

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Pythium* AISLADAS DE PLANTAS ORNAMENTALES*

IDENTIFICATION OF *Pythium* SPECIES ISOLATED FROM ORNAMENTAL PLANTS

Marlene Díaz-Celaya¹, Gerardo Rodríguez-Alvarado¹, Hilda Victoria Silva-Rojas², Martha Elena Pedraza-Santos³, Rafael Salgado-Garciglia⁴ y Sylvia Patricia Fernández-Pavía^{1§}

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro, km 9.5. Tarímbaro, Michoacán, México. C. P. 58880. Tel. 01 443 2958323 y 2958324. (marle-dc@yahoo.com.mx), (gra.labpv@gmail.com). ²Producción de Semillas. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 555 8045900. (hvsilvard1@gmail.com). ³Facultad de Agrobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas esq. Berlín. Colonia Viveros, Uruapan, Michoacán, México. C. P. 60090. Tel. 01 452 5236474. (marelpea@yahoo.com.mx). ⁴Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán, México. C. P. 58060, Tel. 01 443 3265788. (rafael.salgadogarciglia@gmail.com). [§]Autora para correspondencia: fpavia@umich.mx.

RESUMEN

El uso de plantas ornamentales como elementos decorativos en jardines e interiores, ha tomado gran importancia en todo el mundo. Sin embargo, uno de los principales problemas en la producción de estas plantas en vivero es el inadecuado manejo fitosanitario, que ocasiona enfermedades causadas por *Pythium* spp. que afectan todas las etapas del ciclo de producción, ya que el patógeno es capaz de sobrevivir en agua, residuos de plantas y suelo. Debido al auge del cultivo de plantas ornamentales en vivero y a las pérdidas económicas producidas por patógenos vegetales, se han realizado estudios en diferentes viveros a nivel mundial, para detectar la presencia de estos; no obstante, en México los trabajos que existen son muy escasos. El objetivo de este estudio fue detectar e identificar especies de *Pythium* en muestras de tejido enfermo y en la rizosfera del suelo, procedentes de viveros ubicados en Morelia, Tarímbaro y Uruapan en el estado de Michoacán, mediante la caracterización morfológica y molecular. El estudio se realizó durante los años 2008 y 2009. Dieciocho aislamientos fueron obtenidos a partir de 17 hospederos, de los cuales

ABSTRACT

The use of ornamental plants as decoration in gardens and interiors has become worldwide quite important. However, one of the main problems in the production of these plants in the nursery is the inadequate phytosanitary handling, allowing diseases caused by *Pythium* spp. to affect all stages of production due that the pathogen can survive in water, plant residues and soil. With the rise of ornamental plants culture in nurseries and economic losses caused by plant pathogens, studies have been conducted in different nurseries around the world for detecting its presence; however, in Mexico there are only very few papers related to this matter. The aim of this study was to detect and identify *Pythium* species in samples of diseased tissues and soil's rhizosphere from nurseries located in Morelia, Tarímbaro and Uruapan in Michoacan State, by morphological and molecular characterization. The study was conducted in 2008 and 2009. Eighteen isolates were obtained from 17 hosts and 14 of them were pathogenic on cucumber. Thirteen isolates were characterized based on the sequences of the ITS region of rDNA and

* Recibido: junio de 2011
Aceptado: octubre de 2011

14 fueron patogénicos en pepino. Trece aislamientos se caracterizaron en base a las secuencias de la región ITS del ADNr y a las características morfológicas; las especies de *Pythium* identificadas fueron: un aislamiento con *P. aphanidermatum*, tres de *P. cylindrosporum*, uno con *P. dissotocum*, dos de *P. irregulare*, tres con *P. splendens*, dos de *P. ultimum* var. *ultimum* y uno con *Pythium* sp. nov.

Palabras clave: oomicete, patógeno, vivero.

INTRODUCCIÓN

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

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

La identificación de especies del género *Pythium* está basada en características morfológicas, como forma y tamaño de los esporangios, tamaño y ornamentación del oogonio, el número de anteridios y la forma en que están unidos (Van der Plaats-Niterink, 1981; Martin, 2009). La gran variación

morphological characteristics; identified *Pythium* species were: one isolation with *P. aphanidermatum*, three of *P. cylindrosporum*, one with *P. dissotocum*, two of *P. irregulare*, three with *P. splendens*, two of *P. ultimum* var. *ultimum* and one with *Pythium* sp. nov.

Key words: nursery, oomycete, pathogen.

INTRODUCTION

The *Pythium* genus comprises more than 120 species (Dick, 1990), which are widely distributed throughout the world. *Pythium* can live as a saprophyte on dead plant debris and it can be pathogenic. In production systems such as greenhouses, nurseries, agricultural fields and forests, it causes seed rot, seedling damping off, root rot, fruit rot and other plant organs that are in contact with the soil (MacDonald *et al.*, 1994; Agrios, 2005). It is also associated with a reduction in the vigor of mature plants, damaging the roots; but usually it does not kill them (Martin, 2009).

