

Phytophthora capsici and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants

Tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* coexisten en plantas ornamentales de vivero

Alejandro Soto-Plancarte, Sylvia Patricia Fernández-Pavía*, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Luis López-Pérez, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, CP. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México; Yolanda Leticia Fernández-Pavía, Programa de Fruticultura, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México; Martha Elena Pedraza-Santos, Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas esquina Berlín, Colonia Viveros, CP. 60090, Uruapan, Michoacán, México; Juan Emilio Álvarez-Vargas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, CP. 62209, Cuernavaca, Morelos, México. *Autor para correspondencia: fernandezpavia@hotmail.com.

Recibido: 19 de Diciembre, 2017.

Aceptado: 02 de Marzo, 2018.

Soto-Plancarte A, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, López-Pérez L, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, Álvarez-Vargas JE. 2018. *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants. *Revista Mexicana de Fito-patología* 36(2): 298-307.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-5

Primera publicación DOI: 11 de Abril, 2018.

First DOI publication: April 11, 2018.

Resumen. No se ha reportado la presencia de ambos tipos de compatibilidad de especies de *Phytophthora* en plantas hospedantes sembradas en una misma maceta en viveros comerciales de México. En 2015, se colectaron aislados de *Phytophthora* en viveros comerciales en la Ciudad de México y en el estado de Morelos. Se detectaron los tipos de

Abstract. The presence of both mating types of *Phytophthora* species in the same pot has not been reported in hosts of commercial nurseries in Mexico. Isolates of *Phytophthora* were collected in commercial nurseries of Mexico City and Morelos state during 2015. Mating types A1 and A2 of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* were detected on wilted plants of *Capsicum annuum* (stems) and *Petunia x hybrida* (rhizosphere), respectively. *Phytophthora* isolates coinoculated in planta formed oospores under greenhouse conditions. *Phytophthora* was reisolated from inoculated plants, and identified with morphological and molecular tools. Mating types A1 and A2 of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* occur simultaneously within nursery plants, this suggests that sexual recombination and genetic variation is occurring. Mating types A1 and A2 of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora dechsleri* were detected

compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* en plantas marchitas de *Capsicum annuum* (tallos) y *Petunia x hybrida* (rizósfera), respectivamente. Los aislados de *Phytophthora* co-inoculados *in planta* formaron oosporas en condiciones de invernadero. *Phytophthora* fue re-aislada de plantas inoculadas e identificada mediante herramientas morfológicas y moleculares. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* se presentan simultáneamente en plantas de invernadero, lo cual sugiere que están ocurriendo recombinación sexual y variación genética. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* fueron detectados por primera vez en *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida* respectivamente, en viveros mexicanos.

Palabras clave: Oomicetes, oosporas, *Petunia*, *Capsicum annuum*.

La planta ornamental *Petunia x hybrida*, así como plantas de chile para huertos familiares, se producen en el estado de Morelos y en la Ciudad de México, dos de las más importantes entidades productoras de plantas ornamentales de invernadero en México (Mundo-Ocampo, 2006). Sin embargo, su producción es afectada por enfermedades que afectan a la raíz, causadas por varias especies de *Phytophthora*. *P. capsici* es un patógeno muy destructivo con un rango de plantas hospedantes de más de 50 especies vegetales a nivel mundial, entre ellas, solanáceas, cucurbitáceas, fabáceas y plantas ornamentales (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado que *P. drechsleri* afecta a más de 25 especies de plantas hortícolas y ornamentales (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2012). En México, uno de los

for the first time in *Capsicum annuum* and *Petunia x hybrida* respectively, in Mexican nurseries.

Key words: Oomycetes, Oospores, *Petunia*, *Capsicum annuum*.

