: A) *Pythium torulosum*; B) *Pythium pachycaule*; C) *Pythium aphanidermatum*; D) *Phytophthora hydropathica*; E) *Phytophthora capsici*; F) *Phytophthora virginiana*; G) *Phytophthora parsiana*; H) *Phytophthora lagoariana*, I) *Phytophthora helicoides* y concentración de metalaxil ($0.1, 0.5, 1$ y $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

CAPÍTULO VI. PLANTAS SILVESTRES HOSPEDANTES DE OOMICETES

Se determinó que tres diferentes plantas colectadas de sitios anegados por el agua de uso agrícola presentaban infección por oomicetes. Las plantas identificadas fueron: *Sagittaria lancifolia* con infección de *P. hydropathica* (TR21), *Polanisia dodecandra* que estaba infectada por *P. capsici* (MPV31) y *Eichhornia crassipes* que presentó daño por *P. torulosum* (PV1) (Figura 6.1). Esas malezas son endémicas del valle de Culiacán, Sinaloa y se encuentran creciendo en sitios de almacenamiento y transporte del agua de uso agrícola (Vega, 2021). Esas plantas son fuente de inóculo de los oomicetes que crecen y se reproducen en ellas, por esa razón, es pertinente tomar en consideración prevenir que dichas plantas crezcan en los sitios de almacenamiento y transporte del agua de uso agrícola e impedir que aporten inóculo de esos organismos fitopatógenos.

El análisis filogenético permitió conocer que el aislamiento obtenido de *Polanisia dodecandra* presentó 100% de similitud para *P. capsici*, mientras que los aislamientos del mismo organismo obtenidos de aguas para el uso agrícola la similitud encontrada fue de 99.48% para el aislamiento PC107, y de 99.7% para el aislamiento MJB72, lo que indicó que se trata de organismos no clones. El aislamiento conseguido de *Sagittaria lancifolia* mostró 97% de similitud para *P. hydropathica*, en comparación con los aislamientos provenientes de agua superficial que fue 98% para PS36, 98.5% para CR1, 99% de CR104 y 99.64% para AGUA79, lo que definió que también se trata de aislamientos no clonales. El aislamiento colectado de *Eichhornia crassipes* mostró 98% de igualdad a *P. torulosum*, cuya especie no fue colectada de agua superficial.

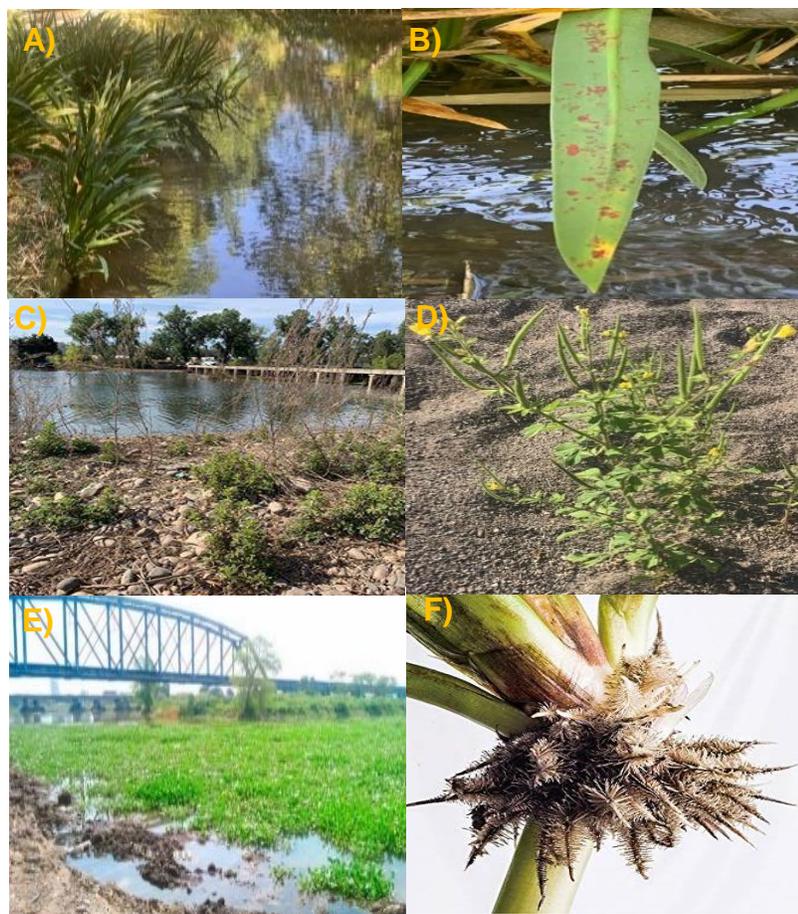


Figura 6.1. Plantas silvestres infectadas por oomicetes. A-B) *Sagittaria lancifolia*; C-D) *Polarisia dodecandra* y E-F) *Eichhornia crassipes*.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES

Se aislaron de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa los organismos *Phytophthora virginiana*, *Phytophthora parsiana*, *Phytophthora lagoariana*, *Phytophthora hydrophatica*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium torulosum*, *Pythium pachycaule* y *Phytopythium helicoides*, todos con capacidad de infectar plantas y frutos de tomate, chile y pepino con diferencia interespecífica en el nivel de severidad de la enfermedad.

Los organismos *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora hydrophatica*, *Phytophthora lagoariana*, *Pythium pachycaule*, *Phytophthora parsiana*, *Pythium torulosum* y *Phytophthora virginiana*, resultaron susceptibles a metalaxil a concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por lo que dicho fungicida es una opción viable para el control de los organismos que se trabajaron en esta investigación, excepto para *Phytopythium helicoides*, el cual resultó resistente.

Se colectaron tres malezas identificadas como *Eichhornia crassipies*, infectada por *Pythium torulosum*; *Polanisia dodecandra*, colonizada por *Phytophthora capsici*; y *Sagittaria lancifolia*, hospedante de *Phytophthora hydrophatica*, las cuales son endémicas del valle de Culiacán.

El agua empleada para el riego agrícola del distrito número 010 del valle de Culiacán, Sinaloa constituye un medio de dispersión de oomicetes fitopatógenos.

CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA

- Abad, G. 2008. (Enero 15, 2022). Methods for identification of *Phytophthora* species. Workshop: Fighting *Phytophthora*: how to detect, investigate, and manage *Phytophthora*. American Phytopathological Society Centennial Meeting.
- Abad, G., Ivors, K., Gallup, C., Abad, J. and Shew, H. 2011. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora globera* sp. nov. from tobacco in Brazil. *Mycologia* 103(2): 341-350. DOI: <https://doi.org/10.3852/09-157>.
- Abad, Z. G. and Balci, Y. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. United States of America. *Plant Disease* 96(8):1081-1103. DOI: 10.1094/PDIS-12-11-1036-FE.
- Abdelzaher, H. and Kageyama, K. 2020. Diversity of aquatic *Pythium* and *Phytopythium* spp. from rivers and a pond of Gifu city, Japan. *Novel Research in Microbiology Journal* 4(6): 1029-1044. DOI: <https://doi.org/10.21608/nrmj.2020.130851>.
- Actualización del plan director para la modernización integral del riego en el distrito de riego 010 Culiacán-Humaya, Sinaloa. Fecha de consulta enero de 2022.
- Adhikari, B; Hamilton, J; Zerillo, M; Tisserat, N; Lévesque, C. and Buell, C.R. 2013. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. *PloS one* 8(10):e75072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075072>.
- Afandi, A., Murayama, E., Yin-Ling, H., Suga, H. and Kageyama, K. 2018. Population structures of the water-borne plant pathogen *Phytopythium helicoides* reveal its possible origins and transmission modes in Japan. *PLoS ONE* 13(12). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209667>.
- (ACIS) Agricultura climáticamente inteligente en Sinaloa, México 2014. Consideraciones respecto a la agricultura climáticamente inteligente (CSA). 1:12. Consulta enero de 2022.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. Oxford. USA.