This oomycete can be introduced into nurseries, settle there, then spread and infect susceptible plants, a small number of infected plants generate a large number of propagules (MacDonald *et al.*, 1994). Due to economic losses caused by pathogens on ornamental plants in nurseries, studies have been performed worldwide in order to detect them and several species of *Pythium* have been identified causing damage, among which there are: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. intermedium*, *P. irregulare*, *P. pachycaule*, *P. paroecandrum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* var. *ultimum* and *P. vexans* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Al-Sa'di *et al.*, 2007), in irrigation water *P. dissotocum*, *P. porphyrae*, *P. sulcatum* and *P. torulosum* have been identified (Kong *et al.*, 2004). Studies about *Pythium* are limited, unlike *Phytophthora* taxon (also belonging to the Pythiaceae family) which destroys a large number of plants.

The identification of species of the *Pythium* genus is based on morphological characteristics, such as the shape and size of sporangia, size and ornamentation of oogonium, the antheridia number and the manner in which they are attached (Van der Plaats-Niterink, 1981; Martin, 2009). The great morphological variation within the genre and the fact that these features are shared between species, as well

de características morfológicas dentro del género y el hecho de que estas características son compartidas entre especies, así como la ausencia de estructuras que permitan la identificación de ciertas especies o aislamientos, dificulta en gran medida la identificación de este oomicete; por lo tanto, la caracterización morfológica debe complementarse con la identificación molecular. El análisis de las secuencias ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal (ADNr) ayuda a simplificar la clasificación de los aislamientos a nivel de especie.

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Se obtuvieron muestras de suelo y tejido enfermo de 25 géneros de plantas ornamentales con síntomas de marchitez de ocho viveros de los municipios de Morelia, Tarímbaro y Uruapan, del estado de Michoacán.

Obtención de aislamientos a partir de tejido vegetal

Los aislamientos fueron realizados directamente de las secciones de raíces de las plantas con síntomas. Se hicieron cortes de tejido de 5 a 10 mm a partir del borde de la lesión, estos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de

as the absence of structures that allow the identification of certain species or strains, seriously hampers this oomycete identification, so that morphological characterization must be complemented with molecular identification. The sequence analysis of ITS1, 5.8S and ITS2 of ribosomal DNA (rDNA) helps to simplify the classification of isolates to the species level.

This region of rDNA is the most used in studies of the *Pythium* genus, as it shows great variability and there is the availability of primers developed by White *et al.* (1990) for its amplification by the PCR technique. The use of molecular characteristics is particularly important for isolates that do not form structures such as oosporas and therefore they cannot be morphologically classified at species level. Some studies have shown that, the size of the ITS rDNA region varies from 750-1050 pb, indicating that it's higher than in fungus 300-700 pb, which provides a greater number of characters for analysis (Lévesque and De Cock, 2004).

Even though there are studies about the diversity of *Pythium* species in nurseries of some countries, in Mexico there are no reports about the oomycete presence in ornamental nurseries. So, the aim of this study was to detect and identify *Pythium* species in samples of diseased tissues and soil's rhizosphere from nurseries located in Morelia, Tarímbaro and Uruapan in Michoacán State.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Soil and diseased tissue samples were obtained from 25 genera of ornamental plants with wilt symptoms from eight nurseries in the municipalities of Morelia, Tarímbaro and Uruapan, Michoacán State.

Isolates obtained from plant tissue

Isolates were made directly from root sections of plants with symptoms. Tissue sections of 5 to 10 mm from the lesion edge were made; these were disinfected with a sodium hypochlorite solution (0.6%) for 30 s. Some sections were only rinsed with tap water. Then, placed in a Petri dish with cornmeal agar (PARN) containing: pentachloronitrobenzene (PCNB) (0.1 g L⁻¹), ampicillin (0.27 g L⁻¹), rifampicin (0.01

sodio (0.6%) durante 30 s. Algunos cortes únicamente se enjuagaron con agua. Después se colocaron en una caja Petri con medio selectivo de harina de maíz (PARN) conteniendo: pentacloronitrobenceno (PCNB) (0.1 g litro^{-1}), ampicilina (0.27 g litro^{-1}), rifampicina (0.01 g litro^{-1}) y natamicina (0.02 g litro^{-1}) y en medio selectivo V8 (PARN) conteniendo: PCNB (0.1 g litro^{-1}), ampicilina (0.27 g litro^{-1}), rifampicina (0.01 g litro^{-1}) y natamicina (0.02 g litro^{-1}). Se incubaron a temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta que se observó el crecimiento de colonias.

Obtención de aislamientos a partir de suelo o sustrato de siembra

Se tomaron muestras de la rizosfera del suelo directamente de plantas enfermas. Se colocaron en una caja Petri 10 g de suelo y 20 ml de agua destilada estéril, se usó como cebo hojas completas o discos de azalea (*Rhododendron indicum*). Las cajas Petri se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posteriormente los discos o las hojas completas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (0.06%) durante 30 segundos. Se sembraron en medio selectivo de harina de maíz PARN y se incubaron a temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), hasta que se observó el crecimiento de colonias. Los aislamientos puros se transfirieron a medio de cultivo de harina de maíz, a partir de los cuales se obtuvieron cultivos de punta de hifa y se almacenaron a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de microcentrifuga con agua destilada estéril.

