

Capacidad de sobrevivencia de tres especies de *Phytophthora* y dos de *Pythium* preservados en dos sustratos a corto y largo plazo*

Survivability of three species of *Phytophthora* and two of *Pythium* substrates preserved in short and long term

E. Molina-Gayosso¹, P. Andrade-Hoyos², R. García-Espinosa^{†3} y C. M. Sosa-Hernández³

¹Universidad Politécnica de Puebla, Puebla. ²Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Hidalgo. ³Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. Autor para correspondencia: eduardo.molina@uppuebla.edu.mx.

Resumen

El mantenimiento y viabilidad de microorganismos preservados en las colecciones es un problema común en laboratorios de diagnóstico de enfermedades de las plantas e instituciones de investigación, y más aún, en aquellas en donde se incluyen a especies de los géneros *Phytophthora* y *Pythium* y en el que la criopreservación no es una opción. La conservación de oomicetos en agua estéril es un método económico y confiable. Se han reportado periodos de conservación de hasta 23 años para especies de *Phytophthora*. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de sobrevivencia y viabilidad de especies de *Phytophthora* y *Pythium* mantenidos en suelo por periodos de 3 a 7 años y en agua estéril por periodos de 6 a 21 años. La viabilidad se confirmó mediante siembra en medio de cultivo harina de maíz-agar suplementado con antibióticos. Ninguno de los oomicetos conservados en suelo sobrevivió durante los periodos de conservación mientras que la conservación en agua estéril mantuvo viables a especies de *Phytophthora* por periodos de hasta 21 años y de *Pythium* por 7 años.

Palabras clave: antibióticos, criopreservación, maíz-agar, microorganismos, oomicetos.

Abstract

The maintenance and viability of microorganisms preserved in the collections is a common problem in laboratory diagnosis of plant diseases and research institutions, and even in those where they include species of the genera *Phytophthora* and *Pythium* and in which cryopreservation is not an option. The oomycetes conservation in sterile water is an economic and reliable method. They have been reported retention periods up to 23 years for species of *Phytophthora*. In this work were evaluated the ability to survival and viability of *Phytophthora* and *Pythium* species kept in soil for periods of three to seven years in sterile water for periods of 6 to 21 years. Viability was confirmed by plating on medium cornmeal-agar culture medium supplemented with antibiotics. None of the oomycetes survived preserved in soil conservation during periods while in sterile water conservation remained viable *Phytophthora* species for up to 21 years and *Pythium* for 7 years.

Keywords: antibiotics, corn-agar, cryopreservation, microorganisms, oomicetos.

* Recibido: abril de 2016
Aceptado: julio de 2016

Introducción

Las colecciones de microorganismos tienen fines académicos o referenciales (Borman, *et al.*, 2006). Y es el mantenimiento y viabilidad de estas colecciones, uno de los problemas más comunes en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades en las plantas. Los métodos de conservación de los microorganismos causales se presentan como un paso crítico en el cumplimiento de estos fines. Debido a sus características fisiológicas, especies de los géneros *Phytophthora* y *Pythium* presentan los mayores problemas en su sobrevivencia, y más aún, si no se cuenta con la infraestructura necesaria. Hongos y oomicetos pierden viabilidad en diferentes métodos de conservación y en caso contrario, pierden virulencia y patogenicidad, como en el método de resiembra periódica (Dhingra y Sinclair, 1987; Richter and Bruhn, 1989; Humber, 1997).

Los oomicetos pueden ser conservados mediante métodos de corto plazo como la siembra en tubos inclinados con papa-dextrosa-agar o V8-agar cubiertos con lugol o aceite mineral, en donde es necesario resembrar cada dos años (Humber, 1997; Heckely, 1978). Grandes colecciones, como la World *Phytophthora* Collection, se encuentran en criopreservación a -120 °C en ultracongeladores (Coffey, 2008) e incluso se reporta inmersión en nitrógeno líquido a -190 °C, en donde permanecen viables por más de 9 años (Smith, 1982; Dahmen *et al.*, 1983). Aunque la criopreservación es capaz de mantener al organismo en su estado genético original, se requiere de equipo costoso, siendo esta su principal limitante.