The ornamental plant *Petunia x hybrida* and chili pepper plants for home gardens are produced in Morelos state and Mexico City, two of the most important locations that grow ornamental nursery flower pot plants in Mexico (Mundo-Ocampo, 2006). Nevertheless, production is limited by root diseases caused by various *Phytophthora* species. *P. capsici* is a highly destructive pathogen with a host range of over 50 plant species including Solanaceous, Cucurbitaceous, Fabaceous and ornamental plants around the world (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013), on the other hand *P. drechsleri*, has been reported affecting over 25 horticultural and ornamental plant species (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2012). In Mexico, one of the most important root pathogens is *Phytophthora capsici*, which is a highly destructive pathogen of chili pepper plants. These *Phytophthora* species are heterothallic, requiring the presence of opposite mating types (A1 and A2) for oospore formation. The occurrence of mating types of *P. capsici* and *P. drechsleri* in the same nursery on different hosts has been detected in previous studies conducted in our laboratory in Mexico (data not published). However, the presence of both mating types of these species in the same host in ornamental nurseries has not been documented. The objective of this study was to determine if both, A1 and A2, mating types of *Phytophthora* species can be present in the same host, and if oospores are formed *in planta* under greenhouse controlled conditions.

más importantes patógenos que afectan la raíz es *Phytophthora capsici*, y es sumamente destructivo en plantas de chile. Estas especies de *Phytophthora* son heterotálicas y requieren la presencia de tipos de compatibilidad opuestos (A1 y A2) para formar oosporas. La presencia de los tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* en diferentes plantas hospedantes en un mismo vivero ha sido detectada en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio en México (datos no publicados). Sin embargo, no se ha documentado la presencia de ambos tipos de compatibilidad de esas especies en una misma planta hospedera en viveros de plantas ornamentales. El objetivo del presente estudio fue determinar si ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de especies de *Phytophthora* pueden estar presentes en la misma planta hospedante, y si las oosporas se forman *in planta* bajo condiciones controladas de invernadero.

Los aislados de *Phytophthora* se obtuvieron de viveros comerciales de plantas de *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida* con síntomas de marchitamiento en Morelos y en la Ciudad de México en 2015. Para aislar el patógeno se analizó tejido vegetal de *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida* colectado de la rizósfera de plantas infectadas que mostraban síntomas de marchitez y pudrición de raíz. Los tejidos vegetales fueron enjuagados con agua corriente; se cortaron pequeños fragmentos infectados, se sembraron en un medio de cultivo NARPH-V8 (Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50% natamicina, 50 % lactosa)], ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), PCNB (0.10 g L⁻¹) e himexazol (0.075 g L⁻¹), y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Muestras de suelo de la rizósfera fueron sometidas a la utilización de hojas de *Rhododendron* sp. como cebo. Brevemente, se pusieron a flote seis hojas de *Rhododendron* sobre suelo completamente inundado (10 g de suelo:20 mL de agua estéril) e incubadas por 48 h a 25 °C; se eliminó el

Phytophthora isolates were obtained from commercial nursery plants of *Capsicum annuum* and *Petunia x* hybrid with wilting symptoms in Morelos and Mexico City, Mexico, during 2015. Plant tissue of *Capsicum annuum* and *Petunia x* hybrid soil of the rhizosphere from diseased plants with wilt and root rot symptoms were analyzed for pathogen isolation. Plant tissues were rinsed with running water, small diseased tissue fragments were cut, plated out onto NARPH-V8 medium (Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50% natamycin, 50% lactose)], Ampicillin (0.27 g L⁻¹), Rifampicin (0.01 g L⁻¹), PCNB (0.10 g L⁻¹), and Hymexazol (0.075 g L⁻¹) and incubated at 25 °C in the dark. Soil samples of the rhizosphere were subjected to *Rhododendron* sp. leaves baiting. Briefly, six *Rhododendron* leaves were floated over flooded soil (10 g of soil:20 mL of sterile water) and incubated for 48 h at 25 °C, the petiole was removed, disinfested with 10% commercial bleach (0.6% sodium hypochlorite) for 30 sec, rinsed with sterile distilled water twice, blotted dry with sterile paper towels, transferred to NARPH-V8 plates, and incubated as above. *Phytophthora* isolates were identified by examination under a microscope and transferred to corn meal agar media (CMA, 17 g L⁻¹) to obtain pure cultures by the hyphal tip method. Sporangia were produced and morphologically characterized by incubating V8 agar blocks plus mycelia, in sterile distilled water at 25 °C under continuous fluorescent light for three to five days. Mating type of the *Phytophthora* isolates was determined by pairing them with known A1 and A2 strains of *P. capsici* and *P. cinnamomi* on V8 agar at 25 °C in the dark and examined after 20 days. Additionally, opposite mating types of the *Phytophthora capsici* (A1 and A2) and *P. drechsleri* (A1 and A2) isolates were paired out. Pairing of opposite mating types *in planta* was carried out by inoculating *Phytophthora*

