



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
AISLAMIENTOS
DE *PYTHIUM* Y *PHYTOPHTHORA* DE CULTIVOS
INTENSIVOS EN LA PROVINCIA DE CORRIENTES

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN CULTIVOS
INTENSIVOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

JULIA MAGALI IBAÑEZ

DIRECTORA: VERONICA GABRIELA OBREGON

CODIRECTORA: MARIA ALEJANDRA FAVARO

Año 2019

Agradecimientos

A mis padres, por haberme inculcado el valor del conocimiento y haberme dado la posibilidad de estudiar.

A mi novio, Ignacio Lopez, por confiar en mí, por haber estado presente día a día, con mucho amor y paciencia, aconsejándome, alentándome a cumplir mis objetivos, a ser mejor persona y profesional.

A Tatiana Lattar, compañera incondicional, quien me acompañó diariamente con trabajos de laboratorio, de campo, de gabinete, sin importar hora, estado del tiempo, época del año, o lo atareada que estuviera.

A Verónica Obregón, mi directora de beca y de tesis, quien me eligió para llevar adelante este desafío y sigue acompañándome día a día en mi formación como profesional.

A Alejandra Favaro, mi codirectora de tesis, quien me abrió las puertas al mundo de la tecnología molecular; y por más que nos encontrábamos a unos 500 km, siempre estuvo a un par de minutos de distancia, respondiendo mis mensajitos, resolviendo mis miles de inquietudes.

A Laura Fernandez, una divertida compañera que me enseñó técnicas de análisis moleculares, y también estuvo permanentemente tratando de resolver cada problema que se me presentaba en el desarrollo de esta tesis, a pesar de la distancia.

A Ernestina Galdeano, quien me dedicó su tiempo para enseñarme a utilizar software para analizar secuencias, construir árboles filogenéticos e interpretarlos.

A Alberto Gochez, por su excelente predisposición para ayudarme en todo momento.

A Silvia Wolcan, experta en oomycetes, quien me recibió en su laboratorio en La Plata durante sus vacaciones y me enseñó distintas técnicas para complementar la caracterización morfológica de las especies en estudio.

A Rodrigo Verón y Antonio Ishikawa, quienes me proveyeron de plantines de especies ornamentales para poder llevar a cabo las pruebas de patogenicidad.

Al INTA, por darme la posibilidad de seguir creciendo como profesional.

A todos ellos, infinitas gracias.

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. Introducción y Antecedentes.....	5
1.1 Caracterización del sector hortícola.....	5
1.2 Clase Oomycetes: descripción general, sintomatología y ubicación taxonómica...	7
1.3 Sintomatología y daños ocasionados por <i>Pythium</i> spp.	9
1.4 Sintomatología y daños ocasionados por <i>Phytophthora</i> spp.	10
1.5 Especies de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> identificadas en Argentina.....	10
1.6 Caracterización morfológica y molecular de los oomycetes.....	11
Hipótesis.....	13
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo general.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1 Generación de una colección de aislamientos de <i>Pythium</i> spp. y <i>Phytophthora</i> spp.....	14
3.1.1 Recolección de muestras a campo.....	14
3.1.2 Desinfección de tejido vegetal.....	15
3.1.3 Aislamientos a partir de tejido vegetal.....	15
3.1.4 Conservación de cepas.....	16
3.2 Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Phytophthora</i> spp. y <i>Pythium</i> spp.	16
3.2.1 Observaciones con microscopio óptico.....	17
3.3 Identificación de relaciones patógeno-hospedante entre los géneros <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> y cultivos intensivos de la provincia de Corrientes.....	17
3.3.1 Esterilización del sustrato.....	17
3.3.2 Obtención de plantines.....	18
3.3.3 Inoculación de plantas.....	18
3.3.4 Patogenicidad cruzada.....	19
3.4 Identificación molecular de aislamientos de <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> spp.	19
3.4.1 Extracción de ADN.....	19
3.4.1.1 Soluciones utilizadas para la extracción de ADN.....	20

3.4.2 Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
3.4.3 Análisis de secuencias.....	21
4. Resultados y Discusión.....	22
4.1 Identificación morfológica, molecular y relaciones patógeno-hospedante	
de las distintas especies de Oomycetes estudiadas.....	22
4.1.1 Aislamientos identificados como <i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp.	26
4.1.1.1 Cepas 2, 5, 6, 7, 17 y 19.....	27
4.1.1.2 Cepa 20.....	29
4.1.1.3 Cepa 21.....	30
4.1.1.4 Cepa 22.....	32
4.1.1.5 Cepas 23, 27 y 29.....	33
4.1.2 Aislamientos identificados como <i>Pythium irregulare</i> Buisman.....	36
4.1.2.1 Cepas 1 y 25.....	37
4.1.2.2 Cepa 11.....	39
4.1.2.3 Cepas 13 y 14.....	40
4.1.2.4 Cepa 24.....	44
4.1.3 Aislamientos identificados como <i>Pythium myriotylum</i> Drechsler.....	47
4.1.3.1 Cepa 15.....	47
4.1.4 Aislamientos identificados como <i>Pythium spinosum</i> Sawada.....	50
4.1.4.1 Cepa 9.....	50
4.1.5 Aislamientos identificados como <i>Phytopythium helicoides</i> Drechsler.....	53
4.1.5.1 Cepa 16.....	53
4.1.6 Aislamientos identificados como <i>Phytopythium mercuriale</i> (Belbahri, B. Paul y Lefort) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque...	56
4.1.6.1 Cepa 31.....	56
4.1.7 Aislamientos identificados como <i>Phytopythium vexans</i> (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque.....	59
4.1.7.1 Cepa 30.....	59
4.1.8 Aislamientos identificados como <i>Phytophthora cactorum</i> (Lebert y Cohn) Schr.	63
4.1.8.1 Cepa 12, 18 y 28.....	63
4.1.9 Aislamientos identificados como <i>Phytophthora capsici</i> Leonian.....	68

4.1.9.1 Cepa 4 y 10.....	68
4.1.9.2 Cepa 8.....	73
4.1.10 Aislamientos identificados como <i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de H.	77
4.1.10.1 Cepa 3.....	78
4.1.10.2 Cepa 26.....	80
4.2 Influencia de las condiciones climáticas presentes en la provincia de Corrientes sobre la prevalencia de las distintas especies de Pythiaceas identificadas.....	84
4.3 Relaciones filogenéticas entre los aislamientos de <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> spp.	85
5. Conclusiones.....	88
6. Bibliografía.....	89

"Identificación y Caracterización de Aislamientos de *Pythium* y *Phytophthora* de Cultivos Intensivos en la Provincia de Corrientes"

RESUMEN

Se estima que Argentina posee 6.517 has bajo cubierta, de las cuales 5.474 has se destinan a cultivos hortícolas y 1.043 has a flores de corte y plantas ornamentales. En la provincia de Corrientes, la superficie de hortalizas alcanza las 10.750 has, de las cuales 1.700 has corresponden a horticultura bajo cubierta, la cual representa el 26 % del total en Argentina. Las principales localidades productoras de hortalizas se concentran sobre la costa del río Paraná y corresponden a Goya, Lavalle, Bella Vista, Santa Lucía, y San Cosme.

Aspectos de manejo, fecha de trasplante y condiciones ambientales que se desarrollan bajo estos sistemas intensivos de producción, favorecen la incidencia de numerosas especies pertenecientes al grupo de los Oomycetes que ocasionan pérdidas importantes, especialmente en cultivos de tomate y pimiento en la provincia de Corrientes.