Caracterización morfológica

Se realizó con los aislamientos obtenidos de punta de hifa que crecieron en los siguientes medios: agar-zanahoria (20 g de agar, 50 g de zanahoria en cubitos, 1 000 ml de agua destilada), V8-agar (20 g de agar, 3 g CaCO_3 , 160 ml de jugo de verduras V8 Campbell's, 840 ml de agua destilada) o en papa dextrosa agar, se mantuvieron en oscuridad a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se observaron estructuras. Se determinó el tipo de esporangios, si el micelio presentaba o no hinchamientos, presencia o ausencia de oosporas, tipo de oospora y número de anteridios. Se realizaron mediciones de esporangios, oosporas e hinchamientos de micelio cuando estuvieron presentes. Se determinó si crecieron a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Extracción de ADN

Los aislamientos obtenidos que crecieron en medio líquido de chícharo estéril; el ADN se extrajo a partir de micelio de cada aislamiento, para lo cual se utilizó el siguiente protocolo:

g L^{-1}) and natamycin (0.02 g liter^{-1}) and V8 selective medium (PARN) containing: PCNB (0.1 g liter^{-1}), ampicillin (0.27 g liter^{-1}), rifampin (0.01 g liter^{-1}) and natamycin (0.02 g liter^{-1}). Then, they were incubated at room temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) until colonies growth was observed.

Isolates obtained from soil or planting substrate

Samples from the soil's rhizosphere were taken directly from diseased plants. And then placed in a Petri dish with 10 g of soil and 20 ml of sterile distilled water, as bait full sheets or azalea discs were used (*Rhododendron indicum*). The Petri dishes were incubated for 24 h at room temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Later discs or whole leaves were disinfected with sodium hypochlorite solution (0.06%) for 30 seconds. Then they were seeded in PARN cornmeal agar and incubated at room temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) until colonies growth was observed. Pure isolates were transferred to cornmeal culture medium, from which hyphal tip cultures were obtained and stored at $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ in microcentrifuge tubes with sterile distilled water.

Morphological characterization

This was performed with the isolates obtained from hyphae tip that grew in the following mediums: carrot agar (20 g of agar, 50 g diced carrot, 1 000 ml of distilled water), V8-agar (20 g of agar, 3 g CaCO_3 , 160 ml Campbell's V8 vegetable juice, 840 ml of distilled water) or on potato dextrose agar, they were maintained in darkness at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ until structures were observed. Sporangia type was determined, whether or not the mycelium showed swelling, presence or absence of oospores, oospore type and antheridia number. Sporangia, oospores and mycelial swellings measurements were made when present. It was also determined if they grew at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature.

DNA extraction

For obtained isolates that grew in liquid medium of sterile pea; DNA was extracted from mycelium of each isolate, using the following protocol: each isolate that grew in pea liquid medium, which was prepared with 120 g peas in 1 000 ml of distilled water and sterilized for 20 min at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. And then filtered through cheesecloth and diluted in 1 liter of distilled water and then sterilized once again. It was poured in Petri dishes and incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ one or two weeks to get plenty of mycelial growth. The mycelium was rinsed with sterile distilled water in a funnel with

cada aislamiento que creció en medio líquido de chícharo, el cual se preparó colocando 120 g de chícharos en 1 000 ml de agua destilada, este se esterilizó durante 20 min a 121 °C. Posteriormente se filtró con manta de cielo y se aforó a 1 litro con agua destilada, y se esterilizó nuevamente. Se vació en cajas de Petri y se incubó a 25 °C, de una a dos semanas para obtener abundante crecimiento micelial. El micelio se enjuagó con agua destilada estéril en un embudo, con tela filtrante (Miracloth). Posteriormente el micelio se envolvió con papel filtro y papel aluminio estériles y se deshidrató durante 24 a 48 h a 4 °C.

El micelio deshidratado se molió en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se transfirió a tubos de microcentrífuga. El micelio se almacenó a -20 °C hasta que fue utilizado. A cada tubo con micelio molido se le agregaron 900 µl de búfer de extracción (0.05 M EDTA, 1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 0.25% SDS, 0.75% Mercaptoetanol), precalentado a 65 °C. Las muestras se incubaron a 65 °C durante 1 h. Posteriormente se adicionan 450 µl de una solución de acetato de amonio 7.5 M, se mezclaron vigorosamente durante 5 min y se mantuvieron en hielo durante 20 min.

Los tubos se centrifugaron a 13 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 800 µl de isopropanol, los tubos se agitaron manualmente y se mantuvieron en hielo por 30 min. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 13 200 rpm durante 15 min. Los tubos se mantuvieron invertidos para drenar el líquido, y la pastilla se secó a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 450 µl de TE pH 7.5 y luego se agregó 1 µl de ARNasa A (20 mg/ml), se dejó toda la noche a 4 °C.

Posteriormente se agregaron a cada tubo 450 µl de cloroformo: alcohol isoamil (24:1) y se mezcló vigorosamente durante 5 min, en seguida los tubos se centrifugaron a 13 200 rpm durante 5 min y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se agregaron 45 µl de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol 100% frío, los tubos se agitaron manualmente y mantuvieron por 1.5 h a -20 °C. Se centrifugaron los tubos a 13 200 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Esta se resuspendió en 100 µl de TE pH 7.5, y se dejó toda la noche a 4 °C. Las muestras se analizaron por electroforesis, colocando 5 µl de ADN en un gel de agarosa 1%/TAE durante 90 min a 50V.

Para amplificar la región de los espacios transcritos internos (ITS1, 5.8S e ITS2) se utilizaron los oligonucleótidos ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4

filter cloth (Miracloth). Subsequently, the mycelium was wrapped with sterile filter and foils paper and dehydrated for 24 to 48 h at 4 °C.