pecíolo, se desinfectó con cloro comercial al 10% (0.6% hipoclorito de sodio) por 30 seg, se enjuagó dos veces con agua destilada estéril, se secó con toallas de papel estériles, se transfirió a cajas que contenían NARPH-V8 y se incubó como se indicó anteriormente. Los aislados de *Phytophthora* fueron identificados bajo el microscopio y, a continuación, se transfirieron a medio de cultivo harina de maíz agar (CMA, 17 g L⁻¹), con la finalidad de obtener cultivos puros utilizando el método de punta de hifa. Se produjeron esporangios que fueron caracterizados morfológicamente incubando bloques de agar V8 con micelio en agua destilada estéril a 25 °C bajo luz fluorescente continua de tres a cinco días. El tipo de compatibilidad de los aislados de *Phytophthora* se determinó apareándolos con cepas conocidas, A1 y A2 de *P. capsici* y *P. cinnamomi* en agar V8 a 25 °C en obscuridad y examinándolos 20 días después. También se aparearon los tipos de compatibilidad opuestos de los aislados de *Phytophthora capsici* (A1 y A2) y de *P. drechsleri* (A1 y A2). El apareamiento de los tipos de compatibilidad opuestos *in planta* se llevó a cabo mediante la inoculación de aislados de *Phytophthora* en plantas sanas de *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida*. El inóculo consistió en discos de 6 mm con agar V8 con micelio y esporangios. Uno de los discos que contenía el aislado A2 de *Phytophthora* se colocó en la base del tallo, y el segundo, que contenía el aislado A1 de *Phytophthora*, se colocó a 3 cm de distancia del primer disco. Las plantas control fueron inoculadas con discos de 6 mm que contenían agar V8 sin el patógeno. Las plantas se inundaron durante 24 h para favorecer el desarrollo de la enfermedad. Para confirmar la formación de oosporas *in planta* se observaron muestras de tejido necrótico del tallo bajo un microscopio de campo luminoso con el objetivo 40x. Los tejidos fueron lavados con cuidado en agua jabonosa, enjuagados con agua destilada estéril, aclarados durante 40 seg

isolates on healthy plants of *Capsicum annuum* and *Petunia x hybrid*. Inoculum consisted of six mm disks of V8 agar with mycelia and sporangia. One disk of a *Phytophthora* isolate A2 was placed on the base of the stem, while a second disk of a *Phytophthora* isolate A1 was placed three cm apart from the first disk. Control plants were inoculated with six mm disks of V8 agar without the pathogen. Plants were flooded for 24 h to favor disease development. Oospore formation *in planta* was confirmed by observing under a bright field microscope at 40x samples of necrotic stem tissue. Tissues were gently washed in soapy water, rinsed with distilled sterile water, clarified in boiling 96% ethanol for 40 sec, cooled down for 30 min, and repeating the ethanol clarification step for 40 sec, afterwards, the tissue was mounted on a glass slide.