Recientemente fueron caracterizadas especies de *Pythium* y *Phytophthora* que causan enfermedades en cultivos ornamentales del cinturón verde La Plata-Buenos Aires, llegando a la conclusión de que en Argentina existen: 21 especies de *Phytophthora* y 3 taxones (24 en total) implicadas en 221 relaciones patógeno-hospedante; 22 especies de *Pythium*, 2 *Pythium* sp. nov., 3 *Phytophythium*, 1 *Phytophythium* sp. nov., en 280 relaciones patógeno-hospedante.

El objetivo de esta Tesis de Maestría fue actualizar el estado de conocimiento de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* como fitopatógenos de cultivos intensivos en la provincia de Corrientes, a través de la caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos y de la identificación de las relaciones patógeno-hospedantes mediante pruebas de patogenicidad.

La caracterización morfológica se basó en: aspecto, patrón de crecimiento, color y velocidad de crecimiento de las colonias; forma y tamaño de las diferentes estructuras de reproducción sexual y asexual. La caracterización molecular se realizó a través de la amplificación de un segmento de la región ITS del ADN ribosomal (rDNA) y del gen *cox2*.

Fueron caracterizados 31 aislamientos, los cuales correspondieron a 4 especies de *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. irregulare* y *P. spinosum*; 3 especies de *Phytophthora*: *P. capsici*, *P. nicotianae* y *P. cactorum*; 3 especies de *Phytophythium*: *P. helicoides*, *P. vexans* y *P.*

mercuriale. *Pythium aphanidermatum* fue la especie más frecuente, afectando a una gran cantidad de hospedantes diferentes.

Se identificaron 18 relaciones patógeno-hospedante diferentes, de las cuales 8 no habían sido citadas en el país hasta la fecha (*P. irregulare*-*Gerbera jamesonii*; *P. irregulare*-*Citrullus lanatus*; *P. irregulare*-*Fragaria x ananassa*; *P. irregulare*-*Eustoma* sp.; *P. myriotylum*-*Petroselinum crispum*; *Phytopythium helicoides*-*Chrysanthemum* sp.; *Phytopythium vexans*-*Fragaria x ananassa* y *Phytopythium mercuriale*-*Fragaria x ananassa*). Es el primer registro de *Phytopythium mercuriale* en el país y en frutilla.

Palabras clave: oomycetes, fitopatología, hortalizas, enfermedades, plantas ornamentales.

"Identification and Characterization of *Pythium* and *Phytophthora* Isolates from Intensive Crops in Corrientes Province"

ABSTRACT

It is estimated that Argentina has 6,517 hectares of greenhouse production, of which 5,474 hectares are used for horticultural crops and 1,043 hectares for flowers and ornamental plants. In Corrientes province, the surface occupied with commercial vegetable production reaches 10,750 hectares, of which 1,700 correspond to greenhouse horticulture, which represents 26 % of the total area in Argentina. The main localities producing vegetables are concentrated along the coast of the Paraná River and correspond to Goya, Lavalle, Bella Vista, Santa Lucía, and San Cosme.

Management techniques, transplanting dates and environmental conditions that develop under these intensive production systems, favor the incidence of numerous species of the Oomycetes group that cause significant losses especially in tomato and pepper crops in Corrientes.

Recently, *Pythium* and *Phytophthora* species causing diseases in ornamental crops in La Plata, Buenos Aires greenbelt were characterized, concluding that in Argentina there are: 21 species of *Phytophthora* and 3 taxa (24 in total) involved in 221 host-pathogen combinations; 22 species of *Pythium*, 2 *Pythium* sp. nov., 3 *Phytopythium*, 1 *Phytopythium* sp. nov., in 280 host-pathogen combinations.

The objective of this thesis was to update the current state of knowledge of the genera *Pythium* and *Phytophthora* as intensive crops pathogens in Corrientes province through morphological and molecular characterization of an isolates collection and the identification of host-pathogen combinations through pathogenicity tests.

Morphological characterization was based on: colony appearance, growth pattern, color and growth rate; shape and size of sexual and asexual reproduction structures. Molecular characterization was carried out through the amplification of the ITS region of the rDNA, and *cox2* gene.

Thirty-one isolates were characterized, which corresponded to 4 species of *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. irregulare* and *P. spinosum*; 3 species of *Phytophthora*: *P. capsici*, *P. nicotianae* and *P. cactorum*; 3 species of *Phytopythium*: *P. helicoides*, *P. vexans* and

P. mercuriale. *Pythium aphanidermatum* was the most frequent species, affecting a large number of different hosts.

Eighteen host-pathogen combinations were identified, of which 8 had not been cited in the country up to this moment (*P. irregulare*-*Gerbera jamesonii*, *P. irregulare*-*Citrullus lanatus*, *P. irregulare*-*Fragaria x ananassa*, *P. irregulare*-*Eustoma* sp.; *P. myriotylum*-*Petroselinum crispum*, *Phytopythium helicoides*-*Chrysanthemum* sp., *Phytopythium vexans*-*Fragaria x ananassa* and *Phytopythium mercuriale*-*Fragaria x ananassa*). This is the first report of *Phytopythium mercuriale* in Argentina and in strawberry.

Key words: oomycetes, phytopathology, vegetables, diseases, ornamental plants.

1. Introducción y Antecedentes

1.1 Caracterización del sector hortícola

En el contexto mundial, el sector hortícola tiene un peso destacado en la producción de origen agropecuario, encontrándose en segundo lugar de importancia, aunque con un volumen de producción que no alcanza al 40 % de la producción de cereales (Fernández Lozano, 2012).

La producción de hortalizas en Argentina se realiza en casi todo su territorio debido a la diversidad de climas que posee. La Figura 1 exhibe los cultivos hortícolas que se producen en mayor proporción en el país. Las principales provincias productoras de hortalizas son: Buenos Aires, Mendoza, Córdoba, Santiago del Estero, Misiones, Santa Fe, Corrientes, Tucumán, Formosa, Salta, Chaco, Jujuy, San Juan y Río Negro. La producción anual de hortalizas es de unas 8-10 millones de toneladas, ocupando una superficie de 450 a 500.000 has, incluyendo a las legumbres (Figura 2) (Fernandez Lozano, 2012; Consejo Federal de Inversiones, 2016).



Figura 1. Producción de hortalizas en Argentina (Fernandez Lozano, 2012).

Distribución de superficie (has) cultivada con hortalizas en el país.

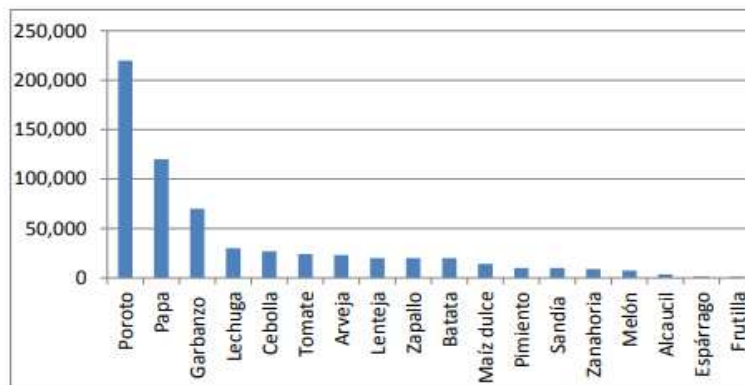


Figura 2. Distribución de la superficie cultivada con hortalizas en Argentina (Consejo Federal de Inversiones, 2016).