Una de las formas más prácticas y confiables de conservar a *Phytophthora* es en agua destilada estéril (Dhingra y Sinclair, 1987; Simpfendorfer *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2000; Ko, 2003), sobre todo en lugares en donde no hay la infraestructura necesaria para criopreservación. Boesewinkel (1976) reporta haber mantenido a *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi* y *P. megasperma* var. *sojae* por 6 a 7 años en agua destilada estéril a temperatura ambiente; por otra parte, Ko (2003) conservó viables aislamientos de *P. cinnamomi*, *P. parasitica* y *P. palmivora* en agua destilada estéril a temperatura ambiente por periodos de 6 a 23 años. En el caso de la conservación en suelo de *Pythium* y *Phytophthora*, esta ha sido poco documentada.

Comúnmente, se considera este método de conservación de corto plazo y su éxito depende mayormente del suelo utilizado y de la cantidad de agua que sea capaz de retener (Dhingra y Sinclair, 1987) ya que la formación de estructuras

Introduction

The collections of microorganisms have academic or reference purposes (Borman *et al.*, 2006). And is the maintenance and viability of these collections, one of the most common problems in the laboratory diagnosis of plant diseases. Conservation methods of the causative organisms are presented as a critical step in meeting these goals. Due to their physiological characteristics, species of *Phytophthora* and *Pythium* genera present the biggest problems in their survival, and even if they do not have the necessary infrastructure. Fungi and oomycetes lose viability in different conservation methods and otherwise lose virulence and pathogenicity, as in the method of periodic reseeded (Dhingra and Sinclair, 1987; Richter and Bruhn, 1989; Humber, 1997).

The oomycetes can be preserved through short-term methods such as planting on slopes with potato-dextrose agar or V8-agar covered with lugol or mineral oil tubes, where it is necessary to replant every two years (Humber, 1997; Heckely, 1978). Large collections, such as the World *Phytophthora* Collection, are in cryopreservation at -120 °C in deep freezers (Coffey, 2008) and even reported immersion in liquid nitrogen at -190 °C, where they remain viable for more than 9 years (Smith, 1982; Dahmen *et al.*, 1983). Although cryopreservation is able to keep the body in its original genetic state, it requires expensive equipment, being its main limitation.

One of the most practical and reliable store *Phytophthora* forms is in sterile distilled water (Dhingra and Sinclair, 1987; Simpfendorfer *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2000; Ko, 2003), especially in places where no infrastructure are necessary for cryopreservation. Boesewinkel (1976) reports have kept *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi* and *P. megasperma* var. *sojae* by 6 to 7 years in sterile distilled water at room temperature; Moreover, Ko (2003) retained viable isolates of de *P. cinnamomi*, *P. parasitica* and *P. palmivora* in sterile distilled water at room temperature for periods of 6-23 years. In the case of conservation in *Pythium* and *Phytophthora* floor, this has been poorly documented.

Commonly, this method is considered conservation of short term and its success largely depends on the soil used and the amount of water that is able to retain (Dhingra and Sinclair, 1987) since the formation of structures propagation

de propagación en *Phytophthora* requiere alta humedad, alta concentración de oxígeno y baja de dióxido de carbón (Ribeiro, 1983). Con la intención de resguardar aislamientos de *Phytophthora* y *Pythium*, mediante un método que impidiera la pérdida de virulencia y patogenicidad, además de ser económicamente accesible, se han estado almacenando en tubos de ensaye conteniendo agua destilada estéril y suelo estéril desde hace 2 a 19 años. Recientemente, se determinó su viabilidad con el fin de conocer cuál ha sido el mejor método para la conservación de estos dos géneros.