- Aguilar, G. A., Isabel, A., y Díaz, G. 2011. Estado, banca y crédito agrícola en Sinaloa y Sonora: el banco de Sinaloa y el banco agrícola Sonorense, 1933-1976. *Mundo Agrario* 11(22): 1-22. ISSN 1515-5994.
- Ah-Fong, A., Kim, K. and Judelson, H. 2017. RNA-seq of life stages of the oomycete *Phytophthora infestans* reveals dynamic changes in metabolic, signal transduction, and pathogenesis genes and a major role for calcium signaling in development. *BMC Genomics* 18(1) 110:120. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3585-x>.
- Aispuro, A. y Cordero, J. 2013. La vulnerabilidad del desarrollo urbano de Culiacán, Sinaloa, México. *Proyección* 15: 135-157. ISSN: 1852-0006.
- Al-Balushi, Z.M., Agrama, H., Al-Mahmooli, I.H., Maharachchikumbura, S.S. and Al-Sadi, A.M. 2018. Development of resistance to hymexazol among *Pythium* species in cucumber greenhouses in Oman. *Plant Disease* 102: 202-208.
- Alkher, H., islam, M. R., Wijekoon, C., Kalischuk, M., Kawchuk, L. M., Peters, R. D., Al-Mughrabi, K. I., Conn, K. L., Dobinson, K. F., Waterer, D. and Daayf, F. 2015. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Canada during 2012. *Canadian Journal of Plant Pathology* 37(3): 305–314. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1053987>.
- Almaraz, A., Alvarado, D. y Saavedra, L. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* 19(1): 5-12. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.062>.
- Al-Sadi, A., Al-Jabri, A., Al-Mazroui, S. and Al-Mahmooli, I. 2012. Characterization and pathogenicity of fungi and oomycetes associated with root diseases of date palms in Oman. *Crop Protection* 37: 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.011>.
- Al-Sheikh, H. 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(4): 347-352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.001>.

- Al-Sheikh, H. and Abdelzaher, H. 2012. Occurrence, identification and pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. diclinum*, *P. gissotocum* and *Pythium* "Group P" isolated from Dawmat AL-jandal Lake, Saudi Arabia. *Research Journal of Environmental Sciences* 6: 196-209.
- Álvarez, B., García, R. S., Valdez, J. B., León, J., Allende, R. y Fernández, S. P. 2017. *Phytophthora hydropathica* y *Phytophthora drechsleri* aisladas de canales de irrigación del valle de Culiacán. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(1): 1-20. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-1>.
- Álvarez, B., García, R., Benigno, J., León, J y Allende, R. 2018. Sensibilidad a metalaxyl y potencial patogénico de *Phytophthora hydropathica* aislada de canales de irrigación del valle de Culiacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6): 1149-1157.
- Álvarez, B., López, M. and Biosca, E. 2019. Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne. lytic bacteriophages. *Frontiers Microbiology* 10:2813. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02813.
- Aram, K. and Rizzo, D. 2018. Distinct trophic specializations affect how to *Phytophthora ramorum* and Clade 6 *Phytophthora* spp. colonize and persist on *Umbellularia californica* leaves in streams. *Phytopatology* 108: 858-869. DOI:10.1094/PHYTO-06-17-0196-R.
- Arora, R., Sharma, S. and Singh A. 2014. Late blight disease of potato and its management. *Potato Journal* 41(1): 16-40.
- Bala, K., Robideau, G., Desaulniers, N., De Cock, A. and Lévesque, C. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canadá. *Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 25: 22-31. DOI: <https://doi.org/10.3767/003158510X524754>.
- Barboza, E., Cabral, C., Rossato, M., Luz, E. and Reis, A. 2020. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Phytophthora palmivora* isolates causing flower rot on azalea. *Brazilian Journal of Microbiology* 51(4): 1493-1503. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00300-6>.

- Baten, M., Asano, T., Motohashi, K., Ishiguro, Y., Rahman, M., Inaba, S., Suga, H. and Kageyama, K. 2014. Phylogenetic relationships among *Phytopythium* species, and re-evaluation of *Phytopythium fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress* 13(4): 1145-1156. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-014-1003-1>.
- Beluzán, F; Miarnau, X; Torguet, L; Armengol, J. and Abad, P. 2022. Survey of oomycetes associated with root and crown rot of almond in Spain and pathogenicity of *Phytophthora niederhauserii* and *Phytopythium vexans* to 'Garnem' rootstock. *Agricultura* 12(2):294. <https://doi.org/10.3390/agricultura12020294>.
- Benítez, E., Moreno, B., Paredes, D., González, M., Campos, M. y Rodríguez, E. 2019. Infraestructuras ecológicas entre invernaderos: revegetación y calidad de suelos. *Ecosistemas* 28(3):54-62. DOI: 10.7818/ECOS.1800.
- Benfradj, N., Migliorini, D., Luchi, N., Santini, A. and Boughalleb, N. 2017. Occurrence of *Pythium* and *Phytopythium* species isolated from citrus trees infected with gummosis disease in Tunisia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50: 286-302. DOI:10.1080/03235408.2017.1305479.
- Bennett, R., Nam, B., Dedeles, G. and Thines, M. 2017. *Phytopythium leanoi* sp. nov. and *Phytopythium dogmae* sp. nov., *Phytopythium* species associated with mangrove leaf litter from the Philippines. *Acta Mycologica* 52(2). DOI: <https://doi.org/10.5586/am.1103>.
- Bennet, R.M. and Thines, M. 2020. An overview on Philippine estuarine oomycetes. *Philippine Journal of Systematic Biology* 14: 1-14.
- Bi, Y., Hu, J., Cui, X., Shao, J., Lu, X., Meng, Q. and Liu, X. 2014. Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. *Plant Pathology* 63(6): 1365-1373. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12220>.

- Blum, M., Boehler, M., Randall, E., Young, V., Csukai, M., Kraus, S., Moulin, F., Scalliet, G., Avrova, A., Whisson, S. and Fonne, R. 2010. Mandipropamid targets the cellulose synthase-like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 11(2): 227-243. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00604.x>.
- Bocco, S. and Csuros, M. 2016. Splice sites seldom slide: intron evolution in oomycetes. *Genome Biology and Evolution* 8(8): 2340–2350. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evw157>.
- Bora, N. and Young, C. 2019. *Phytophthora* and *Pythium* species (Oomycota) isolated from freshwater environments of Korea. *Mycobiology*. 1(10): 100-120. DOI:10.1080/12298093.2019.1625174.
- Bose, T., Hulbert, J., Burgess, T. and Paap, T. 2021. Two novel *Phytophthora* species from the southern tip of Africa. *Mycological Progress*. 20:755–767. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01702-y>.
- Burbano, D., Lagos, L., Álvarez, S. and Chañag, H. 2021. Sensitivity of *Phytophthora infestans* to aqueous extracts of *Lippia origanoides* and *Origanum vulgare*. *Agronomy Mesoamerican* 32(1): 149-162. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40573>.
- Bush, E.A., Hong, C. and Stromberg, E.L. 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a recycling irrigation system. *Plant Disease* 87: 1500-1506.
- Carbajal, A. y González, M. 2012. Título. In: Vaquero, R. M. P. y Toxqui, A. L. Agua para la salud. Pasado, presente y futuro. CSIC, España. 33-45pp. ISSN: 978-84-00-09572-7
- Chaloner, T., Gurr, S. and Bebbler, D. 2020. Geometry and evolution of the ecological niche in plant-associated microbes. *Nature Communications* 11(1): 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16778-5>.