Se estima que Argentina posee unas 6.517 has bajo cubierta, de las cuales 5.474 has se destinan a cultivos hortícolas y 1.043 has a flores de corte y plantas ornamentales (Stavisky, 2015). Los principales cultivos hortícolas bajo este sistema de producción son: tomate, pimiento, melón, lechuga, espinaca, apio, frutilla, albahaca, chaucha y pepino (Fernández Lozano, 2012).

En la provincia de Corrientes, la superficie de hortalizas alcanza las 10.750 has, de las cuales 1.700 has corresponden a horticultura bajo cubierta (Servicio de Información Agroeconómico, 2014). Esta provincia representa el 26 % del total de la superficie de horticultura bajo invernáculo. En cuanto a tomate, representa el 18 % del total de la producción nacional, y un 22 % del total del tomate que ingresa al MCBA (Mercado Central de Buenos Aires). En esta provincia, la producción de pimiento representa el 44 % del total de la producción nacional (Palau *et al.*, 2010). Las localidades productoras de hortalizas se concentran sobre la costa del río Paraná y corresponden a Goya, Lavalle, Bella Vista, Santa Lucía, y San Cosme (Carluccio *et al.*, 2002; Palau *et al.*, 2010; Fernández Lozano, 2012).

Aspectos de manejo, fecha de trasplante y condiciones ambientales que se desarrollan bajo estos sistemas intensivos de producción, favorecen la incidencia de ciertos patógenos y ocasionan pérdidas importantes especialmente en cultivos de tomate y pimiento (Obregón, 2009). Entre estos patógenos, se destacan numerosas especies pertenecientes al grupo de los Oomycetes, que generan enfermedades de notable impacto en los cultivos intensivos presentes en la provincia de Corrientes.

1.2 Clase Oomycetes: descripción general, sintomatología y ubicación taxonómica

Los Oomycetes, también conocidos como "mohos acuáticos", son un grupo de cientos de organismos que incluyen algunos de los patógenos más devastadores. Las enfermedades que causan incluyen tizones, damping-off, pudrición de raíces, mildius y royas blancas. Los fitopatólogos consideraron por largo tiempo a los Oomycetes como hongos inferiores, debido a su hábito de crecimiento filamentoso, a su nutrición por absorción y a su reproducción vía esporas. Sin embargo, con los avances en el estudio de las relaciones evolutivas, es claro que este grupo de organismos no está relacionado con los hongos verdaderos. De hecho, los hongos parecen estar más cercanamente relacionados con los animales que con los Oomycetes, y éstos a su vez se relacionan más con las algas y las plantas verdes (Fry y Grünwald, 2010; Ersek y Ribeiro, 2010).

La pared celular de los Oomycetes posee celulosa y β -glucanos en su constitución, el micelio es cenocítico, es decir, no posee tabiques o septos, a excepción de ciertos casos en los que son producidos para separar secciones vivas (citoplasmática) de las muertas de donde el citoplasma ha sido extraído (Agrios, 2005; Schroeder *et al.*, 2013).

Una de las características más notables de este grupo de microorganismos es la producción asexual de zoosporas en zoosporangios. Estas son zoosporas biflageladas heterocontas, es decir, con dos flagelos distintos, uno mastigonemado (posee fibrillas a modo de peine) dirigido hacia delante y otro desnudo que, generalmente, se dirige hacia atrás (Schroeder *et al.*, 2013). Los dos se encuentran adosados a la zona ventral de la zoospora. Esta no posee pared, pero aun así mantiene su forma y flexibilidad. Son capaces de moverse en películas de agua sobre la superficie de hojas, en la solución del suelo, o en cursos naturales de agua. Cuando las zoosporas entran en contacto con una superficie, retraen sus flagelos (se enquistan) y segregan una sustancia mucilaginosa para fijarse al tejido en cuestión (Fry y Grünwald, 2010).

Los Oomycetes producen una gran cantidad de zoosporas cuando las condiciones ambientales son favorables, esto es, cuando existe agua libre en suelo y follaje, y temperaturas moderadas. Estas condiciones pueden resultar en epidemias severas, como el tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans* (primer especie de *Phytophthora* descrita); enfermedad policíclica que devastó la producción de papa de Irlanda en 1845. La epidemia conocida como "Hambruna Irlandesa", resultó en una pérdida de un cuarto de la población de Irlanda (2 millones de personas) debido a inanición y emigración (Ribeiro en Lamour, 2013). Además, debido a la habilidad de dispersarse rápidamente a nuevas áreas o países, especialmente por

el comercio global de semillas y plantas, este grupo de patógenos representa una amenaza importante para la horticultura, forestación y agricultura (Brasier, 2008; Grunwald *et al.*, 2012).

Muchas especies han perdido su habilidad para producir zoosporas, por lo que los esporangios han desarrollado la capacidad de germinar directamente produciendo tubos germinativos. En este caso, son llamados “conidios” (Fernandez Valiela, 1978; Fry y Grünwald, 2010).

El género *Phytophthora*, genera las zoosporas dentro de los zoosporangios, mientras que *Pythium*, diferencia las zoosporas en vesículas, que se forman a partir de los zoosporangios (Fernandez Valiela, 1978; Dick, 2001). En ambos casos, las zoosporas se forman en presencia de agua libre. Los zoosporangios son de forma variada, y pueden ser intercalares o terminales, y estos últimos pueden ser caducos o no (Erwin y Ribeiro, 1996).

La oospora es la espora de origen sexual que se forma dentro del oogonio luego de la fertilización del núcleo realizada por el anteridio (ocasionalmente pueden formarse entre 2 y 6 oosporas en algunas especies de *Pythium*). La reproducción sexual se da por unión de los dos gametos, en la que la meiosis se da antes de la fertilización. Poseen talo diploide (Fernandez Valiela, 1978; Dick, 1990). La oospora es considerada una estructura de resistencia que permite que el individuo sobreviva y persista en el suelo hasta volver a infectar una nueva planta (Erwin y Ribeiro, 1996). Algunas especies de *Phytophthora* se caracterizan por ser homotáticas (auto-fértiles) y otras, heterotáticas (auto-estériles). En el segundo caso, las oosporas se forman por la unión de las formas (*mating type*, en inglés) A1 y A2 de la misma especie. Las homotáticas forman oosporas como propágulos persistentes en tejido vegetal enfermo, mientras que a las oosporas provenientes de especies heterotáticas no se les ha adjudicado claramente una función; aunque se ha demostrado que podrían ser fuente de nuevas razas o biotipos (debido a la recombinación genética), los cuales podrían poseer mayor virulencia (Brasier, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996).

Los géneros *Pythium* y *Phytophthora* se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo. Están íntimamente relacionados y pertenecen a la familia Pythiaceae (denominada de esa manera debido a que *Pythium* fue el primer género descrito), clase Oomycete, reino Stramenopila. El término Stramenopila deriva del latín y significa: “stramen”, flagelo y “pilos”, pelo en referencia a sus zoosporas flageladas (Dick, 2001).

Las enfermedades causadas por Oomycetes son básicamente de dos tipos: 1) aquellas que afectan órganos de las plantas en contacto con el suelo como raíces, cuello del tallo,

tubérculos, semillas, frutos en contacto con el suelo (causadas por *Pythium* spp., y algunas especies de *Phytophthora*); 2) aquellas que afectan mayoritariamente órganos situados sobre la superficie del suelo, como ser hojas, tallos jóvenes y frutos (*Phytophthora* spp.) (Agrios, 2005). El género *Pythium* incluye a muchas especies fitopatógenas, algunos parásitos de ciertas especies de *Phytophthora*, y otras especies saprófitas que subsisten en rastrojo. Por otro lado, *Phytophthora* posee limitada habilidad saprofítica y es muy polífaga (Erwin y Ribeiro, 1996).