The dried mycelium was ground in a sterile mortar with liquid nitrogen until a fine powder was obtained and then transferred to microcentrifuge tubes. The mycelium was stored at -20 °C until it was used. To each tube with ground mycelium was added 900 µl of extraction buffer (0.05 M EDTA, 1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 0.25% SDS, 0.75% Mercaptoethanol), preheated at 65 °C. The samples were incubated at 65 °C for 1 h. Subsequently 450 µl of a 7.5 M ammonium acetate solution were added and vigorously mixed for 5 min and kept on ice for 20 min.

The tubes were centrifuged at 13 200 revolutions per minute (rpm) for 15 min. The supernatant was transferred to a fresh tube containing 800 µl of isopropanol; the tubes were shaken by hand and kept on ice for 30 min. The samples were again centrifuged at 13 200 rpm for 15 min. The tubes were inverted to drain the liquid and, the pellet was dried at room temperature. The pellet was re-suspended in 450 µl of TE pH 7.5 and then added 1 µl RNase A (20 mg/ml) and it was left overnight at 4 °C.

Subsequently to each tube 450 µl of chloroform were added: isoamyl alcohol, (24:1) and vigorously mixed for 5 min, then the tubes were centrifuged at 13 200 rpm for 5 min and the aqueous phase was transferred to a fresh tube. 45 µl of 3 M sodium acetate and 1 ml of 100% cold ethanol were added, the tubes were manually shaken kept for 1.5 h at -20 °C. The tubes were centrifuged at 13 200 rpm for 15 min. The supernatant was discarded and, the pellet was dried at room temperature. This was re-suspended in 100 µl of TE pH 7.5, and left overnight at 4 °C. The samples were analyzed by electrophoresis, placing 5 µl of DNA in a 1% agarose gel/TAE for 90 min at 50 V.

In order to amplify the region of the internal transcribed spaces (ITS1, 5.8S and ITS2), ITS5 oligonucleotides were used (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), which hybridize within the 18S rDNA and 28S rDNA genes. The conditions used for carrying out the PCR were as follows: 4 min at 95 °C, 34 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C, 2 min at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were analyzed by electrophoresis on agarose gels (1.5%) in order to determine the amplification degree.

(TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), los cuales hibridizan dentro de los genes 18S ADN_r y 28S ADN_r. Las condiciones usadas para la realización del PCR fueron las siguientes: 4 min a 95 °C, 34 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1.5%) para determinar el grado de amplificación.

Después se purificaron con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System—Promega), y se enviaron a la compañía MacroGen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron usando BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia se comparó con las secuencias de aislamientos tipo, depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Identificación de especies de *Pythium* mediante técnicas moleculares

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

El árbol filogenético se construyó con el método de máxima parsimonia, utilizando 836 pares de bases correspondientes al espacio transcrito interno del ADN_r, se usó la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (level= 1), con un árbol inicial con adiciones al azar (10 REPS), los gap/missing se consideraron como delecciones completas.

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

Pruebas de patogenicidad en plántulas de pepino

Preparación del inóculo. Se usaron hojas de pasto lavadas con agua y jabón, las cuales se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud y se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada. Los tubos se esterilizaron durante 20 min a 121 °C. Los tubos con las hojas de pasto

Then they were purified with a commercial kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System—Promega), and sent to MacroGen Company (South Korea). The obtained sequences were assembled and edited using BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), which created a consensus sequence. This sequence was compared with the sequences of type strains deposited in GenBank at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) by using the BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Identification of *Pythium* species using molecular techniques

In order to establish the phylogenetic relationships among the species of *Pythium*, the consensus sequences obtained from each strain were compiled in a fasta file and aligned with the profile mode Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994), included in the Mega program 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007).

The phylogenetic tree was constructed with the maximum parsimony method, using 836 base pairs corresponding to the internal rDNA transcribed space, the option Close Neighbour Interchange (CNI) search (level= 1) was used, with an initial tree with random additions (10 REPS), the gap/missing were considered as complete deletions.

In order to determine the values of confidence in the resulting tree groupings, a bootstrap analysis with 1 000 random replications was performed (Felsenstein, 1985). The reference sequences of each of the found species in this paper were obtained from the GenBank (NCBI). *Phytophthora* sp. accession number FJ217679 was assigned outside the group.

Pathogenicity tests on cucumber seedlings

Inoculum preparation. The grass-leaves were washed with soap and water, which were cut into pieces about 1 cm length and placed in test tubes with distilled water. The tubes were sterilized for 20 min at 121 °C. The tubes with sterile grass-blades were inoculated with mycelial disks of different *Pythium* isolates. They were incubated until the mycelium was observed, colonizing grass-leaves. This method was used as the grass is not toxic to the inoculated plant, unlike other culture medium used in other inoculation protocols.

Germination of seeds. Green cucumber seeds were used (*Cucumis sativus* L.) (Vita®). The seeds were washed with sterile distilled water, then dipped in ethanol (96%) for 5 s, and rinsed again with sterile distilled water and dried with sterile absorbent paper. The seeds were subsequently

estériles se inocularon con discos de micelio de los diferentes aislamientos de *Pythium*. Se incubaron hasta que se observó al micelio colonizando las hojas de pasto. Se utilizó este método ya que el pasto no es tóxico para la planta inoculada, como lo puede ser el medio de cultivo que se utiliza en otros protocolos de inoculación.

