

Especies de *Phytophthora* asociadas a agua de irrigación en el Valle de Culiacán

Josué Cárdenas Rodríguez^{1§}
Moisés Gilberto Yáñez Juárez¹
Carlos Alfonso López Orona¹
Felipe Ayala Tafoya¹
Guadalupe Alfonso López Urquidez¹
Sergio de Jesús Romero Gómez²

¹Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, Culiacán Rosales, Sinaloa, México. AP. 25. CP. 80000. (moisesyj@uas.edu.mx; clopezorona@uas.edu.mx; tafoya@uas.edu.mx; alfonsolopezurquidez@uas.edu.mx). ²Facultad de Química-Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario Hidalgo s/n, Cerro de las Campanas, Querétaro. CP. 76010. (ser69rom@gmail.com).

§Autor para correspondencia: j.cardenasrodriguez@hotmail.com.

Resumen

En México existen escasos estudios que describen a los cuerpos acuáticos empleados para la agricultura y el rol que tiene el agua de riego como fuente de inóculo, persistencia y dispersión de parásitos fitopatógenos, tal es el caso de los oomycetes que habitan ambientes acuáticos con capacidad de infectar un amplio rango de hospedantes cultivados. Debido a la falta de información sobre qué géneros y especies de oomycetes están presentes en el agua, su identificación es de suma importancia para gestionar alternativas de manejo y control de estos para la producción agrícola en la región. Con el objetivo de determinar qué oomycetes se aíslan en aguas superficiales empleadas para la irrigación en el Valle de Culiacán, Sinaloa, en 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 aislados de oomycetes, los cuales se identificaron en base a sus características morfológicas y secuencias de ADN (con los iniciadores ITS 4/6, COX y NADH), también se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas y frutos de las familias de solanáceas y cucurbitáceas. Se aislaron e identificaron los organismos: *Phytophthora parsiana*, *P. virginiana*, *P. lagoariana*, *P. capsici* y *P. hydropathica*. Todas las especies de *Phytophthora* resultaron patogénicas, tuvieron capacidad de infectar plantas y frutos, causando síntomas de marchitez y pudrición en las hortalizas inoculadas.

Palabras clave: ácidos nucleicos, hortalizas, oomycetes, pseudohongo.

Recibido: diciembre de 2020

Aceptado: marzo de 2021

Introducción

Los organismos del género *Phytophthora*, pertenecen al reino Cromista 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 5 000 especies de plantas (Hardham *et al.*, 2018) y *P. capsici*, conocida por originar pérdidas económicas en plantaciones de solanáceae y cucurbitáceae 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 oomycetes 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 infectivo 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* 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 oomycetes se basaba en sus características morfológicas y culturales; sin embargo, fueron frecuentes 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 en México.

Materiales y métodos

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

Dispuesto 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 1), fueron seleccionados al azar 37 sitios de muestreo en 28 localidades (Cuadro 1).



Figura 1. Principales sitios de muestreo en el municipio de Culiacán, Sinaloa. Imagen proporcionada por la CONAGUA.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestro para la obtención de aislamientos de *Phytophthora* spp., Culiacán, Sinaloa, 2018-2019.

Localidad	Coordenadas del sitio de muestreo	Aislamiento
Presa Adolfo López Mateos (El Varejonal)	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, PV12
La Presita	24°55'49" N 107°25'39" W	PR13, PR14, PR15, PR16
Empaque Castro	24°55'28" N 107°31'59" W	EC17, EC18, EC19, EC20
El Tamarindo	24°55'07" N 107°33'32" W 24°55'11" N 107°32'57" W	TR21, TR22, TR23, TR24
Empaque Valle del sol	24°53'20" N 107°29'17" W	EVS25, EVS26, EVS27, 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, RT49
Río Humaya	24°51'48" N 107°24'25" W	RH50, RH51, RH52, RH53, RH54, RH55
Jardín Botánico	24°49'23" N 107°23'06" W 24°49'24" N 107°23'04" W	JB56, JB57, JB58, JB59, JB60, JB61
Imala	24°51'21" N 107°13'11" W	IMA62, IMA63, IMA64, IMA65
Tres Ríos	24°48'43" N 107°24'24" W 24°48'24" N 107°24'33" W	3R66, 3R67, 3R68, 3R69, 3R70, 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 24°45'40" N 107°30'45" W	CB80 y CB81

Localidad	Coordenadas del sitio de muestreo	Aislamiento
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 US 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

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).