Recientemente, especies de *Pythium* pertenecientes al clado K fueron renombradas ubicándose dentro del género *Phytopythium* debido a sus características morfológicas. Este grupo posee zoosporangios similares a los producidos por *Phytophthora* (globosos a ovoides, papilados), con la diferencia que esos zoosporangios son capaces de proliferar internamente. Además, la papila generada por zoosporangios maduros de *Phytopythium* es la que posteriormente desarrollará el tubo de descarga (de Cock *et al.*, 2015).

1.3 Sintomatología y daños ocasionados por *Pythium* spp.

El género *Pythium* comprende organismos que habitan suelos de todo el mundo, frecuentemente causando enfermedades en plantas y animales, como peces y crustáceos (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Es uno de los grupos más importantes de fitopatógenos de suelo, presentes en casi todos los suelos agrícolas, atacando raíces de miles de hospedantes, reduciendo rendimiento y calidad de la cosecha. La mayoría de las especies son patógenos necrótrofos, generalistas que infectan tejido joven de plantas (Schroeder *et al.*, 2013).

Este patógeno puede provocar grandes pérdidas económicas en cereales, ornamentales y muchos otros cultivos de gran valor (Van der Plaats-Niterink, 1981; Díaz-Celaya *et al.*, 2011; Palmucci *et al.*, 2011). Además, es el agente causal del mal de los almácigos, enfermedad comúnmente denominada con su nombre en inglés damping-off, que ocurre en todo tipo de suelos y climas, afectando semillas, plantines y raíces de plantas. El mayor daño es realizado en raíces de plantines antes o incluso después de la emergencia. *Pythium* puede ser encontrado en almácigos, atacando semillas, las cuales no germinan, se ablandan, se vuelven marrones y finalmente se desintegran. En post emergencia del plantín, la enfermedad inicia en raíces o en el cuello de la planta, apareciendo una lesión acuosa, se produce un estrangulamiento y el plantín cae sobre la superficie del suelo. Este patógeno ataca plantas adultas, rara vez matándolas, pero sí desarrollando podredumbre de raíces y lesiones en tallos y tejido radical, lo que retrasa el crecimiento y disminuye rendimientos. Cuando el objetivo del

patógeno son frutos, es posible observar micelio algodonoso sobre la superficie del órgano afectado, mientras que su interior se vuelve acuoso y blando, síntoma conocido como podredumbre (Agrios, 2005; Frezzi, 1956; Palmucci, *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2013).

1.4 Sintomatología y daños ocasionados por *Phytophthora* spp.

Su nombre deriva del griego *phyton*, planta y *phthora*, destructor, lo que conjugado describe a este patógeno como el destructor de plantas (Ribeiro en Lamour, 2013). Este género es el segundo más grande (después de *Pythium*) de la familia Pythiaceae, y actualmente comprende más de 100 especies (Thines en Lamour, 2013).

Phytophthora spp. está presente prácticamente en todo el mundo y produce daños en sus hospedantes en suelos anegados y con temperaturas entre 15 y 23 °C. Afecta plantines, plantas anuales, perennes, frutos de cucurbitáceas, pimiento, tomate, frutilla, citrus entre otros. El daño se da al nivel del suelo, produciendo lesiones acuosas y oscurecimiento del tallo, posteriormente, las hojas basales se caen y la planta se marchita. En plantas leñosas, produce áreas oscuras y deprimidas en la corteza, las cuales pueden avanzar hacia las raíces o hacia las ramas, haciendo que disminuya el crecimiento, la producción de frutos y, por último, el hospedante muere (Agrios, 2005). Como ejemplo de daños causados en especies leñosas se pueden mencionar la gomosis del pie de los cítricos causada por *Phytophthora citrophthora* y *P. parasitica* (Graham y Feichtenberger, 2015); la muerte repentina del roble (*Quercus* spp.) causada por *Phytophthora ramorum* (Martin *et al.*, 2012; CABI, 2018), ambas se encuentran ampliamente distribuidas, provocando pérdidas económicas importantes.

1.5 Especies de *Pythium* y *Phytophthora* identificadas en Argentina

En Argentina, por la diversidad de climas y de cultivos desarrollados, se encuentran presentes la mayoría de las especies de *Phytophthora* con relevancia a nivel mundial. Frezzi (1950) ha descrito 11 especies en diferentes cultivos en su libro “Las especies de *Phytophthora* en la Argentina”, mientras que Fernández Valiela (1978) ha realizado un gran aporte con la descripción exhaustiva de algunas de las enfermedades causadas por las especies del género.

El conocimiento de las especies de *Pythium* presentes en nuestro país ha cambiado drásticamente en los últimos años con el avance de la investigación y las nuevas técnicas de estudio. Hasta 1947 había solo 1 especie de *Pythium* citada en Argentina. Frezzi (1956) cita 18 especies al igual que Palmucci *et al.* en el 2011.

Colombo, *et al.* (2005) y Grijalba *et al.* (2015) han descripto por primera vez a *Pythium aphanidermatum* como patógeno en berenjena y tomate, respectivamente. Meneguzzi *et al.* (2011) identificó a *Pythium spinosum* provocando podredumbre de raíces en frutilla. Además, con las progresivas investigaciones realizadas en el país para determinar qué patógenos habitan los suelos, se han encontrado otros géneros de Pythiaceas. En el año 2015, Palmucci describió por primera vez a *Phytopythium chamaehyphon* en Argentina, provocando daños en azalea (*Rhododendron indicum*). No solo han encontrado nuevas especies, sino también nuevas relaciones patógeno-hospedantes, como es el caso de *Phytophthora* taxon *kelmania-gerbera* (Palmucci, 2015). La misma autora ha caracterizado las especies de *Pythium* y *Phytophthora* que causan enfermedades en cultivos ornamentales del cinturón verde La Plata-Buenos Aires, llegando a la conclusión de que existen: 21 especies de *Phytophthora* y 3 taxones (24 en total) implicadas en 221 relaciones patógeno-hospedante; 22 especies de *Pythium*, 2 *Pythium* sp. nov., 3 *Phytopythium*, 1 *Phytopythium* sp. nov., en 280 relaciones patógeno-hospedante.

Si bien no existen registros del impacto que éstas producen en términos económicos, la presencia de estas enfermedades supone un desafío importante para la producción (Iribarren, 2015).

1.6 Caracterización morfológica y molecular de los oomycetes

La detección temprana e identificación precisa de los Oomycetes son requisitos esenciales para implementar estrategias de manejo adecuadas. La identificación de especies en base a características morfológicas tales como forma y tamaño de zoosporangios, forma y cantidad de anteridios por oogonio, características de la pared del oogonio, tamaño de la oospora, velocidad y patrón de crecimiento en medio de cultivo, temperaturas cardinales, entre otras, es importante, aunque puede ser dificultosa y tediosa.