- Chen, X., Liu, B., Xing, Y., Cheng, B., Liu, M., Tong, Y. and Xu, J. 2016. Identification and characterization of *Phytophthora helicoides* causing stem rot of *Shatangju mandarin* seedlings in China. *European Journal of Plant Pathology* 146(4): 715-727. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0952-4>.
- Chen, X. and Wang, Y. 2017. *Phytophthora sojae*. In: Wan F. *et al.* biological invasions and its management in China. *Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology* 13. DOI 10.1007/978-981-10-3427-5_15.
- Chen, Z; Yang, X; Xu, J; Jiaom, B; Li, Y; Xu, Y. and Dai T. 2021. First report of *Phytophthora helicoides* causing crown and root rot of *Rhododendron pulchrum* in China. *Plant Disease* 105(3):713-713. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1798-PDN>.
- Cheng, W., Lin, M., Qiu, M., Kong, L., Xu, Y., Li, Y., Wang, Y., Ye, W., Dong, S., He, S. and Wang, Y. 2019. Chitin synthase is involved in vegetative growth, asexual reproduction and pathogenesis of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora sojae*. *Environmental Microbiology* 21(12): 4537-4547. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14744>.
- Choi, Y; Beakes, G; Glockling, S; Kruse, J; Nam, B; Nigrelli, L; Ploch, S; Shin, H; Shivas, R; Telle, S; Voglmayr, H. and Thines, M. 2015. Towards a universal barcode of oomycetes—a comparison of the *cox1* and *cox2* loci. *Molecular ecology resources* 15(6):1275-128. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12398>
- Choudhary, C.E., Burgos, M.L., Moorman, G.W. and Hong, C. 2016. *Pythium* and *Phytophthora* species in two Pennsylvania greenhouse irrigation water tanks. *Plant Disease* 100: 926-932.
- Cline, E., Farr, D. and Rossman, A. 2008. A synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress* 3-13. DOI: 10.1094/PHP-2008-0318-01-RS.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2018. Estadísticas del agua en México. 1-306.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2019. Distrito de riego 010 Culiacán-Humaya, Sinaloa.

- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2019. Gerencia de Distritos de Riego. Estadísticas agrícolas de los distritos de riego en México.
- CODESIN (Consejo para el desarrollo económico de Sinaloa). 2018. Agricultura en Sinaloa al 2018. 1:3.
- CODESIN (Consejo para el desarrollo económico de Sinaloa). 2020. Agricultura en Sinaloa al 2020. 1:3.
- Cook, R. and Zhang, B. 1985. Degrees of sensitivity to metalaxyl within the *Pythium* spp. pathogenic to wheat in the Pacific Northwest. *Plant Disease* 69: 686-688.
- Cooke, D; Drenth, A; Duncan, J; Wagels, G. and Brasier, C. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal genetics and biology* 30(1):17-32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Corrales, L., Sánchez, C. y Quimbayo, M. 2018. Microorganismos potencialmente fitopatógenos en aguas de riego proveniente de la cuenca media del río Bogotá. *NOVA* 16 (29): 71-89.
- Crone, M., McComb, J., O'Brien, P. and Hardy, G. 2013. Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata, and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species. *Fungal Biology* 117(2): 112-123. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.004>.
- Danies, G., Myers, K., Mideros, M., Restrepo, S. and Martin, F. 2014. An ephemeral sexual population of *Phytophthora infestans* in the Northeastern United States and Canada. *PLoS ONE* 9(12): 1-21. DOI: 10.1371/journal.pone.011663.
- De Cock, A., Lodhi, A., Rintoul, T., Bala, K., Robideau, G., Abad, Z. and Lévesque, C. 2015. *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 34: 25-39.
- Del Castillo, J., Cárdenas, M., Pinzón, A., Castañeda, A., Bernal, A. and Restrepo, S. 2013. Developing a taxonomic identification system of *Phytophthora* species based on microsatellites. *Revista Iberoamericana de Micología* 30(2): 88-95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.11.002>.

- De Jesus, A; Gonçalves, D; Rocha, S; Marano, A; Jerónimo, G; De Souza, J. and Pires, C. 2016. Morphological and phylogenetic analyses of three *Phytophthium* species (Peronosporales, Oomycota) from Brazil. *Cryptogamie Mycologie* 37(1):117-128. <https://doi.org/10.7872/crym/v73.iss1.2016.117>.
- Del Castillo, J., Belayneh, B., Ritsvey, A., Koivunenb, E.E., Cox, J.L. and Sweet, C.L. 2019. Enabling adaptation to water scarcity: identifying and managing root disease risks associated with reducing irrigation inputs in greenhouse crop production - A case study in poinsettia. *Agricultural water management* 20: 1-11.
- Dervis, S; Turkolmez, S; Cifci, O; Ozer, G; Ulubas, C. and Dikilitas, M. 2020. *Phytophthium litorale*: a novel killer pathogen of plane (*Platanus orientalis*) causing canker stain, root and collar rot. *Plant Disease* 104(10):2642-2648. [10.1094/pdis-01-20-0141-re](https://doi.org/10.1094/pdis-01-20-0141-re).
- Díaz, M., Rodríguez, G., Silva, H. V., Pedraza, M., Garciglia, R. y Fernández, S. 2011. Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 431-443.
- Dick, M. 1972. Morphology and taxonomy of oomycetes, with special reference to *Saprolegniaceae*, *Leptomitaceae* and *Pythiaceae*. *New Phytology* 71: 1151-1159.
- Dickie, I., Wakelin, A., Martinez, L., Richardson, S., Makiola, A. and Tylianakis, J. 2017. Oomycetes during 120,000 years of temperate rainforest ecosystem development. *BioRxiv* 1-29. DOI: <https://doi.org/10.1101/042341>.
- Donati, I; Cellini, A; Sangiorgio, D; Caldera, E; Sorrenti, G. and Spinelli F. 2020. Pathogens associated to kiwifruit vine decline in Italy. *Agriculture* 10(4):119. <https://doi.org/10.3390/agriculture10040119>.
- Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Drenth, A. y Guest, D. 2013. *Phytophthora*: la destructora de plantas. *Palmas* 34(1): 1-8.