Materiales y métodos

Para la conservación de los diferentes aislamientos de *Phytophthora* y *Pythium* en suelo estéril se utilizó el siguiente protocolo Dr. García-Espinosa, R. (Com. Per.): se colocaron 2 segmentos circulares (9 mm diámetro y de grosor variable) de los diferentes aislamientos creciendo en medio harina de maíz-agar (100%), agar (1.9%) y antibióticos (250 ppm ampicilina, 10 ppm rifampicina y 10 ppm pimáricina) en tubos de ensayo de 30 ml de capacidad que contenían suelo previamente tamizado (malla #20) y esterilizado en autoclave a 15 lbs de presión por tres horas durante dos días consecutivos. Después de la siembra, los tubos se cerraron con su tapón de baquelita, se incubaron a 28 °C durante 48 h, y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente.

Adicionalmente, se conservó en tubos con agua estéril Dr. García-Espinosa, R. (Com. Per.). A tubos de ensaye, de aproximadamente 20 ml de capacidad, se les adicionó 12 ml de agua destilada y se esterilizó durante 30 minutos a 15 lbs de presión; posteriormente, se colocaron en cada tubo, 4 segmentos circulares (9 mm diámetro y de grosor variable) de los diferentes aislamientos creciendo en medio harina de maíz-agar (100%), agar (1.9%) y antibióticos (250 ppm ampicilina, 10 ppm rifampicina y 10 ppm pimáricina). Los tubos se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente.

Al menos, había cinco tubos de conservación en suelo estéril por cada aislamiento. Para determinar la viabilidad de los cultivos conservados en suelo, se sustrajo suelo de cada tubo de ensaye, realizando previa homogenización, y se colocó (por duplicado) en cajas Petri con medio harina de maíz-agar (100%), agar (1.9%) y antibióticos (250 ppm ampicilina, 10 ppm rifampicina y 10 ppm natamycin (Delvolid®). Se incubó a 28 °C en oscuridad. En el caso del método de conservación

Phytophthora requires high humidity, high and low oxygen concentration of carbon dioxide (Ribeiro, 1983). With the intention to protect isolates of *Phytophthora* and *Pythium* by a method that would prevent loss of virulence and pathogenicity, besides being economically accessible, they have been stored in test tubes containing sterile distilled water and sterile soil in a 2 to 19 years. Recently, was determined its viability in order to know what was the best method for the conservation of these two genders.

Materials and methods

For the conservation of different isolates of *Phytophthora* and *Pythium* in sterile soil was used the following protocol Dr. García-Espinosa (Com. Per.): 2 circular segments (9 mm diameter and of varying thickness) of placed different isolates growing medium cornmeal-agar (100%), agar (1.9%) and antibiotics (250 ampicillin ppm, 10 ppm rifampicin and 10 ppm pimáricin) in test tubes of 30 ml capacity containing soil previously sieved (mesh # 20) and autoclaved at 15 lbs pressure for three hours for two consecutive days. After planting, the tubes were closed with its stopper Bakelite, were incubated at 28 °C for 48 h, and stored in dark at room temperature.

In addition, it was stored in tubes with sterile water Dr. García-Espinosa (Com. Per.). A test tubes, about 20 ml capacity, were added 12 ml of distilled water and sterilized for 30 minutes at 15 lbs pressure; subsequently, they were placed in each tube, four circular segments (9 mm diameter and of varying thickness) of different isolates growing medium cornmeal-agar (100%), agar (1.9%) and antibiotics (250 ampicillin ppm, 10 rifampin ppm and 10 ppm pimáricine). The tubes were stored in the dark at room temperature.

At least, there were five tubes in sterile soil conservation for each isolate. To determine the viability of cultures preserved in ground floor of each test tube was subtracted, making prior homogenization, and placed (in duplicate) in Petri dishes with medium cornmeal-agar (100%), agar (1.9%) and antibiotics (ampicillin 250 ppm, 10 ppm and 10 ppm natamycin rifampicin (Delvolid®), was incubated at 28 °C in dark. in the case of the method in sterile water conservation, the circular portions of each tube were subtracted and they placed (in duplicate) in petri dishes with the means described above.

en agua estéril, se sustrajeron los segmentos circulares de cada tubo y se colocaron (por duplicado) en cajas petri con el medio antes descrito.