Genomic DNA extraction was obtained by culturing the isolates on 2% clarified liquid V8 at 21 °C for 15 to 20 days, and the protocol by Möller *et al.*, (1992) was followed with modifications as previously described by Robideau *et al.*, (2011). At the final step, DNA pellet was resuspended in 0.1X TE buffer containing 50 µg/mL of RNase A and incubated at 65 °C for 10 min.

The ribosomal DNA ITS (internal transcribed spacer) region was amplified using primers UN-up18S42 (Bakkeren *et al.*, 2000), UN-lo28S1220 (Bala *et al.*, 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 and ITS4 (Lévesque and De Cock 2004). Partial sequences of the mitochondrial gene COI (cytochrome *c* oxidase subunit 1) were amplified with primers OomCoxII_{levup} and Fm85mod (Martin and Tooley, 2003), and β-tubulin with primers Oom-Btub-up415 and Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau *et al.*, 2007).

PCR amplifications were performed using the following conditions: all reactions had an initial denaturation step at 95 °C for 3 min and a final extension step at 72 °C for 8-10 min. The ITS

en etanol al 96% hirviendo, enfriados durante 30 min; el aclarado con etanol se repitió durante 40 seg y posteriormente, el tejido se colocó en un portaobjetos de vidrio.

Para extraer el ADN genómico, los aislados se cultivaron en medio líquido de V8 clarificado al 2% a 21 °C por 15 a 20 días, y se siguió el protocolo de Möller *et al.* (1992) con modificaciones previamente descritas por Robideau *et al.* (2011). En el último paso, la pastilla de ADN fue re-suspendida en una solución amortiguadora 0.1X TE a la cual se agregaron 50 µg/mL de ribonucleasa (RNasa) A, y se incubó a 65 °C por 10 min.

La región del ITS (espaciador transcrito interno) del ADN ribosómico fue amplificada utilizando los iniciadores UN-up18S42 (Bakkeren *et al.*, 2000), UN-lo28S1220 (Bala *et al.*, 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 y ITS4 (Lévesque y Cock, 2004). Secuencias parciales del gen mitocondrial COI (citocromo *c* oxidasa subunidad 1) fueron amplificadas con los iniciadores OomCoxILevup y Fm85mod (Martin y Tooley, 2003), y β -tubulina con los iniciadores Oom-Btub-up415 y Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau *et al.*, 2007).

Las amplificaciones en PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: todas las reacciones fueron sometidas a un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min y un paso final de extensión a 72 °C de 8 a 10 min. La región ITS amplificada con los iniciadores Oom-up18S67 y UN-lo28S1220 se llevó a cabo en 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 58 °C por 45 seg, y 72 °C por 2 min. La misma región fue amplificada con los iniciadores UN-up18S42 y ITS4 en 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 68 °C por 45 seg y 72 °C por 1.5 min.

Las condiciones para amplificar el COI fueron las mismas descritas por Robideau *et al.* (2011). La amplificación del gen β -tubulina de los aislados de *P. capsici* consistió en 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Para los

region amplified with primers Oom-up18S67 and UN-lo28S1220 was performed with 35 cycles of 95 °C for 30 sec, 58 °C for 45 sec, and 72 °C for 2 min. The same region amplified with primers UN-up18S42 and ITS4 utilized 40 cycles of 95 °C for 30 sec, 68 °C for 45 sec, and 72 °C for 1.5 min.

Amplification conditions for COI were the same as those described by Robideau *et al.*, (2011). Amplification of the β -tubulin gene for *P. capsici* isolates were 40 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. For the *P. drechsleri* isolates a touch-down PCR was performed under the conditions described by Blair *et al.*, (2008), decreasing the temperature from 68 to 58 °C.

An Applied Biosciences Prism® 3130xl genetic analyzer was used to generate the DNA sequences from the amplification sequencing reactions. The sequences were assembled, edited to obtain consensus sequences, aligned with published sequences (NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and analyzed using the Blast program (Geneious 8.1, www.geneious.com) to determine identity percentages. Sequences were submitted to GenBank.