- Duarte, J., Alzate, D., Ramirez, A., Santa, J., Fajardo, A. and Soto, M. 2018. Evaluating late blight severity in potato crops using unmanned aerial vehicles and machine learning algorithms. *Remote Sensing* 10(10): 1-17. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs10101513>.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 562p.
- Espinosa, B., Flores, H., Ascencio, R., Carrillo, G., Espinosa, E., Flores, H. y Carrillo, A. 2016. Diseño de un sistema de riego hidrante parcelario con los métodos por Turnos y Clement: análisis técnico y económico. *Terra latinoamericana* 34(4): 431-440.
- Fatemeh, S. and Reza, M. 2019. Three new *Pythium* species from rice paddy fields, *Mycologia* 111(2): 274-290. DOI: 10.1080/00275514.2018.1543486.
- Fawke, S., Doumane, M. and Schornack, S. 2015. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79(3): 263-280. DOI: <https://doi.org/10.1128/membr.00010-15>.
- Feng, H., Chen, J., Yu, Z. and Li, K. 2020. Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Pythium* and *Phytophythium* spp. associated with soybean in the Huang-Huai region of China. *Plant Pathology* (69):1083–1092.
- Fernández, A. 2012. El agua: un recurso esencial. *Química Viva* 11(3): 147-170. E-ISSN: 1666-7948.
- Frankel, S. J., Conforti, C., Hillman, J., Ingolia, M., Shor, A., Benner, D., Alexander, J. M., Bernhardt, E. and Swiecki, T. J. 2020. *Phytophthora* introductions in restoration areas: responding to protect California native flora from human-assisted pathogen spread. *Forests* 11: 1-21.
- Fry, W., Grunwald, D., De Cooke, A., McLeod, G. and Forbes K. 2009. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: Lamour, K. and Kamoun, S. *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tool*. 139-164pp. <https://doi.org/10.1002/9780470475898.ch7>.

- Fry, W. E. and Grünwald, N. J. 2010. Introducción a los Oomicetes. Trans. Valencia-Botín, A. J. 2012. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0220-01.
- Fry, W., Patev, S., Myers, K., Bao, K. and Fei, Z. 2019. *Phytophthora infestans* sporangia produced in culture and on tomato leaflet lesions show marked differences in indirect germination rates, aggressiveness, and global transcription profiles. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32(5): 515–526. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-18-0255-TA>.
- Gachomo, E., Jimenez, J., Kayodé, A., Baba, L. and Kotchoni, S. 2012. Control of major diseases in horticulture. *In: Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. and Panneerselvam, A. Fungicides for plant and animal diseases. IntechOpen* 167-180 pp.
- Galiana, E., Cohen, C., Thomen, P., Etienne, C. and Noblin, X. 2019. Guidance of zoospores by potassium gradient sensing mediates aggregation. *Journal of the Royal Society Interface* 16(157). DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0367>.
- Ghimire, S., Richardson, P., Kong, P., Hu, J., Lea-Cox, J., Ross, D., Moorman, G. y Hong, C. 2011. Distribution and diversity of *Phytophthora* species in nursery irrigation reservoir adopting water recycling system during winter months. *Journal of Phytopathology* 159(12): 713–719. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01831.x>.
- Gómez, D. y Kemen, E. 2021. Predicting lifestyle from positive selection data and genome properties in oomicetes. *Pathogens* 10(7): 1-24. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10070807>.
- Goncalves, D., De Jesús, A., Rocha, S., Marano, A. and Pires-Zottarelli, C. 2016. New records of *Pythium* (oomicetes, straminipila) for South America based on morphological and molecular data. *Nova Hedwigia* 103(2): 1-12. DOI: https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2016/0336.

- Granke, L. and Hausbeck, M. 2010. Effects of temperature, concentration, age, and algaecides on *Phytophthora capsici* zoospore infectivity. *Plant Disease* 94(1): 54-60. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0054>.
- Grijalba, P.E. y Ridao, A.C. 2017. Control químico de *Pythium* spp. en plántulas de soja. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 43: 67-71.
- Grijalba, P., Ridao, A. and Steclow, M. 2021. Oomicetes species associated with soybean in Buenos Aires Province (Argentina). *Springer* 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12600-021-00921-z>.
- Hahn, F. 2011. Manejo automático de malla sombra y del riego en un invernadero con tomates. *Scientia Agropecuaria* 2: 31-37.
- Hansen, E. 2015. *Phytophthora* species emerging as pathogens of forest trees. *Current Forestry Reports* 1(1): 16-24. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40725-015-0007-7>.
- Hardham, A. and Blackman, L. M. 2018. Pathogen profile update *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 19(2):260-285. DOI: 10.1111/mpp.12568.
- Hassanisaadi, M., Shahidi, G. H., Hosseinipour, A., Abdolshahi, R., Barka, E. A. and Saadoun, I. 2021. Biological control of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of tomato root rot by two *Streptomyces* root symbionts. *Agronomy* 11(5): 846. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050846>.
- Hernández, A., Cerna, J., Delgado, M., Beltrán, L., Tapia, M. and Ochoa, Y. 2019. First report of *Phytopythium vexans* causing the “Avocado sadness” in Michoacán, México. *International Journal of Experimental Botany* 88: 11-13. DOI: 10.32604/phyton.2019.04608.
- Herrero, M. L., Brurberg, M. B., Ojeda, D. I. and Roleda, M. Y. 2020. Occurrence and pathogenicity of *Pythium* (Oomycota) on *Ulva* species (Chlorophyta) at different salinities. *Algae* 35: 79-89.
- Ho, H. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access* 6(1): 40-45. DOI: <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00174>.

- Hong, C. X. and Moorman, G. W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24(3): 189–208- DOI: <https://doi.org/10.1080/07352680591005838>.
- Hong, C., Richardson, P. and Kong, P. 2008. Pathogenicity to ornamental plants of some existing species and new taxa of *Phytophthora* from irrigation water. *Plant Disease* 92: 1201-1207.
- Hong, C. X., Gallegly, M. E., Richardson, P. A., Kong, P., Moorman, G. W., Lea-Cox, J. D. and Ross, D. S. 2010. *Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. *Plant Pathology* 59(5): 913-921. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02323>.
- Hu, J. and Li, Y. 2014. Inheritance of mefenoxam resistance in *Phytophthora nicotianae* populations from a plant nursery. *European Journal of Plant Pathology* 139(3): 545–555. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0410-0>.
- Cadenas, C. y Huallanca, C. 2014. Control de *Phytophthora capsici* Leonian en *Capsicum annuum* cv. Papri king con fungicidas, fertilizantes y biocontroladores. *Anales Científicos* 75 (1): 130-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v75i1.943>.
- Jabiri, S., Bahra, C., Maclean, D., Radouane, N., Barka, E., Bendriss, M. and Lahlali, R. 2021. *Phytophthora vexans* associated with apple and pear decline in the saiss plain of Morocco. *Microorganisms* 9(9): 1-18. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091916>.
- Jankowiak, R., Stepniewska, H. and Bilanski, P. 2015. Notes on some *Phytophthora* and *Pythium* species occurring in oak forests in southern Poland. *Acta Mycologica* 50(1): 1-10. DOI: <https://doi.org/10.5586/am.1052>.
- Jeffers, S. N. and Martin, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70: 1038-1043.
- Jeffers, S. N. 2006. Identifying species of *Phytophthora*. *Plant Disease* 83(12):1129-1136.