Figura 2. Trampa flotante para muestreo (A) de peras infectadas recuperados de las trampas (B).

Esas trampas, en su interior contenían dos frutos de pera libres de lesiones, lavados con agua simple y desinfectados superficialmente con etanol al 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 al 96°.

Los aislamientos se realizaron a partir de cortes de 1 cm² tomados de las lesiones café en los frutos (Figura 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), pentacloronitrobenzoceno (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 saca bocado 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).

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), CaCO_3 (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 saca bocado 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 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 V8Aclarificado (jugo V8 sometido a 4 000 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 veintiún 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).

Identificación molecular

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 100-200 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 M, β -mercaptoetanol 2%). Se colocaron los tubos en vortex durante un minuto. 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 alcohol cloroformo-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 μ l de buffer TE. Las características del ADN se calcularon con Nanodrop 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.

Amplificación, purificación y secuenciación del ADN

La mezcla de reacción consistió en 1 μ l de ADN (50 ng μ l⁻¹), 0.5 μ l de dntp's, 0.25 de Taq ADN polimerasa, 2.5 μ l de buffer, 0.625 μ l de cada primer, 20.175 μ l de agua en un volumen total de reacción de 25 μ l. 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), cuya amplificación exitosa fue confirmada por el gel de electroforesis.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de ADN de *Phytophthora* spp. (Kroon *et al.*, 2004).

Primer	Secuencia de primer	Tamaño (pb)
ITS4C0569ITS6C0570	TCCTCCGCTTATTGATATGCGAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	930
COXF4NCOXR4N	GTATTTCTTCTTTATTAGGTGCGTGAAGTAATGTTACATATAC	972
NADHF1NADHR1	CTGTGGCTTATTTACTTTAGCAGCAGTATACAAAAGCAAC	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 aislados 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.

Pruebas de patogenicidad

Obtención de plántulas

Con la finalidad de comprobar la patogenicidad de cada uno de los aislados, 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 con una mezcla de agua y 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).

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 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.

Pruebas de patogenicidad en frutos

Frutos de tomate, chile y pepino con madurez fisiológica (libres de lesiones superficiales), lavados con agua destilada estéril y desinfectados con etanol al 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 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 en 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.

Resultados y discusión

Se obtuvieron 17 aislamientos pertenecientes al género *Phytophthora*, los que se clasificaron en dos grupos tomando en cuenta su similitud morfológica (Cuadro 3): el primer grupo lo conformaron 14 aislamientos que desarrollaron esporangióforos simples, esporangios ovoides no papilados con dimensiones promedio largo y ancho 47.5-60 x 26.25-32.5 μm (TR21, PS36, 3R68, CR104 y

AGUA79), 47.5-57.5 x 26.25-32.5 μm (PV1, PV11, JB61, CC84 y CC85), 45-60 x 22.5-32.5 μm (RT45 y RT47) y 45-57.5 x 25-32.5 μm (JB61 y 3R70), con proliferación anidada y extendida, esporangióforos simples e hinchamientos irregulares presentes (Figura 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 3. Características fenotípicas de los aislamientos de *Phytophthora* spp.