A multi-locus phylogenetic analysis by maximum likelihood and Bayesian inference method, to confirm isolates identity with ex-type sequences was constructed in the science gateway CIPRES v. 3.3 (Miller *et al.*, 2010).

Two *P. drechsleri* isolates with opposite mating types were obtained from the rhizosphere soil of a *Petunia* x hybrid plant. Two *P. capsici* isolates with opposite mating types were obtained from stem tissues of a *C. annuum* plant. Morphological and molecular characterization and phylogenetic analysis (Figure 1) confirmed the identity of the isolates. The accession numbers of the isolates are shown in Table 1. All isolates had 99% similarity with sequences available in the database

aislados de *P. drechsleri* se utilizó la técnica PCR *touchdown* bajo las condiciones descritas por Blair *et al.* (2008), pero disminuyendo la temperatura de 68 a 58 °C.

Para generar las secuencias del ADN de las reacciones de amplificación-secuenciación se utilizó un analizador genético Applied Biosciences Prism® 3130xl. Las secuencias fueron ensambladas, editadas para obtener secuencias consenso, alineadas con las secuencias publicadas (NCBI, Centro Nacional de Información Biotecnológica, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y analizadas con el programa Blast (Geneious 8.1, www.geneious.com), a fin de determinar los porcentajes de identidad. Las secuencias fueron enviadas al Banco de Genes (GenBank).

Para confirmar la identidad de los aislados con secuencias ex-tipo, se llevó a cabo un análisis filogenético multi-locus aplicando el método de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, y se creó un perfil filogenético en el portal de ciencia de CI-PRES v. 3.3 (Miller *et al.*, 2010).

Dos aislados de *P. drechsleri* con tipos de compatibilidad opuestos se obtuvieron de suelo de la rizósfera de una planta de *Petunia x hybrida*. Dos aislados de *P. capsici* con tipos de compatibilidad opuestos se obtuvieron del tejido del tallo de una planta de *C. annuum*. La caracterización morfológica y molecular, así como el análisis filogenético (Figura 1), confirmaron la identidad de los aislados. Los números de Accesoión de los aislados se muestran en el Cuadro 1. Todos los aislados mostraron 99% de similitud con las secuencias de la base de datos Phytophthora – Q-bank (<http://www.q-bank.eu/bioloMICSSequences.aspx?file=Bacteria&file=FUNGI&file=Arthropods&file=Nematodes&file=Phytopl&file=Plants&file=Virus&file=Sequence&wsize=20>). Los aislados LEV6716 (A1) y LEV6717 (A2) de *Phytophthora capsici*, y LEV6731 (A1) y LEV6732 (A2) de *Phytophthora*

Phytophthora – Q-bank (<http://www.q-bank.eu/bioloMICSSequences.aspx?file=Bacteria&file=FUNGI&file=Arthropods&file=Nematodes&file=Phytopl&file=Plants&file=Virus&file=Sequence&wsize=20>). *Phytophthora capsici* LEV6716 (A1) and LEV6717 (A2) and *Phytophthora drechsleri* LEV6731 (A1) and LEV6731 (A2) isolates were deposited in the Agriculture and Agri-Food Canada culture Collection, Ottawa, Canada.

Capsicum annuum plants inoculated with both mating type isolates of *P. capsici* showed chlorosis, defoliation, wilting, and necrosis on the stem five days after inoculation (dai). *Petunia x* hybrid plants inoculated with A1 and A2 mating types of *P. drechsleri* showed wilt symptoms 10 dai. The isolates were reisolated from the lesions of the plants and identified by morphology confirming Koch's postulates. Control plants remained healthy. Abundant oospores were observed in the epidermis of stems of *C. annuum* and *Petunia x* hybrid inoculated plants (Figures 2 and 3), seven and 10 dai, respectively.