Los aislamientos conservados en suelo estéril fueron: *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora* sp., *Pythium vexans* y *Pythium aphanidermatum*. Los conservados en agua destilada estéril fueron *Phytophthora citricola*, *Phytophthora* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp. y *Pythium aphanidermatum* (Cuadro 1).

Resultados y discusión

En ninguna de las dos réplicas realizadas, de cada tubo de conservación, sobrevivió al tiempo de conservación en suelo estéril ya que no hubo crecimiento del patógeno en medio de cultivo. En el caso de la conservación en agua destilada estéril, en ambas o en una de las réplicas, hubo respuesta positiva en crecimiento, por lo que se mantuvieron viables por el tiempo en que fueron conservadas. Los dos aislamientos de *Phytophthora citricola* permanecieron viables después de 18 y 19 años mientras que *P. cinnamomi* se cultivó con éxito después de 10 años. *P. capsici* pudo ser reactivado después de 10 y 21 años, al igual que *Pythium aphanidermatum* reactivado 7 años después. Para *P. citricola*, *P. capsici* y *Pythium aphanidermatum* es el primer reporte de conservación en agua estéril, y para *P. cinnamomi* había sido reportado un periodo de sobrevivencia de entre 9 a 18 años en agua estéril (Ko, 2003).

Isolates were kept in sterile soil: *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora* sp., *Pythium vexans* and *Pythium aphanidermatum*. Conserved in sterile distilled water were *Phytophthora citricola*, *Phytophthora* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp. and *Pythium aphanidermatum* (Table 1).

Results and discussion

In either replicas made from each tube conservation, he survived the shelf in sterile soil and there was no growth of the pathogen in culture medium. In the case of sterile distilled water conservation in both or one of the aftershocks, there was positive growth response, so they remained viable for the time were preserved. The two isolates of *Phytophthora citricola* remained viable after 18 and 19 years, while *P. cinnamomi* was grown successfully after 10 years. *P. capsici* could be reactivated after 10 and 21 years, like *Pythium aphanidermatum* reactivated 7 years later. The *P. citricola*, *P. capsici* and *Pythium aphanidermatum* is the first report in sterile water conservation and *P. cinnamomi* had been reported survival period of between 9-18 years in sterile water (Ko, 2003).

All isolates showed a characteristic mycelial growth in Petri dish, and only produced *Phytophthora citricola* propagation structures (oospores) six days after being reactivated.

Cuadro 1. Sobrevivencia de especies de *Phytophthora* y *Pythium* en agua destilada y suelo estéril.
Table 1. Survival of *Phytophthora* and *Pythium* species in sterile distilled water and sterile soil.

Aislamientos	Cultivo asociado al momento del aislamiento	Método de conservación	Capacidad de sobrevivencia	Tiempo de conservación (años)
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Encino	Suelo estéril	No	-
<i>Pythium vexans</i>	Chile jalapeño	Suelo estéril	No	-
<i>Pythium vexans</i>	Chile jalapeño	Suelo estéril	No	-
<i>Pythium aphanidermatum</i>	(sin registro)	Suelo estéril	No	-
<i>Phytophthora citricola</i>	Aguacate	Agua destilada estéril	Si	19
<i>Phytophthora citricola</i>	Aguacate	Agua destilada estéril	Si	18
<i>Phytophthora</i> sp.	Piña	Agua destilada estéril	Si	6
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Nuez	Agua destilada estéril	Si	10
<i>Phytophthora capsici</i>	Chile	Agua destilada estéril	Si	10
<i>Phytophthora capsici</i>	Chile	Agua destilada estéril	Si	21
<i>Pythium</i> sp.	Papaya	Agua destilada estéril	Si	6
<i>Pythium aphanidermatum</i>	(sin registro)	Agua destilada estéril	Si	7

Todos los aislamientos presentaron un crecimiento micelial característico en caja Petri, y sólo *Phytophthora citricola* produjo estructuras de propagación (oosporas) 6 días después de haber sido reactivado.