Grupo	Aislamiento	Forma de esporangios	Proliferación de esporangios	Hinchamientos miceliales	Dimensiones (largo y ancho) del esporangio (μm)	Compatibilidad	Oosporas
1	TR21, PS36, 3R68, CR104 y AGUA79	Ovoides no papilados	Anidada y extendida	Presentes	47.5-60 x 26.25-32.5	Desconocida	-
	PV1, PV11, JB61, CC84 y CC85	Ovoides no papilados	Anidada y extendida	Presentes	47.5-57.5 x 26.25-32.5	Desconocida	-
	RT45 y RT47	Ovoides no papilados	Anidada y extendida	Presentes	45-60 x 22.5-32.5	Desconocida	-
	JB61 y 3R70	Ovoides no papilados	Anidada y extendida	Presentes	45-57.5 x 25-32.5	Desconocida	-
2	PC107, MJB72 y MPV31	Ovoides papilados	Simple	Ausentes	40-68 x 17-30	A1	Pleróticas sin ornamentas (22-31 μm)

El segundo grupo compuesto por tres aislamientos (PC107, MJB72 y MPV31), los que desarrollaron esporangios ovoides papilados, dimensiones promedio largo y ancho de 40.0-68.0 x 17-30 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 22-31 μm (Figura 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 iniciadores ITS (4-6) amplificaron un producto aproximado a 941 pb, con los iniciadores COX 972 pb y con los iniciadores NADH 897 pb.

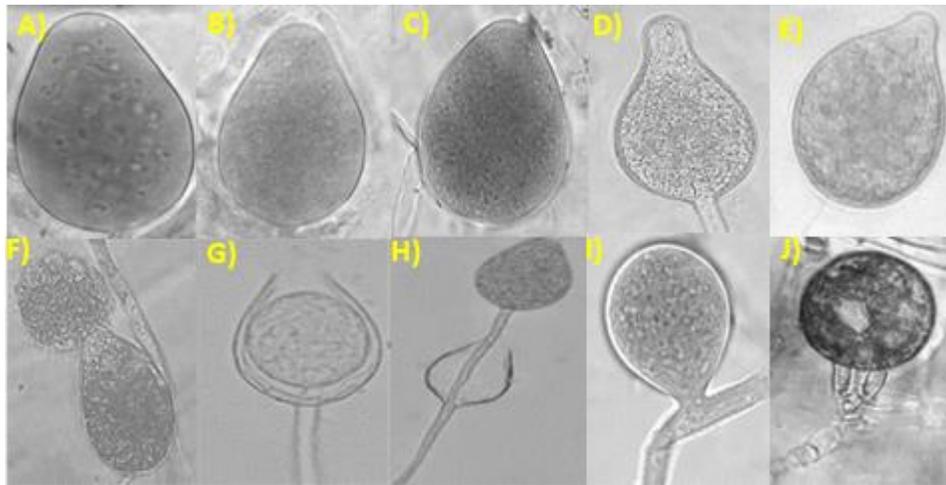


Figura 3. Estructuras sexuales y asexuales de los oomycetes. A-D) esporangios ovoides de *Phytophthora* spp.; E) esporangio papilado de *P. capsici* (aislamiento PC107); F) liberación de zoosporas (aislamiento TR21); G) proliferación anidada (aislamiento PV11); H) proliferación extendida (aislamiento JB61); I) hinchamiento del micelio intercalar (aislamiento RT45) y J) oospora de *P. capsici* (aislamiento MPV31).

Las secuencias consenso mostraron resultados con porcentajes de similitud a *Phytophthora virginiana*: de 99.42 (aislamiento PV1), 99.47 (aislamiento PV11), 99.52 (aislamiento JB61), 99.60 (aislamiento CC84) y 99.78 (aislamiento CC85), para *Phytophthora parsiana*: de 99 (aislamiento RT45) y 99.22 (aislamiento RT47), para *Phytophthora lagoariana*: de 98 (aislado JB61) y 98.52 (aislado 3R70), para *Phytophthora hydropathica*. De 97 (aislamiento TR21), 98 (aislamiento PS36), 98.5 (aislamiento 3R68), 99 (aislamiento CR104) y 99.64 (aislamiento AGUA79) y para *Phytophthora capsici* de 99.48 (aislamiento PC107), 99.7 (aislamiento MJB72) y 100% (aislamiento MPV31) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Especies de *Phytophthora* identificadas por aislamiento.

Aislamientos	Género	Núm. de acceso (%) de 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 patógenicos, 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 4).