The presence of both mating types in isolates of *P. capsici* and *P. drechsleri*, in the same plant and rhizosphere, respectively indicates that sexual reproduction and genetic variation is occurring in nursery plants. Oospore formation could serve as primary inoculum (Lehtinen and Hannukkala, 2004), since reutilization of infested soil and pots occurs in nurseries throughout Mexico, contributing to the yearly presence of *Phytophthora* in nursery plants. Oospores can be long-term resistant structures in nurseries, allowing new host colonization and may introduce new recombinant genotypes of *Phytophthora* to new areas. Since the commercial nurseries sampled distribute plants to many states in Mexico, the dissemination of these pathogens into new agricultural, forestry and urban areas is highly probable. An additional risk factor is the broad host range of *P. capsici* and *P. drechsleri*

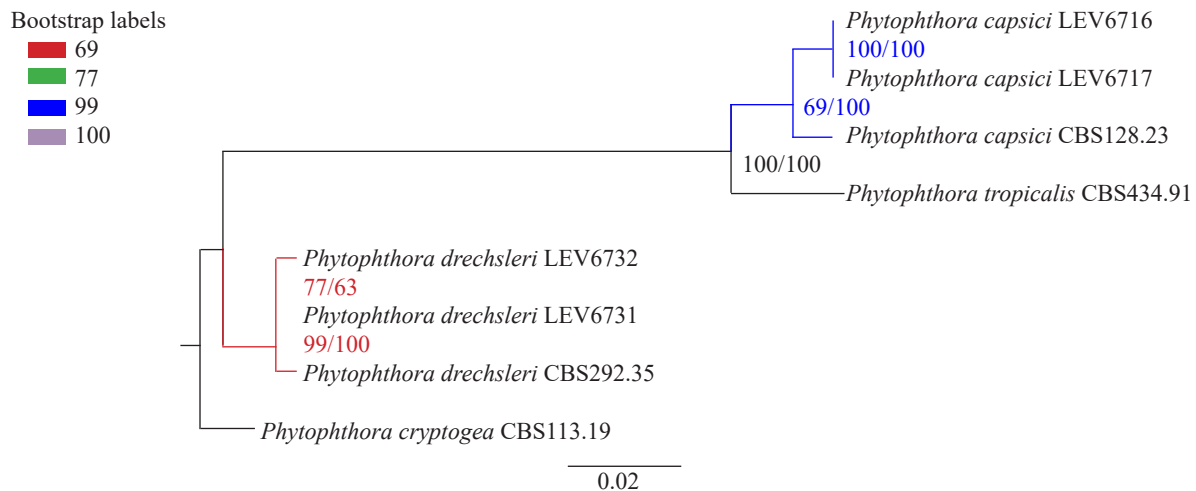


Figura 1. Análisis filogenético concatenado de los genes ITS, β -tubulina y COI utilizando máxima verosimilitud e inferencia bayesiana de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* con *Phytophthora cryptogea* como grupo externo. Los valores bootstrap de máxima verosimilitud y las probabilidades posteriores de la inferencia bayesiana en porcentajes se indican en los puntos de la rama, respectivamente. La barra de la escala indica 0.02 sustituciones por sitio por rama.

Figure 1. Phylogeny analysis derived from Maximum likelihood and Bayesian inference of concatenated ITS, β -tubulin and COI genes from *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* with *Phytophthora cryptogea* as an outgroup. Maximum likelihood bootstrap values and Bayesian inference posterior probabilities in percentages are indicated in the branch points, respectively. Scale bar indicates 0.02 substitutions per site per branch.

drechsleri fueron depositados en la colección del Departamento de Agricultura y Agri-Food Canadá, en Ottawa, Canadá.