Germinación de semillas. Se usaron semillas de pepino verde (*Cucumis sativus* L.) (Vita®). Las semillas se lavaron con agua destilada estéril, enseguida se sumergieron en etanol (96%) durante 5 s, nuevamente se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Las semillas se transfirieron posteriormente a cajas Petri estériles en las que se colocó papel filtro estéril humedecido. Se incubaron a 25 °C expuestas a la luz durante 6 días.

Trasplante e inoculación de las plántulas. Las plántulas de pepino se colocaron en macetas de plástico que se llenaron con suelo (turba/agrolita) estéril, humedecido; se mantuvieron a 23 °C $\pm$ 3 °C, expuestas a la luz. Seis días después del trasplante se realizó la inoculación, la cual se hizo colocando una de las hojas de pasto colonizadas por *Pythium* cerca del tallo de cada plántula y se cubrió con suelo. Después de la inoculación se regó cada plántula con el propósito de mantener condiciones de alta humedad. Seis plántulas por aislamiento fueron inoculadas y tres fueron usadas como control. Durante el experimento las plántulas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 °C $\pm$ 3 °C) y en condiciones de alta humedad.

RESULTADOS

Obtención de aislamientos

Se obtuvieron 18 aislamientos del género *Pythium* a partir de 17 de las 25 plantas ornamentales muestreadas procedentes de viveros de Morelia, todas mostrando síntomas de marchitez (Cuadro 1). No se detectó *Pythium* en las plantas de los municipios de Tarimbaro y Uruapan.

Caracterización de los aislamientos

La caracterización morfológica de los aislamientos permitió la identificación de siete especies de *Pythium*: *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. cylindrosporum* B. Paul, *P. dissotocum* Drechsler, *P. irregulare* Buisman, *P. ultimum* Trow var. *ultimum*, *P. splendens* Hans Braun. y *Pythium* sp.

transferred to sterile Petri dishes with moistened sterile filter paper. Then, they were incubated at 25 °C exposed to light for 6 days.

Seedlings transplantation and inoculation. Cucumber seedlings were placed in plastic pots filled with wetted sterile soil (peat/perlite) they were maintained at 23 °C $\pm$ 3 °C and exposed to light. Six days after transplantation, the inoculation was performed, which was made by placing one of the grass-leaves colonized by *Pythium*, near the stem of each seedling and covered with soil. After the inoculation, each seedling was irrigated in order to maintain high humidity conditions. Six seedlings per isolate were inoculated and three were used as controls. During the experiment, the seedlings were kept at room temperature (23 °C $\pm$ 3 °C) and in high humidity conditions.

RESULTS

Isolates collection

Eighteen isolates of the *Pythium* genus were obtained from 17 out of the 25 sampled ornamental plants from Morelia nurseries, all showing wilting signs (Table 1). *Pythium* was not detected in plants of Tarimbaro and Uruapan municipalities.

Cuadro 1. Plantas ornamentales en viveros de Morelia, donde se obtuvieron aislamientos de *Pythium*.
Table 1. Ornamental plants in Morelia nurseries, where *Pythium* isolates were obtained.

Hospedero	Síntomas	Año de colecta
<i>Ruta graveolens</i>	Marchitez	2008
<i>Buxus sempervirens</i>	Marchitez	2009
<i>Cedrus</i> sp.	Marchitez	2008
<i>Primula acaulis</i>	Marchitez	2008
<i>Saintpaulia hybrida</i>	Marchitez	2009
<i>Cyclamen persicum</i>	Marchitez	2009
<i>Rhododendron indicum</i>	Marchitez	2009
<i>Gazania rigens</i>	Marchitez	2009
<i>Impatiens hawkeri</i> x <i>hybrida</i>	Marchitez	2009
<i>Portulaca grandiflora</i>	Marchitez	2009
<i>Santolina chamaecyparissus</i>	Marchitez	2009
<i>Alyssum maritimum</i>	Marchitez	2009
<i>Gerbera</i> sp.	Marchitez	2009

nov. Detectándose más de una especie en todos los viveros. La identificación morfológica se confirmó mediante la secuenciación de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr (Van der Plaats-Niterink, 1981; Lévesque y De Cock, 2004; McLeod *et al.*, 2009) (Cuadro 2). Las características morfológicas observadas se muestran en el Cuadro 3 y en la Figura 1. Se detectaron tanto especies homotáticas como heterotáticas.

Cuadro 2. Especies de *Pythium* identificadas.
Table 2. *Pythium* species identified.

Especies	BLAST (%) de similitud
<i>P. irregulare</i>	99
<i>P. splendens</i>	99
<i>P. splendens</i>	99
<i>P. irregulare</i>	99
<i>Pythium</i> sp. nov.	-
<i>P. cylindrosporum</i>	99
<i>P. splendens</i>	100
<i>P. dissotocum</i>	100
<i>P. cylindrosporum</i>	100
<i>P. cylindrosporum</i>	100
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	100
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	100
<i>P. aphanidermatum</i>	99

Characterization of isolates

Morphological characterization of the isolates allowed the identification of seven *Pythium* species: *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. cylindrosporum* B. Paul, *P. dissotocum* Drechsler, *P. irregulare* Buisman, *P. ultimum* Trow var. *ultimum*, *P. splendens* Hans Braun. and *Pythium* sp. nov. Detecting more than one species in all the nurseries. The morphological identification was confirmed by sequencing the ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA regions (Van der Plaats-Niterink, 1981; Lévesque and De Cock, 2004; McLeod *et al.*, 2009) (Table 2). Observed morphological characteristics are shown in Table 3 and Figure 1. Heterothallic and homothallic species were detected.