La identificación basada en técnicas moleculares puede hacerse de manera rápida, logrando resultados precisos. Existen regiones del ADN específicas conocidas como códigos de barra de ADN, que son capaces de mejorar el éxito de la identificación de estos patógenos, basándose en el análisis estandarizado de fragmentos de ADN (correspondientes al mismo *locus*) cortos y de fácil amplificación por PCR (Hebert *et al.*, 2003). El código de barras del ADN es una herramienta rápida y confiable para la identificación de especies, que permite revelar la diversidad y distribución de los Oomycetes. Entre los loci más utilizados desde hace muchos años, la región ITS (del inglés "*Internal Transcribed Spacer*") del ADN nuclear ribosomal (rDNA)

es comúnmente utilizada para identificar oomycetes a nivel de especie, pero existen ciertos casos en los que esta región exhibe variabilidad insuficiente para distinguir filogenéticamente especies íntimamente relacionadas, como por ejemplo varias especies de *Phytophthora* (Goodwin *et al.*, 1999; Cooke *et al.*, 2000; Jung y Burgess, 2009 citado por Choi *et al.*, 2015), por lo que se utilizan genes adicionales. En los últimos años, el gen *citocromo c oxidasa subunidad 2* (*cox2*, del inglés *cytochrome c oxidase subunit 2*) ha sido ampliamente utilizado para la identificación, taxonomía y filogenia de varios grupos de Oomycetes (Villa *et al.*, 2006; Uzuhashi *et al.*, 2010; Thines y Kummer, 2013; Mirzaee *et al.*, 2013; Testen *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015). Recientemente, se han demostrado las ventajas de utilizar este gen para la identificación de todas las especies conocidas de Oomycetes, incluyendo *Pythium* y *Phytophthora* (Choi *et al.*, 2015).

A pesar de la importancia que tienen las enfermedades ocasionadas por Oomycetes de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* en cultivos intensivos de la provincia de Corrientes y Argentina, existen serias carencias de conocimiento acerca de la etiología y de las relaciones patógeno-hospedante, lo que dificulta establecer estrategias y métodos de control eficientes. Esta Tesis de Maestría pretende contribuir con nuevos conocimientos sobre las especies presentes.

Hipótesis

Existen diferentes especies de *Pythium* y *Phytophthora* causando enfermedades en cultivos intensivos en la provincia de Corrientes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Actualizar el estado de conocimiento de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* como fitopatógenos de cultivos intensivos en la provincia de Corrientes.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e identificar aislamientos de *Phytophthora* y *Pythium* spp. obtenidos en cultivos intensivos de la provincia de Corrientes en base a sus características morfológicas y herramientas moleculares de identificación.
- Identificar relaciones patógeno-hospedante existentes entre los géneros *Phytophthora* y *Pythium* y cultivos intensivos de la provincia de Corrientes a través de pruebas de patogenicidad y patogenicidad cruzada.

3. Materiales y Métodos

3.1 Generación de una colección de aislamientos de *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.

3.1.1 Recolección de muestras a campo

Como punto de partida para la colección, el laboratorio de Fitopatología Hortícola de la Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista del INTA (Centro Regional Corrientes), contaba con aislamientos obtenidos a partir de distintos cultivos de la zona de Bella Vista, Mburucuyá, Lavalle, Goya, Desmochado, entre otras. Además, durante la realización de esta Tesis se realizaron monitoreos en la zona de Bella Vista y localidades aledañas para identificar hospedantes afectados por estos patógenos. Se extrajeron aquellas plantas que presentaban síntomas similares a los ocasionados por Oomycetes, las cuales se llevaron al laboratorio para realizar los aislamientos correspondientes. Cabe destacar que la recolección a campo de plantas enfermas se realizó durante las distintas estaciones del año, de manera de que exista mayor variabilidad de especies, de acuerdo a los distintos requerimientos ambientales de los patógenos.

En la Tabla 1 se detalla la fecha de recolección de las muestras con síntomas de enfermedad causada por Oomycetes, el origen y hospedante a partir del cual fue obtenido cada aislamiento.

Tabla 1. Colección de los aislamientos correspondientes a distintas especies de *Pythium* y *Phytophthora* de la provincia de Corrientes.

Aislamiento Nro	Hospedante	Tejido afectado	Fecha de recolección	Localidad de origen del aislado
1	Gerbera	Raíces/Corona	25/1/2011	3 de Abril
2	Pimiento	Raíces	12/3/2012	Bella Vista
3	Tomate	Fruto	2/7/2014	Bella Vista
4	Tomate	Pecíolo/Tallo/Hojas	21/8/2015	Paraje Puerto Viejo
5	Pimiento	Raíces	23/2/2016	Colonia San José
6	Pimiento	Raíces	26/2/2016	Lavalle
7	Pimiento	Raíces	29/2/2016	Lavalle
8	Pimiento	Raíces	29/4/2016	Bella Vista
9	Frutilla	Raíces	8/6/2016	Desmochado
10	Tomate	Hojas/Tallo	4/7/2016	Bella Vista
11	Frutilla	Raíces	20/7/2016	Desmochado
12	Frutilla	Corona	21/7/2016	Corrientes
13	Sandía	Raíces	7/9/2016	Mburucuyá

14	Sandía	Raíces	8/9/2016	Bella Vista
15	Perejil	Raíces	19/12/2016	Bella Vista
16	Crisantemo	Raíces	19/12/2016	Bella Vista
17	Pimiento	Raíces	23/1/2017	3 de Abril
18	Frutilla	Corona	19/6/2018	Bella Vista
19	Pimiento	Raíces	7/3/2017	Bella Vista
20	Berenjena	Raíces	15/12/2016	Bella Vista
21	Lechuga	Raíces	15/12/2016	Bella Vista
22	Perejil	Raíces	10/3/2017	Bella Vista
23	Tomate	Raíces	1/9/2017	Bella Vista
24	Lisianthus	Raíces	26/9/2017	Bella Vista
25	Gerbera	Raíces/Corona	2/10/2017	Bella Vista
26	Tomate	Fruto	26/9/2017	Bella Vista
27	Tomate	Raíces	2/5/2017	Bella Vista
28	Frutilla	Corona	22/6/2018	Corrientes
29	Tomate	Raíces	21/3/2017	Bella Vista
30	Frutilla	Corona	17/6/2018	Corrientes
31	Frutilla	Corona	22/6/2018	Bella Vista

3.1.2 Desinfección de tejido vegetal

Las plantas sintomáticas recolectadas en el campo se llevaron al laboratorio donde fueron lavadas con agua de canilla en primer lugar. Luego se seccionó la zona de avance del síntoma en pequeños trozos y se depositaron en vasos de precipitado con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 1 ó 2 minutos de acuerdo al grado de lignificación del tejido. Por último, estos trozos de tejido se enjuagaron tres veces en vasos de precipitado con agua destilada y se secaron en papel de filtro estéril para su posterior aislamiento.

3.1.3 Aislamientos a partir de tejido vegetal

Luego de la desinfección, se sembraron los trozos de tejido en medio de cultivo agar-agua (AA, 17 g/l de agar-agar), y las placas se incubaron en estufa a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al cabo de 48 horas aproximadamente, al observar crecimiento en las placas de Petri, se repicaron las hifas en medio agar papa glucosado (APG: 17 g/l de agar, 200 g/l de papa hervida, 8 g/l de glucosa) o en AV8 (200 ml de jugo V8, 3 g/l de carbonato de calcio, 17 g/l de agar).

3.1.4. Conservación de cepas

Para garantizar la sobrevivencia de los aislamientos realizados se utilizaron dos métodos de conservación diferentes. Por un lado, los aislamientos se repicaron en placas de Petri conteniendo medio AV8 o APG, manteniéndose durante 4 semanas selladas con parafilm. Por otro lado, se utilizó el método de conservación descrito por Erwin y Ribeiro (1996). Para ello, se cortaron 6-8 discos del oomycete crecido 7 días en medio APG o V8 y se depositaron en tubos con tapa a rosca con 1 ml de agua destilada estéril y cerrados con parafilm. Estos tubos se almacenaron a temperatura ambiente protegidos de la luz, permaneciendo viables durante 9 - 12 meses.