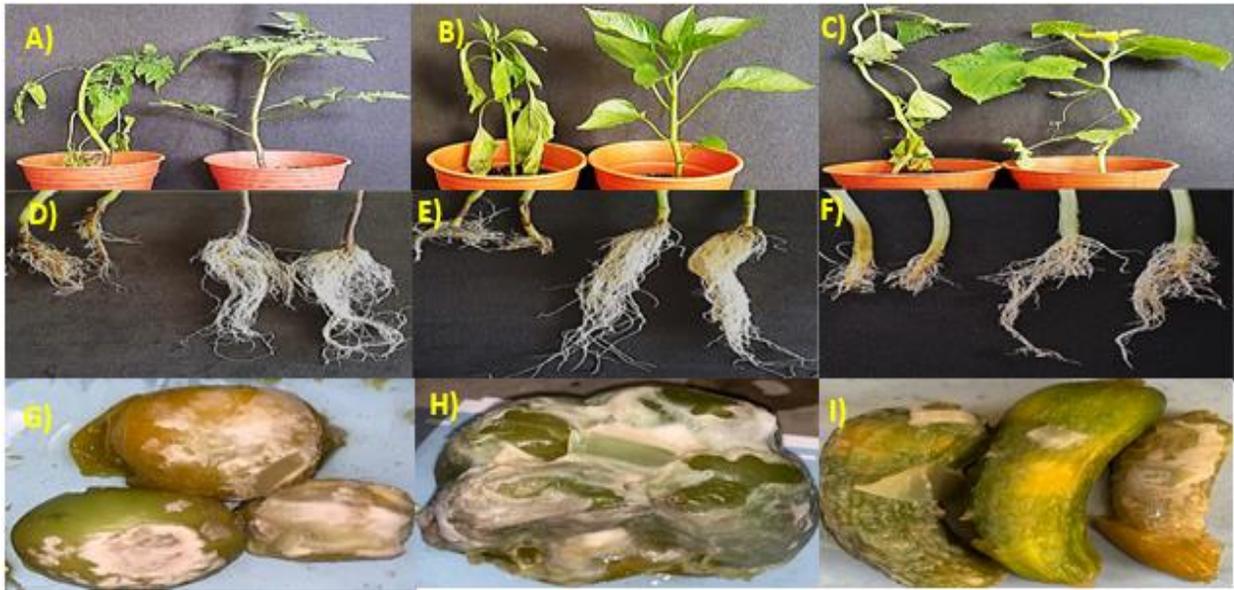


Figura 4. Pruebas de patogenicidad de la especie *P. hydrophatica*. A-C) plantas de tomate, chile y pepino, izquierda plantas inoculadas y derecha plantas testigo. D-F) tallos y raíces de plantas de tomate, chile y pepino, izquierda plantas inoculadas y derecha plantas testigo. G-I) frutos inoculados 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. hydrophatica* y *P. capsici* sobre plantas de tomate, chile y pepino descritos por Cline (2008); Álvarez *et al.* (2016); Lamour *et al.* (2012).

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 y 100% en la base de datos NCBI y con eso, mayor eficiencia que con la tradicional identificación caracterización morfológica.

Este estudio de agua superficial demuestra la presencia en ese hábitat de *Phytophthora virginiana*, *Phytophthora parsiana*, *Phytophthora lagoariana*, *Phytophthora hydrophatica* y *Phytophthora capsici*; asimismo, la importancia que juega el agua como fuente 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.

Conclusiones

En aguas superficiales de uso agropecuario del distrito de riego número 10 del Valle de Culiacán, Sinaloa, se colectaron 17 aislamientos que correspondieron a los organismos *P. virginiana*, *P. parsiana*, *P. lagoariana* y *Phytophthora capsici*, todos con capacidad de infectar plantas y frutos de tomate, chile y pepino.

Agradecimientos

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.