The phylogenetic position of species within the *Pythium* genus is shown in Figure 2, the tree was constructed with sequences corresponding to the internal transcribed space (ITS) of rDNA, using the maximum parsimony method.

Pathogenicity tests

Fourteen out of the 18 isolates obtained in this paper were pathogenic on cucumber, drowning symptoms in seedlings occurred between two and nine days after inoculation. The controls had no symptoms.

Cuadro 3. Características morfológicas observadas en los aislamientos de *Pythium*.
Table 3. Morphological characteristics observed in *Pythium* isolates.

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

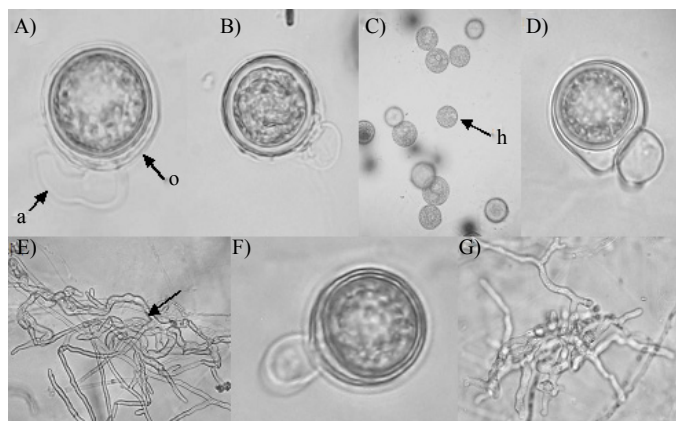


Figure 1. Structures of belonging species to *Pythium* genus. A) *P. irregulare*, a= antheridium; o= oogonium 40X. B) *P. ultimum* var. *Ultimum*, antheridium and oogonium 40X. C) *P. splendens*, h= 40X mycelial swellings. D); and E) *P. aphanidermatum* antheridium and oogonium, e= sporangia 40X. F) *P. cylindrosporum* antheridium and oogonium 40X. G) *P. dissotocum*, sporangia 40X.

La posición filogenética de las especies dentro del género *Pythium* se muestra en la Figura 2, el árbol fue construido con secuencias correspondientes al espacio transcrito interno (ITS) del ADNr usando el método de máxima parsimonia.

Pruebas de patogenicidad

Catorce de los 18 aislamientos obtenidos en este estudio fueron patógenos en pepino, los síntomas de ahogamiento en las plántulas se presentaron entre dos y nueve días después de la inoculación. Los testigos no presentaron síntomas.

DISCUSIÓN

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

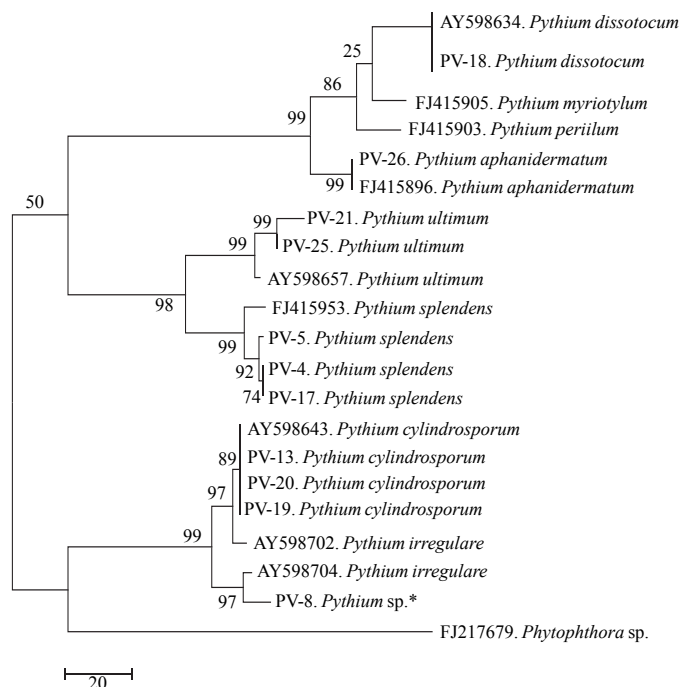


Figura 2. Árbol filogenético de *Pythium* detectadas en viveros.
Las secuencias obtenidas se compararon con los aislamientos del Gen Bank de NCBI (códigos AY y FJ). Se utilizó la secuencia FJ217679 de *Phytophthora* sp.

Figure 2. Phylogenetic tree of *Pythium* detected in nurseries.
The sequences obtained were compared to the isolates from NCBI GenBank (AY and LF codes). The FJ217679 sequence of *Phytophthora* sp. was used.

DISCUSSION

Plant health problems that cause diseases in nurseries dedicated to the production and sale of ornamental plants are not treated in most cases due to lack of knowledge about the identity of the pathogens. Therefore, this paper is an important advance because seven species of *Pythium* were identified, causing wilt symptoms in 17 species of ornamental plants in nurseries of Morelia, Michoacán.