- Jia, C., Li, L., Wen, Y., Yuan, W. and Xiao, Z. 2017. *Pythium cedri* sp. nov. (*Pythiaceae-Pythiales*) from southern China based on morphological and molecular characters. *Phytotaxa* 309(2): 135-142. DOI: <http://www.mapress.com/j/pt>.
- Jones, L., Worobo, R. and Smart, C. 2014. Plant-pathogenic oomycetes, *Escherichia coli* strains, and *Salmonella* spp. frequently found in surface water used for irrigation of fruit and vegetable crops in New York State. *Applied and Environmental Microbiology* (16): 4814-4820. DOI: 10.1128/AEM.01012-14.
- Judelson, H. S. 2012. Dynamics and innovations within oomycete genomes: insights into biology, pathology, and evolution. *Eukaryotic Cell* 11(11): 1304-1312. DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.00155-12>.
- Judelson, H. S. and Ah-Fong, A. M. 2019. Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease. *Plant Physiology* 179(4): 1198-1211. DOI: 10.1104/pp.18.00979.
- Kachour, L., Gacemi, D., Loucif, L. and Alayat, H. 2016. First survey of aquatic microbial fungi-like pythiaceae predominantly colonizing the South-Mediterranean Freshwater Wetlands. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 7: 3067-3078.
- Kageyama, K. 2014. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *Journal of General Plant Pathology* 80(4): 314-326. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0526-2>.
- Kammarnjesadakul, P., Palaga, T., Sritunyalucksana, K., Mendoza, L., Krajaejun, T., Vanittanakom, N., Tongchusak, S., Denduangboripant, J. and Chindamporn, A. 2011. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). *Medical Mycology* 49(3): 289-295. DOI: <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.511282>.
- Kang, D. S., Min, K. J., Kwak, A. M., Lee, S. Y. and Kang, H. W. 2017. Defense response and suppression of Phytophthora blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. *Plant Pathology* 33(3):264-275. DOI: 10.5423/PPJ.OA.02.2017.0030.

- Kerio, S., Kerio, H., Daniel, S., Daniels, A., Gómez, M., Tabima, J., Lenz, R., Lenz, K., Sondrelik, L., Grunwald, N., Williams, N., McDougal, J. and LeBoldus, J. 2019. From genomes to forest management – tackling invasive *Phytophthora* species in the era of genomics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42(1): 1-29. DOI: 10.1080/07060661.2019.1626910.
- Kiiker, R., Hansen, M., Williams, I., Cooke, D. and Runno, E. 2018. Outcome of sexual reproduction in the *Phytophthora infestans* population in Estonian potato fields. *European Journal of Plant Pathology* 152(2): 395–407. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1483-y>.
- Kong, P. and Hong, C. 2010. Zoospore density-dependent behaviors of *Phytophthora nicotianae* are autoregulated by extracellular products. *Phytopathology*. 100(7): 632-637. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-7-0632>.
- Kox, L., Van Brouwershaven, I., Van de Vossenbergh, B., Van Den Beld, H., Bonants, P. and De Gruyter, J. 2007. Diagnostic values and utility of immunological, morphological, and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 97(9): 1119-1129. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1119>.
- Kroon, L., Bakker, F., Van Den, G., Bonants, P. y Flier, W. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41(8): 766-782. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.03.007>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lacasa, C., Martínez, V., Hernández, A., Ros, C., Lacasa, A., Guerrero, M., Rodríguez, M., Serrano, P. and Larregla, S. 2015. Survival reduction of *Phytophthora capsici* oospores and *P. nicotianae* chlamydospores with *Brassica* green manures combined with solarization. *Scientia Horticulturae* 197: 607-618. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.024>.

- Lamour, K., Stam, R., Jupe, J. and Huitema, E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 329-337. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>.
- Lara, E. and Belbahri, L. 2011. SSU rRNA reveals major trends in oomycete evolution. *Fungal Diversity* 49: 3–100. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0098-9>.
- Legeay, J., Husson, C., Cordier, T., Vacher, C., Marcais, B. and Buée, M. 2019. Comparison and validation of oomycetes metabarcoding primers for *Phytophthora* high throughput sequencing. *Journal of Plant Pathology* 101(3): 743-748. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00276-9>.
- Lehtijarvi, A., Aday, A., Woodward, S., Jung, T. and Dogmus, H. 2017. Oomycota species associated with deciduous and coniferous seedlings in forest tree nurseries of Western Turkey. *Forest Pathology* 47(5): 12-36. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12363>.
- Li, P., Cao, S., Dai, Y., Li, X., Xu, D., Guo, M., Pan, Y. and Gao, Z. 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* (*Pythiaceae*) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4285-4296. DOI: <https://doi.org/10.4238/2012.December.17.4>.
- Lin, X., Wang, S., De Rond, L., Bertolin, N., Wouters, R., Wouters, D., Domazakis, E., Bitew, M., Win, J., Dong, S., Visser, R., Birch, P., Kamoun, S. and Vleeshouwers, V. 2020. Divergent evolution of PcF/SCR74 effectors in oomycetes is associated with distinct recognition patterns in solanaceous plants. *MBio* 11(3): 1-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00947-20>.
- López, C., Campos, C., Peñuelas, C., Arteaga, T., Ruiz, C., Gómez, M., Palmero, D. 2013. Presencia de aislamientos homotáticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México. *Información Técnica Económica Agraria*. 109: 408-414. DOI: [10.12706/itea.2013.024](https://doi.org/10.12706/itea.2013.024).

- Loyd, A., Benson, D. and Ivors, K. 2014. *Phytophthora* populations in nursery irrigation water in relationship to pathogenicity and infection frequency of *Rhododendron* and *Pieris*. *Plant Disease* 98(9): 1213-1220. DOI: 10.1094/PDIS-11-13-1157-RE.
- Lozoya, H., Robledo, M., Rivas, P., Islas, S., Colinas, S. y León, M. 2017. Sensitivity to fungicides of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 20 (1): 1-10.
- Marano, A. 2014. A new combination in *Phytophythium*: *P. kandeliae*. *Mycosphere*. 5(4): 510–522. DOI: <https://doi.org/10.5943/mycosphere/5/4/3>.
- Marciulynas, A., Marciulyniene, D., Lynikiene, J., Gedminas, A., Vaiciukyne, M. and Menkis, A. 2020. Fungi and oomycetes in the irrigation water of forest nurseries. *Forests* 11(4). DOI: <https://doi.org/10.3390/F11040459>.
- Marin, M., Seijo, T., Mertely, J. and Peres, N. 2018. First report of crown rot caused by *Phytophythium helicoides* on strawberry in the Americas. *Plant Disease* 103(10): 2696.
- Martin, F. N., Tooley, P. W. and Blomquist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94(6): 621-31. DOI: 10.1094/phyto.2004.94.6.621.
- Martin, M., Cappellini, E., Samaniego, J., Zepeda, M., Campos, P., Seguin, A., Wales, N., Orlando, L., Ho, S., Dietrich, F., Mieczkowski, P., Heitman, J., Willerslev, E., Krogh, A., Ristaino, J. and Gilbert, M. 2013. Reconstructing genome evolution in historic samples of the Irish potato famine pathogen. *Nature Communications* 4: 2172. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms3172>.
- Martínez, J. 2015. Efectores de oomicetes fitopatogénicos: en la primera línea de ataque. *Fitosanidad* 19 (3): 251-257. ISSN: 1562-3009.
- Martínez, F.E., Cervantes, L., Hernández, L.G., Sánchez, C.L. y Rueda, E.O. 2016. Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la zona árida del noroeste de México: la Importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal* 12: 232-241.