3.2 Caracterización morfológica de aislamientos de *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.

Los estudios de identificación y caracterización de *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología Hortícola de la Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista del INTA (Centro Regional Corrientes).

Para el estudio morfológico se usaron distintos medios de cultivo: agar papa glucosado (APG), AV8 y agar harina de maíz (CMA: 60 g/l de harina de maíz, 17 g/l de agar), ya que estos géneros tienden a producir estructuras sexuales diferencialmente según el medio en el que se encuentren.

Los aislamientos fueron cultivados en placas de Petri en medio de cultivo a 24-28 °C y se registró el aspecto, color y forma de la colonia. En simultáneo, se tomaron mediciones diarias del diámetro de crecimiento de las colonias en milímetros. Al cubrir completamente la superficie de la placa de Petri con micelio, se determinó la velocidad de crecimiento de cada aislamiento. Se realizaron 2 repeticiones por aislamiento y se calculó el promedio de crecimiento diario para cada uno.

Además, las especies de *Pythium* y de *Phytophthora* fueron descritas y caracterizadas mediante el estudio de caracteres morfológicos microscópicos de acuerdo a Frezzi, 1950; Erwin y Ribeiro 1996; Van der Plaats-Niterink, 1981, considerando forma y tamaño de esporangios, tamaño y ornamentación del oogonio, número de anteridios y forma en que están unidos al oogonio. Las observaciones microscópicas se realizaron a partir del crecimiento de 1 a 10 días en AA, APG, CMA y AV8. Como complemento, se utilizó la técnica de "baiting", utilizando trocitos de *Agrostis* sp. en agua con discos con crecimiento del patógeno en estudio

para poder observar la formación de diferentes estructuras de multiplicación y reproducción (Robertson, 1980; Wolcan, comunicación personal).

3.2.1 Observaciones con microscopio óptico

La caracterización microscópica de los patógenos se realizó a través de observaciones con microscopio óptico Leica CME de las estructuras reproductivas y vegetativas, con la ayuda de claves taxonómicas (Frezzi, 1950; Van der Plaats-Niterink, 1981). Se tomaron datos de 30 observaciones por cepa para obtener valores representativos de cada una.

Los frotis se prepararon tomando con aguja histológica el micelio del patógeno crecido en medio de cultivo (sólido o líquido) o trozos de tejido infectado, depositándolo en portaobjetos con una gota de líquido de montaje (agua destilada estéril o colorante) y por encima, se colocó un cubreobjetos. La exploración del material se realizó con aumentos de 10x, 40x y 100x.

En la mayoría de los casos se utilizó como líquido de montaje agua destilada. En caso de ser necesario para poder distinguir claramente las diferentes estructuras de estos microorganismos se utilizó azul de Amman (20 g fenol, 20 ml de ácido láctico, 20 ml de glicerina, 0,05 g de azul de algodón y 20 ml de agua destilada). Este colorante se adhiere a las estructuras fúngicas, volviéndolas de un color azul, permitiendo una mejor visualización de las mismas.

Se tomaron fotografías de las principales estructuras de cada aislado con aumentos de 40x y 100x, las cuales fueron medidas posteriormente con ayuda del programa ImageJ 1.50i. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop v14.0 para mejorar la calidad de las mismas.

3.3 Identificación de relaciones patógeno-hospedante entre los géneros *Phytophthora* y *Pythium* y cultivos intensivos de la provincia de Corrientes

En base a la colección con la que cuenta el Laboratorio de Fitopatología Hortícola y a los nuevos aislamientos realizados, se identificaron las relaciones patógeno-hospedantes en los distintos cultivos a través de pruebas de patogenicidad.

3.3.1 Esterilización del sustrato

Se utilizó el método de “tindalización” para esterilizar el sustrato, el cual consiste en el calentamiento discontinuo del material. Se cargó el sustrato (mezcla de mantillo y perlita) en

contenedores metálicos, se humedeció con agua destilada y se autoclavó por 20 minutos a 1 atm y 121 °C. Se dejó enfriar dentro del equipo, y se autoclavó nuevamente. Este proceso se realizó 3 veces para asegurar la esterilidad del material.

3.3.2 Obtención de plantines

Se sembraron semillas de las plantas hospedantes de los Oomycetes aislados (tomate, pimiento, berenjena, lechuga, perejil, sandía y melón) en bandejas con sustrato estéril. Los plantines se trasplantaron en macetas de 14 cm de diámetro a los 30 días de la siembra. Las plantas crecieron bajo invernadero, y al poseer cuatro o cinco hojas verdaderas, se inocularon con el patógeno correspondiente para cada hospedante. Los plantines de gerbera y lisianthus fueron obtenidos a partir de vástagos laterales de plantas madre, y trasplantados en macetas de 14 cm de diámetro, donde permanecieron hasta el final del ensayo.

3.3.3 Inoculación de plantas

La inoculación de las especies de *Phytophthora* se practicó con la técnica de depósito de inóculo en heridas de tallos (Wolcan *et al.*, 2007). Esta metodología consiste en depositar bloques de APG (7 mm de diámetro por 0,5 mm de profundidad) colonizados por el patógeno, en pequeñas heridas longitudinales practicadas con un bisturí desinfectado en la base de los tallos de las plantas, cubriéndolos con algodón humedecido con agua destilada estéril y cinta de papel engomado. Se observó diariamente la manifestación de síntomas en los distintos huéspedes y se contrastó con testigos en los cuales se depositaron bloques con el mismo medio de cultivo estéril. Para cada cepa se registró la cantidad de días que transcurrieron entre la inoculación y la aparición de síntomas, lo cual se denominó como “Días Después de la Inoculación” o “DDI”.

Para el caso de *Pythium*, la metodología de inoculación fue diferente. Se tomaron colonias de 7 días de crecimiento en placas de Petri en APG y se le agregaron 15 ml de agua destilada estéril, creando una suspensión del patógeno. Posteriormente, se practicó un corte a un lado del plantín para asegurar la laceración de raíces secundarias superficiales y se adicionaron 3 ml de la suspensión (Grijalba *et al.*, 2015 modificado).

En todos los casos se inocularon 3 plantines por aislamiento, con 3 plantines testigo sin inocular para cada uno. Al momento de aparición de síntomas, se extrajeron las plantas y se realizó el reaislamiento del patógeno a partir de tejido vegetal en placas de Petri con AA y

luego se repicó en placas con medio APG, para corroborar que el agente causal fuera el mismo que había sido inoculado, de manera de dar cumplimiento a los postulados de Koch.

3.3.4 Patogenicidad cruzada

Algunas especies de *Pythium* y *Phytophthora* poseen un amplio rango de hospedantes, este hecho es de suma importancia en la epidemiología de la enfermedad. Con el objetivo de observar la capacidad patogénica de algunos aislamientos de *Pythium* y *Phytophthora* sobre huéspedes distintos, se realizaron pruebas de patogenicidad cruzadas.

En la mayoría de los casos se utilizaron plantines de la misma familia botánica para realizar estas pruebas cruzadas, sólo en el caso de las cepas patógenas de cultivos ornamentales, fueron inoculadas en plantines de diferentes familias. Las cepas aisladas de pimiento fueron inoculadas en tomate y berenjena; las cepas patógenas de tomate fueron inoculadas en pimiento y berenjena; aquellas aisladas de sandía fueron testeadas en melón.