Las plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con aislados de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* mostraron clorosis, defoliación, marchitez y necrosis en el tallo cinco días después de la inoculación (ddi). Las plantas de *Petunia x hybrida* inoculadas con los tipos de compatibilidad A1 y A2

(Erwin and Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2012). Moreover, isolates with resistance to fungicides may develop and the disease will be more difficult to manage. This work showed that both mating types of *P. capsici* and *P. drechsleri* can occupy the same niche in nursery environments. Growers should improve management practices as recommended by Parke and Grünwald (2012), according to their economic resources, to reduce losses. This is the

Cuadro 1. Número de acceso de los genes ITS, b-tubulina y COI, de los aislados.
Table 1. Accession numbers of the genes ITS, b-tubulin and COI, of the isolates.

Código aislado	Especies	Hospedante o sustrato	GenBank número de acceso		
			ITS	β -tubulina	COI
LEV6716	<i>P. capsici</i>	<i>Capsicum annuum</i>	MH025883	MH013476	MH013474
LEV6717	<i>P. capsici</i>	<i>Capsicum annuum</i>	MH025884	MH013477	MH013475
LEV6731	<i>P. drechsleri</i>	<i>Petunia x hybrida</i>	MH025881	MH013478	MH013472
LEV6732	<i>P. drechsleri</i>	<i>Petunia x hybrida</i>	MH025882	MH013479	MH013473

de *P. drechsleri* mostraron síntomas de marchitez a los 10 ddi. Los aislados fueron re-aislados de las lesiones de las plantas e identificados mediante morfología para confirmar los postulados de Koch. Las plantas control permanecieron sanas. Se observaron abundantes oosporas en la epidermis de los tallos de *C. annuum* y *Petunia x hybrida* de las plantas inoculadas (Figuras 2 y 3), a los siete y 10 ddi, respectivamente.

La presencia de ambos tipos de compatibilidad en los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* en la misma planta y rizósfera, respectivamente, indica que la reproducción sexual y la variación genética está ocurriendo en las plantas de vivero. La formación de oosporas podría servir como inóculo primario (Lehtinen y Hannukkala, 2004), ya que en México reutilizan el suelo y las macetas infestadas, lo cual contribuye a la presencia anual de *Phytophthora* en las plantas de vivero. Las oosporas son estructuras que resisten mucho tiempo en los viveros, lo cual permite que se vuelvan a colonizar las

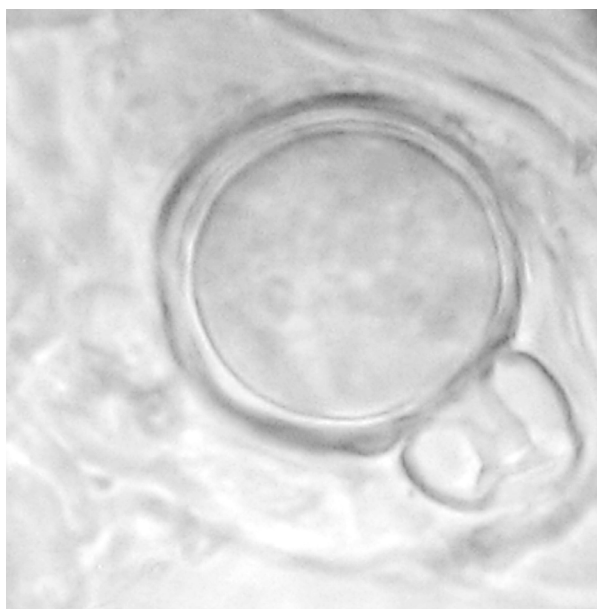


Figura 2. Oospora de *Phytophthora capsici* formada in planta en tejidos de la raíz de *Capsicum annuum* co-inoculados con aislados de los tipos de compatibilidad A1 y A2.

Figure 2. Oospore of *Phytophthora capsici* formed in planta in *Capsicum annuum* root tissues coinoculated with mating type A1 and A2 isolates.



Figura 3. Oospora de *Phytophthora drechsleri* formada in planta en tejidos de la raíz de *Petunia x híbrida* co-inoculados con aislados de los tipos de compatibilidad A1 y A2.