- Martins, P., Merfa, M., Takita, M. and De Souza, A. 2018. Persistence in phytopathogenic bacteria: ¿Do we know enough? *Frontiers Microbiology*. 9: 1099. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01099.
- Matsiakh, I., Oszako, T., Oszako, K., Volodymyr, J. and Nowakowska, J. 2016. *Phytophthora* and *Pythium* species detected in rivers of the Polish-Ukrainian border areas. *Baltic Forestry* 22: 230-238.
- Matson, M., Small, I., Fry, W. and Judelson, H. 2015. Metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: assessing role of RPA190 gene and diversity within clonal lineages. *Phytopathology* 105(12): 1594-1600. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-15-0129-R>.
- Matthiesen, R., Ahmad, A. and Robertson, A. 2016. Temperature affects aggressiveness and fungicide sensitivity of four *Pythium* spp. that cause soybean and corn damping off in Iowa. *Plant Disease* 100: 583-591. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0487-RE>.
- McGowan, J., O'hanlon, R., Owens, R. and Fitzpatrick, D. 2020. Comparative genomic and proteomic analyses of three widespread *Phytophthora* species: *Phytophthora chlamydospora*, *Phytophthora gonapodyides* and *Phytophthora pseudosyringae*. *Microorganisms*. 8(5): 100-120. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050653>.
- Medrano, H., Bota, J., Flexas, J., Ribas, M. y Gulías, J. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones geográficas* 43: 63-84.
- Meng, Y., Zhang, Q., Ding, W. and Shan, W. 2014. *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology* 5(2): 43-51. DOI: <https://doi.org/10.1080/21501203.2014.917734>.
- Miao, J., Liu, X., Du, X., Li, G., Li, C., Zhao, D. and Liu, X. 2020. Sensitivity of *Pythium* spp. and *Phytopythium* spp. and tolerance mechanism of *Pythium* spp. to oxathiapiprolin. *Pest Management Science* 76(12): 3975–3981. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.5946>

- Molina, M.C., Morales, M.C., Osorio, C., Núñez, E., Verdejo, E., Duarte and M.S., Toro, J. 2010. *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of root and crown rot (Tristeza disease) of red pepper in La Vera region (Cáceres, Spain). Spanish Journal of Agricultural Research 8: 770-744.
- Moreno, A. S. 2011. Operación del distrito de riego 010 en condiciones de contingencia climática. Memorias del XVI Congreso Nacional de Irrigación. Edición 1ra. Culiacán, Sinaloa.
- Moreno, S., Sánchez, A., Castañeda, S. y Montiel, A. 2018. Análisis comparativo de la operación del distrito de riego 010 Culiacán Humaya en seis ciclos agrícolas. Memorias del IV Congreso Nacional de Riego y Drenaje COMEII.
- Monforte, G. y Cantú, C. 2009. Escenario del agua en México. Recursos Hídricos 6(30): 1-10.
- Montiel, M. A. y Armenta, S. M. 2018. Análisis comparativo de la operación del distrito de riego 010 Culiacán-Humaya en seis ciclos agrícolas. Memorias del V Congreso Nacional de Riego y Drenaje COMEII-18021.
- Montiel, G. M. y Velázquez, S. L. F. 2019. Análisis histórico de la eficiencia a nivel de punto de control del módulo de riego IV-1 "Culiacancito" A.C. Memorias del V Congreso Nacional de Riego y Drenaje COMEII.
- Montiel, M. A. y Armenta, S. M. 2021. Impacto del bombeo del agua de rescate en la operación del distrito de riego 010 Culiacán-Humaya, Sinaloa. COMEII-21045.
- Morris, K. A., Langston, D. B., Dutta, B., Davis, R. F., Timper, P., Noe, J. P. and Dickson, D. W. 2016. Evidence for a disease complex between *Pythium aphanidermatum* and root-knot nematodes in cucumber. Plant Health Progress 17(3): 200-201. DOI:10.1094/php-br-16-0036.
- Nam, B. and Choi, Y. 2019. *Phytophythium* and *Pythium* species (Oomycota) isolated from freshwater environments of Korea. Mycobiology 47(3):261-272. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1625174>.
- (NCBI) National Center of Biotechnology Information. 1988. Sequence analysis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2020.

(NCBI) National Center of Biotechnology Information. 2022. WWW.NCBI.COM.

- Nessbitt, H., Malajczuk, N. and Glenn, A. 1979. Effect of organic matter on the survival of *Phytophthora cinnamomi* rands in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 11(2): 133-136. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(79\)90089-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(79)90089-0).
- Nongnuch, V. A., Jidapa, S. B., Sophit, K. C., Pritsana, S. A., Pramote, V. D., Fisher, M.C. 2014. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. *International Journal of Medical Microbiology* 304: 321-326.
- Norzagaray, M., García, C., Llanes, O., Troyo, E. y Muñoz, P. 2010. Análisis de la producción agrícola extensiva en Sinaloa: alternativas para el uso sostenible del agua. *Ra Ximhai* 6(1): 45-50. ISSN: 1665-0441.
- Ochoa, Y.M., Hernández, A., Delgado, J.C., Beltrán, M., Tapia, L., Hernández, O. and Cerna, E. 2018. First report of avocado tree wilt by *Pythium amazonianum* in México. *Ciencia e Investigación Agraria* 45: 301-305.
- Oudemans, P.V. 1999. *Phytophthora* species associated with cranberry root rot and surface irrigation water in New Jersey. *Plant Disease* 83: 251-258.
- (FAO) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2019. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. Roma: 1-200.
- Oviedo, J. and Mattos, L. 2018. Identificación biomolecular y patogenicidad de *Phytophthora*, *Pythium* y *Phytopythium* aislados de raíz y suelo en cítricos (*Citrus* spp.) *Anales científicos* 79 (2): 393–400. DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v79i2.903>.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G., Cano, L., Raffaele, S., Banfield, M., Jones, A., Kamoun, S. and Saunders, D. 2013. From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biology* 14(211): 1-10. DOI: 10.1186/gb-2013-14-6-211.

- Parke, J., Redekar, N.R., Eberhart, J.L., and Funahashi, J. 2019. Hazard analysis for *Phytophthora* species in container nurseries: three case studies. HortTechnology 29: 745-755.
- Plotnikov, K., Ryabinina, V., Khodakova, A. and Blazhko, N. 2019. Viral load distribution of cucumber green mottle mosaic virus in leaves. Advances in Social Science, Education and Humanities Research 393: 310-312.
- Quesada, L., Granke, L., Mercier, M., Olsen, J. and Hausbeck, M. 2011. Investigating the genetic structure of *Phytophthora capsici* populations. Phytopathology 101(9): 1061-1073. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0325>.
- Quevedo, A., Bustos, Y. A., Rangel, G. y Sanhouse, A. 2016. Evaluación de la calidad del agua de un embalse tropical en la cuenca del Río Culiacán.
- Rabuma, T; Gupta, O. P. and Chhokar, V. 2020. Phenotypic characterization of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) under *Phytophthora capsici* infection and analysis of genetic diversity among identified resistance accessions using SSR markers. Physiological and Molecular Plant Pathology 112: 100-120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101539>.
- Rai, G. S. and Guest, D. I. 2020. Drainage, animal manures and fungicides reduce *Phytophthora* wilt (caused by *Phytophthora capsici*) of chilli (*Capsicum annuum* L.) in Bhutan. Australasian Plant Pathology 50: 169-177.
- Rafiee, V. and Banihashemi, Z. 2013. Formation of chlamydospores in *Phytophthora parsiana* in vivo and in vitro as survival propagules in Iran. Journal of Plant Pathology 49(3): 109-133.
- Ramadan, A. and Kenta, S. 2018. Technical review of molecular markers and next-generation sequencing technology to manage plant pathogenic oomycetes. African Journal of Biotechnology 17(12): 369–379. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajb2017.16304>.
- Ramírez, J., Cárdenas, M., Guevara, M., Duarte, D., Victorino, L., Argüello, B., Gutiérrez, E. and Restrepo, S. 2021. Oomycete species associated with *Theobroma cacao* crops in Colombia. Plant Pathology 70(7): 1695-1707. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13410>.