3.4 Identificación molecular de aislamientos de *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.

Para complementar la identificación morfológica de las especies de *Phytophthora* y *Pythium*, se utilizaron técnicas moleculares y de secuenciación. Para ello fue necesario partir de aislamientos axénicos que garantizaran la autenticidad y pureza de los mismos. Estas actividades fueron realizadas en el laboratorio de Biología Aplicada y Biotecnología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral.

Los aislamientos se dejaron crecer en placas de Petri con APG durante 7-10 días. Posteriormente, el micelio se extrajo con espátula y se realizó la extracción de ADN de acuerdo al protocolo de Palocci *et al.* (1999) con algunas modificaciones que se describen a continuación.

3.4.1 Extracción de ADN

Se depositaron 200 µm de micelio en tubo de eppendorf de 1,5 ml con 200 µm de buffer de lisis y se llevó a una temperatura de -20 °C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, el micelio se maceró y se mezcló con vortex durante 10 seg para luego dejarlo reposar 30 min en baño termostático (baño María) a 65 °C. A continuación, se añadieron 300 µm de NaCl 1M, invirtiendo el tubo para homogeneizar el contenido y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 1 vol de isopropanol 70 %, se mezcló suavemente y se colocó a una temperatura de -20 °C durante 30 min. Posteriormente,

se centrifugó a 10.000 rpm por 8 min a 4 °C, descartando el sobrenadante resultante. Al pellet se le agregaron 200 µm de etanol 70 %, se centrifugó por 2 min a 10.000 rpm a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Se secó el pellet por 2 horas en cámara de flujo laminar. Una vez seco, se resuspendió en 100 µm de buffer TE estéril.

3.4.1.1 Soluciones utilizadas para la extracción de ADN

- NaCl 1 M
- Buffer TE (Tris HCl 10 mM - EDTA 1 mM)
- Buffer de lisis (Tris HCl 2M + NaCl 2,5 M + SDS 5 % + EDTA 0,25 M)
- Isopropanol 70 % (conservado a -20 °C)
- Etanol 70 % (conservado a -20 °C)

En el caso de ser posible, todas las soluciones fueron autoclavadas para poder ser utilizadas y conservadas.

3.4.2 Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo los siguientes reactivos: 10x PCR Buffer (PB-L[®]) 2 µl, 50 mM MgCl₂ (PB-L[®]) 1 µl, mezcla de 10 mM dNTPs (PB-L[®]) 0,4 µl, 10 µM cebador sentido 0,4 µl, 10 µM cebador antisentido 0,4 µl, ADN fúngico 1 µl, Taq DNA polimerasa Pegasus 5 u/µl (PB-L[®]) 0,2 µl, H₂O milli Q hasta volumen final de 20 µl.

La PCR se inició con un paso de desnaturalización inicial de 4 min a 95°C, seguidas por 36 de ciclos de 40 seg a 95 °C, 40 seg a 57 °C, 60 seg a 72 °C y finalizadas con una extensión de 5 min a 72 °C (Choi *et al.*, 2015). Por un lado se utilizaron los cebadores Cox2-F (GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC, Hudspeth *et al.*, 2000) y Cox2-RC4 (TGATTWAYNCCACAAATTCRCTACATTG, Choi *et al.*, 2015), que codifican para el gen *citocromo c oxidasa subunidad 2*; por otro lado, se utilizaron los cebadores ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) desarrollados por White *et al.* (1990), que codifican para un segmento de la región ITS (del inglés *Internal Transcribed Spacer*) del ADN nuclear ribosomal (rDNA).

En determinados aislamientos no fue posible la amplificación de alguno de los loci, por lo cual la identificación se realizó en base a la amplificación de un solo gen.

Los productos de PCR obtenidos fueron corridos en geles de agarosa 1,5 % preparados con solución tampón 1x TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA pH 8,0). Se sembraron 2 µl de cada producto utilizando solución de siembra (0,25 % de azul de bromofenol; 0,25 % de xilencianol; 30 % de glicerol, en agua estéril) en una proporción 6:1 (muestra:solución de siembra) para corroborar el tamaño (de aproximadamente 580 pb para fragmentos obtenidos con *cox2* y 850 pb para ITS) y la presencia de una única banda. Como marcador de peso molecular se utilizó Ladder 100 pb (PB-L®, Argentina). La electroforesis se realizó a 90 V en solución tampón 1x TAE. Una vez finalizada la corrida electroforética, se observó el gel en transiluminador de luz UV (300 nm). Posteriormente, los 18 µl restantes de los productos obtenidos fueron enviados a la empresa MacroGen Korea, donde se secuenciaron utilizando los mismos cebadores empleados en la PCR.

3.4.3 Análisis de secuencias

Para identificar los patógenos, a las secuencias obtenidas se les realizó BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) utilizando el servidor del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*, <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Para el análisis filogenético, se usó el programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Se realizó BLAST a las secuencias en estudio y los árboles filogenéticos se obtuvieron luego de alinear las secuencias con aquellas que presentaban mayor porcentaje de identidad aplicando análisis de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura y Nei (1993), con un Bootstrap de 1000.

4. Resultados y Discusión

4.1 Identificación morfológica, molecular y relaciones patógeno-hospedante de las distintas especies de Oomycetes estudiadas

Durante el desarrollo de esta Tesis de Maestría se constituyó una colección de 31 aislamientos de distintas especies de *Pythium*, *Phytophthora* y *Phytophythium* de la provincia de Corrientes que fueron caracterizados e identificados morfológica y molecularmente.

Es importante resaltar que no fue posible observar producción de vesículas y zoosporas en los aislados de *Pythium*. Frezzi (1956) advierte que solo un 15 a 20 % de los casos, los zoosporangios evolucionan dando zoosporas, y que el resto germina directamente como conidios. El aislado 30, *Phytophythium vexans* (ex *Pythium vexans*) fue el único capaz de producir zoosporas en vesículas.

En simultáneo, los distintos aislamientos fueron identificados molecularmente, a partir de la amplificación y secuenciación del gen *cox2* y de la región ITS del rDNA utilizados previamente para identificar especies de la clase Oomycetes por Robideau *et al.* (2011), Choi *et al.* (2015), Palmucii (2015), entre otros. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank utilizando BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Cabe aclarar que algunas secuencias obtenidas con ITS no presentaron la calidad adecuada (Cepas: 4, 8, 10, 11, 16 y 26) y debido a dificultades técnicas, no pudieron ser resecuenciadas, por lo que la identificación molecular de esas cepas se realizó a través de las secuencias obtenidas con *cox2*.

En la Tabla 2 se detallan las especies identificadas a partir de los análisis moleculares, los cebadores utilizados para su secuenciación, el número de acceso de cada especie en estudio, el porcentaje de similitud calculado a través de la distancia entre pares de secuencias con el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y los números de acceso de las cepas tomadas como referencia del GenBank de mayor porcentaje de similitud y el clado al cual pertenece cada especie (Cooke *et al.*, 2000; de Cock *et al.*, 2004; McLeod *et al.*, 2009; de Cock *et al.*, 2015).

Los caracteres morfológicos correspondientes a cada aislamiento se resumen en la Tabla 3, en la cual se describe: tipo de colonia, velocidad de crecimiento promedio de la misma, largo y ancho de zoosporangios, diámetros de oogonio y oospora, largo y ancho de anteridios.