Figure 3. Oospore of *Phytophthora drechsleri* formed in planta in *Petunia x hybrida* root tissues coinoculated with mating type A1 and A2 isolates.

plantas hospedantes, y pueden introducir nuevos genotipos recombinantes de *Phytophthora* a zonas nuevas. Dado que los viveros comerciales muestreados distribuyen plantas a muchos estados de la República Mexicana, es muy probable que estos patógenos sean diseminados a nuevas zonas agrícolas, forestales y urbanas. Otro factor de riesgo es el amplio rango de plantas hospedantes de *P. capsici* y *P. drechsleri* (Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2012). Además, los aislados podrían generar resistencia a los fungicidas y sería más difícil controlar la enfermedad. El presente estudio mostró que ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* pueden ocupar el mismo nicho en los ambientes de los viveros. Los productores deberían mejorar sus prácticas de manejo, como lo recomiendan Parke y Grünwald (2012), dependiendo de sus recursos económicos, a fin de reducir las pérdidas. Este es el primer reporte sobre los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* y *P. drechsleri* detectados en plantas producidas en maceta en viveros comerciales en México.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a C. Andre Lévesque y Tara Rintoul del Departamento de Agricultura y a Agri-Food Canadá por su apoyo. El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que le otorgaron (no. 254151).

LITERATURA CITADA

- Bala K, Robideau GP, De'saulniers N, De Cock AWAM and Lévesque CA. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 25:22-31. <http://doi.org/10.3767/003158510X524754>
- Bakkeren G, Kronstad JW and Lévesque CA. 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* 92:510-521. Disponible en línea: www.jstor.org/stable/3761510
- Bilodeau GJ, Lévesque CA, De Cock AWAM, Duchaine C, Brière S, Uribe P, Martin FN and Hamelin RC. 2007.

first report of mating types A1 and A2 of *P. capsici* and *P. drechsleri* detected in commercial nursery pot plants in Mexico.

Acknowledgment

We express our sincere gratitude to C. Andre Lévesque and Tara Rintoul from Agriculture and Agri-Food Canada department for their support. First author thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the doctoral scholarship (no. 254151).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. *Phytopathology* 97:632-642. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-5-0632>

Blair JE, Coffey MD, Park SY, Geiser DM and Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45:266-277. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.010>

Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.

Fernández-Pavía SP, Díaz-Celaya M and Rodríguez-Alvarado G. 2013. *Phytophthora* in Mexico. Pp:215-221. In: Lamour K (eds.). *Phytophthora: A global perspective*. CABI Press. Boston, MA., USA. 244p.

Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broadhost-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>

Lehtinen A and Hannukkala A. 2004. Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agricultural and Food Science* 13:399-410. Disponible en línea: <http://www.mtt.fi/afs/pdf/mtt-afs-v13n4p399.pdf>

Martin FN and Tooley PW. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95:269-284. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156613>

Miller MA, Pfeiffer W and Schwartz T. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1-8. DOI: 10.1109/GCE.2010.5676129

- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H and Geiger HH. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20:6115-6116. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334490/>
- Mundo-Ocampo J. 2006. El vivero ornamental. First Edition. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 461 p.
- Olson HA, Carbone I and Benson DM. 2011. Phylogenetic history of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* isolates from floriculture crops in North Carolina greenhouses. *Phytopathology* 101:1373-1384. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0302>
- Parke JL and Grünwald NJ. 2012. A systems approach for management of pests and pathogens of nursery crops. *Plant Disease* 96:1236-1244. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0986-FE>
- Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJ, Ristaino JB and Lévesque CA. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11:1002-1011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Truong NV, Burgess L and Liew E. 2012. Cross-infectivity and genetic variation of *Phytophthora* isolates from chilli and black pepper in Vietnam. *Australasian Plant Pathology* 41:439-447. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-012-0136-4>