Comúnmente se cultiva a *Pythium* y *Phytophthora* en medio libre de antibióticos previo a ser conservados bajo diversos métodos (Dhingra y Sinclair, 1987; Ko, 2003). En este caso, los diferentes aislamientos crecieron en medio que contenía pimaricina previo a ser conservados, y esta condición no afectó su viabilidad, ya que fue posible su cultivo después de periodos de 3 a 19 años. Tsao y Ocana (1969) comentan que 100 ppm de pimaricina en el medio inhibe la germinación de clamidosporas, esporangios y zoosporas de muchas especies, pero también comentan que hay una inhibición parcial a 25 ppm y cesa la inhibición por debajo de 12 ppm. Los segmentos de medio conservados en agua destilada estéril y suelo estéril no sobrepasaron las 10 ppm de pimaricina.

El éxito en la conservación en suelo depende del desarrollo del aislamiento en los primeros días de su conservación. En la conservación en suelo, el micelio y las unidades propagativas de la segunda generación son las que se preservan (Dhingra y Sinclair, 1987) y de este suceso depende el éxito y el tiempo en que pueden ser conservados.

A diferencia de lo anterior, la conservación en agua destilada estéril ofrece un mayor tiempo de preservación. Este estudio confirma que especies de los géneros *Phytophthora* y *Pythium* se conservan de manera exitosa en agua estéril. Las estructuras de resistencia en *Pythium* y *Phytophthora* pueden ser oosporas, clamidosporas, y esporangios (Ribeiro, 1983), aunque estos últimos son sumamente sensibles a la desecación (Judelson y Blanco, 2005). Ya sea en el caso de especies homotálicas (*P. citricola* y *Pythium aphanidermatum*) en donde oosporas, clamidosporas y esporangios actúan como mecanismos de supervivencia, o en el caso de especies heterotálicas (*P. capsici* y *P. cinnamomi*), considerando sólo un grupo compatible en el medio, en donde esporangios y clamidosporas actúan como estructuras de resistencia (Ribeiro, 1983; Elliot, 1983), la conservación en agua evita la desecación de las estructuras de propagación. La conservación en agua estéril de especies de *Phytophthora* y *Pythium* es sencilla, confiable y económica, sobre todo comparada con métodos de resiembra o en donde se requiere de ultracongeladores como en el caso de la criopreservación.

Commonly *Pythium* and *Phytophthora* grown-free medium prior to being preserved under various methods (Dhingra and Sinclair, 1987; Ko, 2003) antibiotics. In this case, the different isolates grew in medium containing pimaricine prior to being preserved, and this condition did not affect its viability as it was possible cultivation after periods of 3-19 years. Tsao and Ocana (1969) comment that 100 ppm of pimaricin in medium inhibits the germination of chlamydospores, sporangia and zoospores of many species, but also comment that there is a partial inhibition at 25 ppm and ceases inhibition below 12 ppm. Half segments stored in sterile distilled water and sterile soil did not exceed 10 ppm pimaricine.

Success in soil conservation depends on the development of isolation in the early days of conservation. In soil conservation in the mycelium and propagative units of the second generation are those that are preserved (Dhingra and Sinclair, 1987) and this event depends on the success and the time can be preserved.