- Ramírez, S., Ibarra, C.I. y Leos, J.A. 2021. Evaluación de la administración de la infraestructura de riego por parte de las asociaciones de usuarios de módulos de riego: el caso de Culiacán 010, módulos I-3 y IV-3, 2011-2017. *Acta universitaria* 31: 1-21. DOI: <http://doi.org/10.15174/au.2021.2807>.
- Redekar, N., Eberhart, J. and Parke, J. 2019. Diversity of *Phytophthora*, *Pythium*, and 10 *Phytopythium* species in recycled irrigation water in a container nursery. *Phytobiomes* 3(1): 31-45. DOI: 10.1094/pbiomes-10-18-0043-r.
- Reeser, P., Sutton, W., Hansen, E., Remigi, P. and Adams, G. 2011. *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia* 103(1): 22-35. DOI: <https://doi.org/10.3852/10-013>.
- Rekad, F., Cooke, D., Puglisi, I., Randall, E., Guenaoui, Y., Bouznad, Z., Evoli, M., Pane, A., Schena, L., Magnano, G. and Cacciola, S. 2017. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in northwestern Algeria during 2008–2014. *Fungal Biology* 121(5): 467-477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.01.004>.
- Reyes, A., Vallejo, R., Santillán, R., Rodríguez, G., Larsen, J. and Fernández, S. P. 2018. *Pythium arrhenomanes* causal agent of root rot on yellow maize in México. *Australasian Plant Disease* 13: 6. DOI: 10.1007/s13314-018-0291-8.
- Richards, T., Dacks, J., Jenkinson, J., Thornton, C. and Talbot, N. 2006. Evolution of filamentous plant pathogens: gene exchange across Eukaryotic Kingdoms. *Current Biology* 16(18): 1857-1864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.052>.
- Ridge, G., Jeffers, S., Bridges, W. and White, S. 2013. *In situ* production of zoospores by five species of *Phytophthora* in aqueous environments for use as inocula. *Plant Disease* 98(4): 551-558. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0591-RE>.
- Ristaino, J., Madritch, M., Trout, C. and Parra, G. 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(3): 948-954.

- Ristvey, A. G., Belayneh, B. E. and Lea, J. 2019. A comparison of irrigation-water containment methods and management strategies between two ornamental production systems to minimize water security threats. *Journal Water* 11(12): 2558. DOI: 10.3390/w11122558.
- Rivas, T., González, R., Chiquito, R., Reyes, J., González, U., Hernández, L. and Murillo, B. 2020. Biocontrol of phytopathogens under aquaponics systems. *Water*. 12(7): 2061. DOI:10.3390/w12072061.
- Rivera, C. y Fernández, S. 2017. Técnica de evaluación para damping-off en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) infectado por *Pythium aphanidermatum*. *Tecnociencia* 11: 41-47.
- Robledo, D.O. 2016. Enfermedad de damping-off en plántulas de lechuga: un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias* 13: 680-685.
- Rodríguez, C., Siverio, F., Pérez, A. and Rodríguez, A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytopythium vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57(1): 89-106. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022.
- Rojas, A., Rojas, J., Jacobs, L., Napieralski, S., Karaj, B., Bradley, C., Chase, T. and Esker, P. 2017. Oomycete species associated with soybean seedlings in NorthAmerica-part I: identification and pathogenicity characterization. *Phytopathology* 107 (3): 280-292. DOI: 10.1094/PHYTO-04-16-0177-R.
- Rojas, J., Witte, A., Noel, Z., Jacobs, J. and Chilvers, M. 2019. Diversity and characterization of oomycetes associated with corn seedlings in Michigan. *Phytobiomes Journal* 3(3): 224-234. DOI: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-18-0059-R>.
- Ruíz, J., Berdúo, J. y Sánchez, A. 2018. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* colectados en zonas productoras de papa y tomate de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud* 5(2): 1-9.

- Saelee, R., Busarakam, K. y Koohakan, P. 2021. Caracterización morfológica y filogenia de *Pythium* y géneros relacionados en la provincia de Rayong, Tailandia. *Ciencia y Tecnología Aplicada Actual*. 1: 132-153.
- Salmaninezhad, F. and Ghalamfarsa, M. 2019. Phenotypic plasticity of the isolates assigned to *Pythium plurisporium*. *Mycologia Iranica* 6: 59-71.
- Sanzani, S., Li, M., Faedda, R., Cacciola, S. and Schena, L. 2014. Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. *Journal of Phytopathology* 162(1): 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12147>.
- Saville, A. C. and Ristaino, J. B. 2021. Global historic pandemics caused by the FAM-1 genotype of *Phytophthora infestans* on six continents. *Scientific Reports* 1: 12-35. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90937-6>.
- Savory, A., Grenville, L., Wawra, S., Van West, P. and Davidson, F. 2014. Auto-aggregation in zoospores of *Phytophthora infestans*: the cooperative roles of bioconvection and chemotaxis. *Journal of the Royal Society Interface* 11: 20140017. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0017>.
- Schena, L., Duncan, J. and Cooke, D. 2008. Development and application of a PCR-based “molecular toolbox” for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57(1): 64-75. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01689.x>.
- (SIAP) Servicio de información agroalimentaria y pesquera. 2021. Panorama agroalimentario. México. Consulta enero de 2022.
- Sevda, R; Masoud, A. and Youbert G. 2021. Taxonomic and pathogenic characterization of *Phytophthora* species from west Azarbaijan, Iran, and description of two new species. *Mycologia* 113(3):612-628. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1853986>.

- Shakya, S. K., Grünwald, N. J., Fieland, V. J., Knaus, B. J., Weiland, J. E., Maia, C., Drenth, A., Guest, D. I., Liew, E. C. Y., Crane, C., Chang, T. T., Fu, C. H., Minh Chi, N., Quang Thu, P., Scanu, B., Von Stowasser, E. S., Durán, A., Horta Jung, M. and Jung, T. 2021. Phylogeography of the wide-host range panglobal plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Ecology* 30(20): 5164–5178. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.16109>.
- Sharma, M., Ghosh, R., Tarafdar, A. and Telangre, R. 2015. An efficient method for zoospore production, infection and real-time quantification of *Phytophthora cajani* causing *Phytophthora* blight disease in pigeonpea under elevated atmospheric CO₂. *BMC Plant Biology* 15: 90. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0470-0>.
- Shetty, H. S., Suryanarayan, S. M., Jogaiah, S., Janakirama, A., Hansen, M., Jorgensen, H. and Tran, S. P. 2019. Bioimaging structural signatures of the oomycete pathogen *Sclerospora graminicola* in pearl millet using different microscopic techniques. *Scientific Reports* 9: 15175. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51477-2>.
- Sims, L., Sutton, W., Reeser, P. and Hansen, E. 2015. The *Phytophthora* species assemblage and diversity in *Riparian alder* ecosystems of western Oregon, USA. *Mycologia* 107: 889-902.
- Slater, B., Mcloughlin, S. and Hilton, J. 2014. Oomicetes and their role in Late Palaeozoic-Early Mesozoic ecosystems. 10th New Phytologist Workshop. Fecha de consulta enero de 2022.
- Slavov, S., Lyubenova, A., Kostov, K. and Christova, P. 2018. Oomycetes from genus *Pythium* found in water and soil samples in Bulgaria. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans* 21: 161-171.
- Soto, P.A., Rodríguez, A.G., Fernández, Y.L., Pedraza, M.E., López, P., Díaz, S.M. y Fernández, S.P. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(8): 1867-1880. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>