In Mexico there are few reports about diseases caused by oomycetes in nurseries. There are reports of pathogens that cause damage to ornamental plants in nurseries from around the world, among which are those caused by *Pythium* oomycetes (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995;

siete especies de *Pythium*, ocasionando síntomas de marchitez en 17 especies de plantas ornamentales en viveros de Morelia, Michoacán.

En México son escasos los reportes acerca de enfermedades causadas por oomicetes en viveros. Existen reportes de patógenos que causan daños en plantas ornamentales en viveros de diferentes partes del mundo, entre los que se encuentran los ocasionados por los oomicetes *Pythium* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2004; Al-Sa'di *et al.*, 2007) y *Phytophthora* (Warfield *et al.*, 2008; Moralejo *et al.*, 2009; Yakabe *et al.*, 2009).

Debido a que *Pythium* puede encontrarse como saprófito, se han diseñado pruebas de patogenicidad en las cuales se utilizan plántulas de pepino como cebos, para la evaluación del potencial infeccioso de aislamientos de *Pythium* (Sánchez *et al.*, 2001; Sánchez y Gallego, 2002). Esta prueba de patogenicidad en plántulas de pepino resultó muy efectiva, ya que permitió seleccionar 14 aislamientos patogénicos de los 18 aislamientos de *Pythium*, obtenidos de cuatro viveros de Morelia, Michoacán. Esto es indicativo del gran problema fitosanitario que ocasiona este patógeno en la producción masiva de plantas. Asimismo, se detectó el amplio rango de hospedantes que tiene este oomicete, al haberse aislado de diferentes plantas ornamentales. De las plantas ornamentales analizadas únicamente el género *Rhododendron*, había sido previamente reportado a nivel mundial como hospedante de *Pythium* (Ho, 1986).

La identificación morfológica de los aislamientos se confirmó con las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, se identificaron siete especies: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. irregulare*, *P. splendens* y *Pythium* sp. nov. Es importante mencionar que las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de los aislamientos tipo. Se menciona esto porque existen secuencias en el GenBank (NCBI), que están incorrectamente clasificadas, y no corresponden a la especie que reportan. Las secuencias obtenidas del aislamiento PV8 presentaron 95% de homología con *P. debaryanum*, debido a este bajo porcentaje se puede considerar como una especie no descrita. Con respecto a las especies identificadas, cuatro de ellas ya han sido reportadas en viveros ornamentales, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. aphanidermatum* y *P. irregulare* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2004; Al-Sa'di *et al.*, 2007).

Kong *et al.*, 2004; Al-Sa'di *et al.*, 2007) and *Phytophthora* (Warfield *et al.*, 2008; Moralejo *et al.*, 2009; Yakabe *et al.*, 2009).

Since *Pythium* can be found as a saprophyte, pathogenicity tests have been designed using cucumber seedlings as bait, in order to evaluate the infectivity of *Pythium* isolates (Sánchez *et al.*, 2001; Sánchez and Gallego, 2002). This pathogenicity test in cucumber seedlings was very effective as it allowed us to select 14 pathogenic isolates of 18 *Pythium* isolates obtained from four nurseries in Morelia, Michoacán. This is indicative of major phytosanitary problem caused by this pathogen in the mass production of plants. The broad host range of this oomycete was also detected, having been isolated from different ornamental plants. From the ornamental plants analyzed, only the *Rhododendron* genus had been reported worldwide as a *Pythium* host (Ho, 1986).

The morphological identification of isolates was confirmed with the sequences of the ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA regions, seven species were identified: *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. irregulare*, *P. splendens* and *Pythium* sp. nov. It is noteworthy that, the sequences obtained were compared with sequences of type strains. This is mentioned because there are sequences in the GenBank (NCBI) that are incorrectly classified, and do not correspond to the species reported. The sequences obtained in PV8 isolation, showed 95% homology with *P. Debaryanum*, due to this low percentage it can be considered as an un-described species. Regarding to the identified species, four of them have been already reported in ornamental nurseries, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. aphanidermatum* and *P. irregulare* (Duff, 1993; Tello *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2004; Al-Sa'di *et al.*, 2007).

It has been reported that among most pathogenic *Pythium* species, there are *P. cylindrosporum*, *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum* and *P. splendens* (Miller and Sauve, 1975; cited in Moorman *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2004), all identified in this paper. Diseases caused by *Pythium* are a major limiting factor that affects the production of floral crops (Kong *et al.*, 2004). Furthermore, *Pythium* can be transported from one place to another through infested soil or irrigation water, as well as by cuttings, seeds or infected plants. In Michoacán, plants are sold from different States

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

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

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 18 aislamientos de *Pythium* a partir de muestras de suelo y tejido enfermo de 17 especies ornamentales de cuatro viveros de Morelia.

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

Se reportan 13 hospederos para las diferentes especies de *Pythium* identificadas en este estudio: ruda (*Ruta graveolens*), primavera (*Primula acaulis*), *Buxus sempervirens*, pino (*Cedrus* sp.), violeta africana (*Saintpaulia hybrida*), violeta imperial (*Cyclamen persicum*), azalea (*Rhododendron indicum*), gazania (*Gazania rigens*), belén (*Impatiens*

among which are the Mexico State, Guanajuato, Guerrero and Jalisco so, this pathogen is spreading from State to State within the country.