Unlike the above, the conservation in sterile distilled water offers a longer preservation. This study confirms that species of *Phytophthora* and *Pythium* gender successfully conserved in sterile water. The structures of *Pythium* and *Phytophthora* resistance can be oospores, chlamydospores, and sporangia (Ribeiro, 1983), although the latter are highly sensitive to desiccation (Judelson and White, 2005). Either in the case of homothallic species (*P. citricola* and *Pythium aphanidermatum*) where oospores, chlamydospores and sporangia act as survival mechanisms, or in the case of heterothallic species (*P. capsici* and *P. cinnamomi*), considering only one group supported in the middle, where sporangia and chlamydospores act as resistance structures (Ribeiro, 1983; Elliot, 1983), the water conservation prevents desiccation of propagation structures. Sterile water conservation of *Phytophthora* and *Pythium* species is simple, reliable and cost, especially compared to methods where reseedling or ultrafreezers required as in the case of cryopreservation.

Conclusions

Viability was confirmed by plating on medium cornmeal-agar culture medium supplemented with antibiotics. None of the oomicetos survived preserved in soil conservation

Conclusiones

La viabilidad se confirmó mediante siembra en medio de cultivo harina de maíz-agar suplementado con antibióticos. Ninguno de los oomicetos conservados en suelo sobrevivió durante los periodos de conservación mientras que la conservación en agua estéril mantuvo viables a especies de *Phytophthora* por periodos de hasta 21 años y de *Pythium* por 7 años.

Reconocimientos

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Ecología de Fitopatógenos con origen en el suelo del Postgrado en Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Los autores expresan su agradecimiento a Roberto Romero Córdova por su ayuda técnica. Dr. Roberto García Espinosa, *in memoriam*. Nuestra gratitud, por mostrarnos que todo camino debe tener corazón.

Litatura citada

- Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66:183-185.
- Borman, M. A.; Szekely, A.; Campbell, C. K. and Johnson, M. E. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia.* 161:361-368.
- Coffey, D. M. D. 2008. The world oomycetes genetic resource collection. Third international workshop *Phytophthora/Pythium* and related genera. Slide presentation. <http://www.phytophthoradb.org/slides.php?a=view&o=2>.

during periods while in sterile water conservation remained viable *Phytophthora* species for up to 21 years and *Pythium* for 7 years.

End of the English version



- Dahmen, H.; Staub, Th. and Schwinn, F. J. 1983. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology.* 73:241-246.
- Dhingra, D. O. and Sinclair, J. B. 1987. Basic plant pathology methods. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. 49 p.
- Elliot, C. G. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. In: *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*, (Eds.) Erwin, D. C.; Bartnicki-García, S. and Tsao, P. H. APS Press. St. Paul Minnesota. 71-80 pp.
- Heckely, R. J. 1978. Preservation of microorganisms. In: *Advances in applied microbiology*. Perlaman D. (Ed.). Vol. 24. Academic Press Inc. 1-53 pp.
- Humber, R.A. 1997. Fungi: preservation of cultures. In: *manual of techniques in insect pathology*. Lacery L. (Ed.). Academic Press. 409 p.
- Judelson, H. S. and Blanco, F.A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews. Microbiology.* 3:47-58
- Ko, W. H. 2003. Long-term storage and survival structure of three species of *Phytophthora* in water. *J. General Plant Pathol.* 69:186-188.
- Ribeiro, O. K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. (Eds.) Erwin, D. C.; Bartnicki-García, S. and Tsao, P. H. APS Press. St. Paul Minnesota. 55-70 pp.
- Richter, P. and Bruhn, L. 1989. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycetes culture from cold storage in sterile water. *Can. J. Microbiol.* 35:1055-1060.
- Ryan, M. J.; Smith, D. and Jeffries, P. 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:183-186.
- Simpfendorfer, S.; Harden, T. J. and Murray, G. M. 1996. Viability and pathogenicity of *Phytophthora clandestina* after storage in water and liquid nitrogen. *Aust. Plant Pathol.* 25:234-239.
- Smith, D. 1982. Liquid nitrogen storage of fungi. *Transactions of the British Mycological Society.* 79(3):415-421.
- Tsao, H. P.; Ocana, G. 1969. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. *Nature.* 223:636-638.