- Stewart, S., Wickramasinghe, D., Dorrance, A. and Robertson, A. 2011. Comparison of three microsatellite analysis methods for detecting genetic diversity in *Phytophthora sojae* (Stramenopila: Oomycete). *Biotechnology Letters* 33(11): 2217-2223. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0682-9>.
- Stouvenakers, G., Massart, S., Depireux, P. and Jijakli, H. 2020. Microbial origin of aquaponic water suppressiveness against *Pythium aphanidermatum* lettuce root rot disease. *Microorganisms* 8(11): 1683. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111683>.
- Sweet, C.L. 2020. Managing crops diseases under water scarcity. *Annual review phytopathology* 58: 387-406.
- Tamura, K. and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tang, X., Chen, S., Yan, X., Yuan, H. and Yang, D. 2020. First report of *Pythium torulosum* causing corn root rot in Northeastern China. *Plant Disease* 105(3): 712-712. DOI: 10.1094/PDIS-08-20-1679-PDN.
- Thines, M. and Kamoun, S. 2010. Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13(4): 427-433. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.001>.
- Thao, L., Hien, L., Liem, N., Thanh, H., Khanh, T., Binh, V., Trang, T., Anh, P. and Tu, T. 2020. First report of *Phytophthora vexans* causing root rot disease on durian in Vietnam. *New Disease Reports* 41(1): 2-2. DOI: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.002>.
- Tian, Y., Yin, J., Sun, J., Ma, Y., Wang, Q., Quan, J. and Shan, W. 2016. Population genetic analysis of *Phytophthora infestans* in northwestern China. *Plant Pathology* 65(1): 17-25. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12392>.
- Tkaczyk, M. 2020. *Phytophthora*: origin, differences and meaning in modern plant pathology. *Folia Forestalia Polonica* 62(3): 227-232. DOI: <https://doi.org/10.2478/ffp-2020-0022>.

- Tomura, T., Molli, S., Murata, R. and Ojika, M. 2017. Universality of the *Phytophthora* mating hormones and diversity of their production profile. *Scientific Reports* 7: 5007. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05380-3>.
- Trzewik, A., Katarzyna, N. and Orlikowska, T. 2016. A simple method for extracting DNA from *Rhododendron* plants infected with *Phytophthora* spp. for use in PCR. *Journal Plant Protection Research* 56(1): 96-100. DOI: 10.1515/jppr-2016-0014.
- Tsedaley, B. 2014. Late blight of potato (*Phytophthora infestans*) biology, economic importance and its management approaches. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 4(25): 1-12. ISSN: 2224-3208.
- Uzuhashi, S., Tojo, M. and Kakishima, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51(5): 337-365. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10267-010-0046-7>.
- Uzuhashi, S., Okada, G. and Ohkuma, M. 2015. Four new *Pythium* species from aquatic environments in Japan. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 107(2): 375-391. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0336-8>.
- Vásquez, A., Tlapal, B., Yáñez, J., Pérez, R. y Quintos, M. 2009. Etiología de la marchitez del “chile de agua” (*Capsicum annum* L.) en Oaxaca, México. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 32: 127-134.
- Vega-Arreguín, J. C., Shimada-Beltrán, H., Sevillano-Serrano, J. and Moffet, P. 2017. Non-host plant resistance against *Phytophthora capsici* is mediated in part by members of the I2 R gene family in *Nicotiana* spp. *Frontiers in Plant Science* 8: 205. DOI:10.3389/fpls.2017.00205.
- Velásquez, R., Reveles, L.R. and Talavera, H. 2018. Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 414-422.
- Villa, N., Kageyama, K., Asano, T. and Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 98(3): 410-422. DOI: <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832676>.

- Vogel, G., Gore, M. and Smart, C. 2021. Genome-wide association study in New York *Phytophthora capsici* isolates reveals loci involved in mating type and mefenoxam sensitivity. *Phytopathology* 1-64.
- Wang, Y., Meng, Y., Zhang, M., Tong, X., Wang, Q., Sun, Y., Quan, J., Govers, F. and Shan, W. 2011. Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and identification of variation in host specificity. *Molecular Plant Pathology* 12(2): 187-201. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00659.x>.
- Wang, T., Wang, X., Zhu, X., He, Q. and Guo, L. 2020. A proper PiCAT2 level is critical for sporulation, sporangium function, and pathogenicity of *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 21(4): 460-474. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12907>.
- Wang, W., Liu, X. and Govers, F. 2021. The mysterious route of sterols in oomycetes. *PLoS Pathogens* 17(6): 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009591>.
- Wen, K. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Phytopathology* 26: 57-73.
- West, V., Piete, A., Neil, A., and Neil, G. 2003. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular. Plant Pathology* 62: 99-113.
- Yang, X. and Hong, C. X. 2016. Diversity and populations of *Phytophthora*, *Phytophthium* and *Pythium* species recovered from sediments in an agricultural run-off sedimentation reservoir. *Plant Pathology* 65(7): 1118–1125. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12488>.
- Xie, Y; Zhou, H; Fan, S. and Zhang, X. 2021. First report of *Phytophthium helicoides* causing stalk rot on corn in China. *Plant Disease* 105(11):3766. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0429-PDN>.
- Yuzon, J., Travadon, R., Mathu, C., Tripathy, S., Rank, N., Mehl, H., Rizzo, D., Cobb, R., Small, C., Tang, T., McCown, H., Garbelotto, M. and Kasuga, T. 2020. Asexual evolution and forest conditions drive genetic parallelism in *Phytophthora ramorum*. *Microorganisms* 8(6): 1-25. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060940>.

- Zadoks, J. and Schein, R. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University. 247p.
- Zammouri, S., Kalai, L. and Monia, M. 2018. Optimization of simple DNA extraction method suitable for diverse microorganisms. Tunisian Journal of Plant Protection 13(2): 145-155.
- Zappia, R. E., Huberli, G. E., Hardy, J. and Bayliss, K. L. 2014. Fungi and oomycetes in open irrigation systems: knowledge gaps and biosecurity implications. Plant Pathology 63(5): 961-972. DOI: 10.1111/ppa.12223.
- Zhang, M., Meng, Y., Wang, Q., Liu, D., Quan, J., Hardham, A. and Shan, W. 2012. PnPMA1, an atypical plasma membrane H⁺-ATPase, is required for zoospore development in *Phytophthora parasitica*. Fungal Biology 116(9): 1013-1023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.07.006>.
- Zitnick, K and Nelson, B. 2015. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in North Dakota. Plant Disease 99:31-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0161-RE>.
- Zohara, F., Surovy, M., Khatun, A., Prince, M., Akanda, M., Islam, M. and Rahman, M. 2019. Chitosan biostimulant controls infection of cucumber by *Phytophthora capsici* through suppression of asexual reproduction of the pathogen. Acta Agrobotanica 72(1) 100-120. DOI: <https://doi.org/10.5586/aa.1763>.