The identification of *Pythium* species in a nursery is quite important because it represents the first step in developing effective management strategies (Kong *et al.*, 2004). Among these strategies is recommended to sterilize the substrate before being used, most of the nurseries uses forest soil, which comes from oak or pine forests and it can be infested by *Pythium*. The pots should be well drained to prevent damage from this pathogen. This paper attempts to provide information on damage and symptoms of diseases caused by *Pythium* spp. on several ornamental species, which are widely marketed in nurseries from Morelia, Michoacán.

CONCLUSIONS

Eighteen *Pythium* isolates were obtained from soil samples and diseased tissue from 17 ornamental species of four nurseries in Morelia.

Seven *Pythium* species were identified based on morphology and sequences of the ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA regions: *P. aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. splendens*, *Pythium* sp. nov.

Thirteen hosts are reported for different species of *Pythium* found in this study: ruda (*Ruta graveolens*), primavera (*Primula acaulis*), *Buxus sempervirens*, pine (*Cedrus* sp.) african violet (*Saintpaulia hybrida*), violeta imperial (*Cyclamen persicum*), azalea (*Rhododendron indicum*), Gazania (*Gazania rigens*), belén (*Impatiens hawkeri* x *hybrida*), amor de un rato (*Portulaca grandiflora*), santolin (*Santolina chamaecyparissus*), panalillo (*Alyssum maritimum*) and gerbera (*Gerbera* sp.).

From the ornamental plants analyzed, only the *Rhododendron* genus had been reported worldwide as a *Pythium* host.

End of the English version



hawkeri x *hybrida*), amor de un rato (*Portulaca grandiflora*), santolin (*Santolina chamaecyparissus*), panalillo (*Alyssum maritimum*) y gerbera (*Gerbera* sp.).

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

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera muy especial a la Dra. Gloria Abad por su valiosa ayuda en el análisis de las secuencias, para la determinación de las especies.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5^{ta} edición. Editorial Academic Press. México. 922 p.
- Al-Sa'di, A. M.; Drenth, A.; Deadman, M. L.; Al-Said, F. A.; Khan, I. and Aitken, E. A. B. 2007. Potential sources of *Pythium* inoculum into greenhouse soils with no previous history of cultivation. J. Phytopathol. 156:502-505.
- Dick, W. M. 1990. Keys to *Pythium*. Ed. Dick, M. W.. Department of Botany. School of Plant Sciences. University of Reading. Reino Unido. 64 p.
- Duff, J. D. 1993. The incidence of *Phytophthora* and *Pythium* species in Northern territory nurseries. Australasian Plant Pathol. 22:149-151.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: an approach using the bootstrap. Evolution. 39:783-791.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.
- Ho, H. H. 1986. *Pythium dimorphum* from *Rhododendron*. Mycopathologia. 93:141-145.
- Kong, P.; Richardson, P. A. and Hong, C. 2004. *Pythium* and recycled irrigation water. Pest and Dis. 32-35 pp.
- Lévesque, C. A. and De Cock, A. W. A. M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycol. Res. 108(12):1363-1383.
- MacDonald, J. D.; Ali-Shtayed, M. S.; Kabashima, J. and Stites, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. Plant Dis. 78:607-611.
- McLeod, A.; Botha, W. J.; Meitz, J. C.; Spies, C. F.; Tewoldemedhin, Y. T. and Mostert, L. 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. Mycol. Research. 113:933-951.V
- Martin, F. 2009. *Pythium* Genetics, In: oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools. Lamour, K. and Kamoun, S. (eds.). Wiley Blackwell. Estados Unidos de América. 213-239 pp.
- Moorman, G. W.; Kang, S.; Geiser, D. M. and Kim, S. H. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Dis. 86:1227-1231.
- Moralejo, E.; Pérez-Sierra, A. M.; Álvarez, L. A.; Belbahri, L.; Lefort, F. and Descals, E. 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. Plant Pathol. 58:100-110.
- Sánchez, J.; Olivares, J. S. and Gallego, E. 2001. Occurrence and pathogenicity of *Pythium* spp. in the dust deposited on the greenhouse roofs in the Poniente region of Almeria (South-East Spain). J. Plant Pathol. 83:13-19.
- Sánchez, J. and Gallego, E. 2002. Fitopatogenicidad de *Pythium* spp. presentes en el agua de riego del poniente almeriense (sureste de España). Revista Iberoamericana de Micología. 19:177-180.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molec. Biol. Evol. 24:1596-1599.
- Tello, M. M. L.; Alonso, A. y Mateo-Sagasta, Azpeitia, E. 1995: Algunos hongos patógenos detectados en raíces de diferentes plantas ornamentales en viveros de la Comunidad de Madrid. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 21:517-526.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.
- Van Der Plaats-Niterink, A. J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Vol. 21. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn. The Netherlands. 242 p.
- Warfield, C. Y.; Hwang, J. and Benson, D. M. 2008. *Phytophthora* blight and dieback in North Carolina nurseries during a 2003 survey. Plant Dis. 92:474-481.

- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds.). Academic Press. Estados Unidos de América. 315-322 pp.
- Yakabe, L. E.; Blomquist, C. L. and Thomas, S. L. 2009. Identification and frequency of *Phytophthora* species associated with foliar diseases in California ornamental nurseries. *Plant Dis.* 93:883-890.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Computational Biol.* 7:203-14.