Literatura citada

- Abad, Z. G. and Balci, Y. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. United States of America. Plant Dis. 96(8):1081-1103. Doi: 10.1094/PDIS-12-11-1036-FE.
- Álvarez, B; García, R. S; Valdez, J. B.; León, J; Allende, R. and Fernández, S. P. 2016. *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation channels in the Culiacan Valley. México. Rev. Mex. Fitopatol. 35(1):20-39. Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-1.
- Aram, K. and Rizzo, D. M. 2018. Distinct trophic specializations affect how to *Phytophthora ramorum* and clade 6 *phytophthora* spp. colonize and persist on *Umbellularia californica* leaves in streams. California. Phytopatology. 108(7):858-869. Doi: 10.1094/phyto-06-17-0196-R.
- Chen, X. and Wang, Y. 2017. *Phytophthora sojae*. In: biological invasions and its management in China. Simberloff, D. (Ed). Tennessee, USA. 252 p.
- Cline, E.; Farr, D. F. and Rossman, A. Y. 2008. A Synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. Baltimore. Plant Health Progress. 9(1):32-43. Doi: 10.1094/PHP-2008-0318-01-RS.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Minnesota. The American Phytopathological Society. 562 p.
- Hardham, A. and Blackman, L. M. 2018. Pathogen profile update *Phytophthora cinnamomi*. Australia. Plant Pathol. 19(2):260-285. Doi: 10.1111/mpp.12568.
- Hon, H. O. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. New York. J. Bacteriol. Mycol. 6(1):40-45. Doi:10.15406/jbmoa.2018.06.00174.
- Jeffers, S. N. 2006. Identifying species of *Phytophthora*. Clemson. Plant Dis. 83(12):1129-1136.
- Judelson, H. S. and Ah-Fong, A. M. 2019. Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease. Plant Physiol. 179(4):1198-1211. Doi: 10.1104/pp.18.00979.
- Kang, D. S; Min, K. J; Kwakl, 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*. Korea. Plant Pathol. J. 33(3):264-275. Doi: 10.5423/PPJ.OA.02.2017.0030.
- Kroon, L. P.; Bakker, F. T; Van, G. B.; Bonants, P. M. and Flier, W. G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Fungal Genet Biol. 41(8):766-782. Doi: 10.1016/j.fgb.2004.03.007.

- Lamour, K. H.; Stam, R.; Jupe, J. and Huitema, E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. United States. Mol. Plant Pathol. 13(4):329-337. Doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x.
- Loyd, A. L.; Benson, D. M. and Ivors, K. L. 2014. *Phytophthora* populations in nursery irrigation water in relationship to pathogenicity and infection frequency of *Rhododendron* and *Pieris*. North Carolina. Plant Dis. 98(9):1213-1220. Doi: 10.1094/PDIS-11-13-1157-RE.
- 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. PMID, 18943487.
- Redekar, N. M.; Eberhart, J. L. and Parke, J. L. 2018. Diversity of *Phytophthora*, *Pythium* and *Phytopythium* species in recycled irrigation water in a container nursery. Oregon. Phytobiomes J. 3(1):31-45. Doi: 10.1094/pbiomes-10-18-0043-r.
- 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. United States of America. J. Water. 11(12):2558. Doi: 10.3390/w11122558.
- Soto, A.; Rodríguez, G.; Fernández, Y. L.; Pedraza, M. E.; López, L.; Díaz, M. y Fernández, S. P. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 8(8):1867-1880.
- 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. Polonia. J. Plant Protec. Res. 56(1):96-100. Doi: 10.1515/jppr-2016-0014.
- Vega, J. C.; Beltrán, H. S.; Sevillano, 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. Canada. Frontiers in Plant Sci. 8(1):205. Doi:10.3389/fpls.2017.00205.
- Yang, X. and Hong, C. X. 2015. Diversity and populations of *Phytophthora*, *Phytopythium* and *Pythium* species recovered from sediments in an agricultural run-off sedimentation reservoir. Virginia. Plant Pathol. 65(1):1118-1125. Doi: 10.1111/ppa.12488.
- 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. Australia. Plant Pathol. 63(5):961-972. Doi: 10.1111/ppa.12223.