En base a los estudios realizados fueron identificadas 4 especies de *Pythium*, 3 especies de *Phytophthora* y 3 especies de *Phytopyrium* afectando 9 cultivos intensivos diferentes en distintas localidades de la provincia de Corrientes. *Pythium aphanidermatum* fue la especie más prevalente afectando a una gran cantidad de hospedantes diferentes. A continuación se describen detalladamente las características de cada uno de los aislamientos que conforman la colección, así como la patogenicidad en sus hospedantes de origen y en otros pertenecientes a la misma familia botánica.

Tabla 2. Identificación molecular de los aislamientos a nivel de especie. Se detallan los cebadores utilizados para la secuenciación, el número de acceso de cada especie en estudio y de las especies utilizadas como referencia, el porcentaje de similitud y el clado/grupo al cual pertenecen.

Aislado N°	Locí	Especie	Nro. de Acceso en GenBank	% de Sim.	Nro. Acceso cepa de referencia (GenBank)	Clado/Grupo
1	COX2	<i>Pythium irregulare</i>	MK602217	99	KP264247.1	F
	ITS		MK534110	100	KU210692.1	
2	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602192	99	AF196580.1	A
	ITS		MK534108	100	KU211462.1	
3	COX2	<i>Phytophthora nicotianae</i>	MK602193	99	KJ506457.1	1/II
	ITS		-	77	DQ059571.1	
4	COX2	<i>Phytophthora capsici</i>	MK602194	99	EF623864.1	2/II
	ITS		-	85	AJ854284.1	
5	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602195	99	AF196580.1	A
	ITS		MK534111	100	KU211462.1	
6	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602196	100	AF196580.1	A
	ITS		MK534109	100	KU211462.1	
7	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602197	100	AF196580.1	A
	ITS		MK534112	100	KU211462.1	
8	COX2	<i>Phytophthora capsici</i>	MK602198	99	EF623864.1	2/II
	ITS		-	79	KM360045.1	
9	COX2	<i>Pythium spinosum</i>	MK602199	99	AF196617.1	F
	ITS		MK534113	99	KU208265.1	
10	COX2	<i>Phytophthora capsici</i>	MK602200	99	EF623864.1	2/II
	ITS		-	88	MH842162.1	
11	COX2	<i>Pythium irregulare</i>	MK602201	99	KP264247.1 DQ071382.1	F
12	COX2	<i>Phytophthora cactorum</i>	MK602202	99	AY129179.1	1/I
	ITS		MK534114	100	KJ128036.1	
13	COX2	<i>Pythium irregulare</i>	MK602203	99	DQ071382.1	F
	ITS		MK534115	98	KU210692.1	
14	COX2	<i>Pythium irregulare</i>	MK602204	99	DQ071382.1	F
	ITS		MK534116	99	HQ643622.1	
15	COX2	<i>Pythium myriotylum</i>	MK602205	99	AF196605.1	B

Identificación y Caracterización de Aislamientos de Pythium y Phytophthora de Cultivos Intensivos en la Provincia de Corrientes

	ITS		MK534117	100	KX671095.1	
16	COX2	<i>Phytopythium helicoides</i>	MK602206	99	KT595689.1	<i>Phytopythium</i>
17	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602207	100	AF196579.1	A
	ITS		MK534118	100	KU211462.1	
18	ITS	<i>Phytophthora cactorum</i>	MK534127	100	KJ128036.1	1/I
19	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602208	100	AF196580.1	A
	ITS		MK534119	100	KU211462.1	
20	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602209	100	AF196580.1	A
	ITS		MK534120	100	KU211462.1	
21	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602210	99	AF196580.1	A
	ITS		MK534121	100	KU211462.1	
22	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602211	99	AF196580.1	A
	ITS		MK534122	99	KU211462.1	
23	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602212	99	EU265663.3	A
	ITS		MK534123	100	KU211462.1	
24	COX2	<i>Pythium irregulare</i>	MK602213	100	GU071777.1	F
	ITS		MK534124	99	MF948666.1	
25	COX2	<i>Pythium irregulare</i>	MK602214	99	KP264247.1	F
	ITS		MK534125	99	MF948666.1	
26	COX2	<i>Phytophthora nicotianae</i>	MK602215	98	KJ506457.1	1/II
27	COX2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK602216	99	EU265663.3	A
	ITS		MK534130	100	KU211462.1	
28	ITS	<i>Phytophthora cactorum</i>	MK534126	100	KJ128036.1	1/I
29	-	<i>Pythium aphanidermatum</i>	-	-	-	A
30	ITS	<i>Phytopythium vexans</i>	MK534128	96	GU133597.1	<i>Phytopythium</i>
31	ITS	<i>Phytopythium mercuriale</i>	MK534129	91	KU211357.1	<i>Phytopythium</i>

Tabla 3. Características morfológicas de los aislamientos analizados. Se describen forma y velocidad de crecimiento de las colonias, largo y ancho o diámetro de zoosporangios, diámetro de clamidosporas, oogonio y oosporas, largo y ancho de anteridios.

Aislamiento Nro	Patógeno	Colonia	Velocidad de crecimiento (cm/día)	Zoosporangios (µm)	Clamidosporas	Diámetro Oogonios (µm)	Anteridios (µm)	Diámetro Oosporas (µm)
1	<i>Pythium irregulare</i>	Radiada, micelio algodonoso aéreo	1,8	14,7	-	15,5	12,8 x 6,0	13,2
2	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Crecimiento tipo aracnoide, escaso micelio aéreo	1,1	-	-	19,1	13,1 x 9,8	16,6
3	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Sin bordes definidos, escaso micelio aéreo	0,8	32,8 x 24,1	27,5	21,2	10,3 x 11,3	-
4	<i>Phytophthora capsici</i>	Bordes definidos, escaso micelio aéreo	1,6	67,8 x 45,2	-	-	-	-
5	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	3,2	61 x 12,1	-	18,2	7,2 x 6,3	13,7
6	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,8	52 x 23,2	-	23,4	12,9 x 9,4	20,1
7	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	70 x 9,4	-	19,8	10,9 x 11,7	14,8
8	<i>Phytophthora capsici</i>	Compacta, micelio con crecimiento por debajo de la superficie del medio de cultivo	1,2	49,8 x 28,0	-	-	-	-
9	<i>Pythium spinosum</i>	Sin un patrón definido, algodonosa, micelio aéreo	3,0	13,6 x 10	-	17,7	7,5 x 6	15,2
10	<i>Phytophthora capsici</i>	Compacta con bordes definidos, micelio mayormente debajo de la superficie del medio de cultivo	1,2	40,7 x 28,7	-	-	-	-
11	<i>Pythium irregulare</i>	Radiada, algodonosa, micelio aéreo	2,4	13,7	-	15	13,6 x 4,3	11,3
12	<i>Phytophthora cactorum</i>	Compacta, algo radiada, sin bordes definidos, micelio nudoso	0,9	23,9 x 18,75	19,7	26,9	10,6 x 15,4	24
13	<i>Pythium irregulare</i>	Radiada, algodonosa, micelio aéreo	3,0	17,5	-	15,3	7,3 x 6,1	12,6
14	<i>Pythium irregulare</i>	Radiada, algodonosa, micelio aéreo	2,8	13,5	-	15,1	8,4 x 5,9	12,2
15	<i>Pythium myriotylum</i>	Sin un patrón definido, algodonosa, abundante micelio aéreo	4,8	22,3 x 7,3	-	23,4	10,7 x 9,5	19,4
16	<i>Phytophythium helicoides</i>	Leve patrón radiado, micelio aéreo	4,3	-	-	-	-	-
17	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	70,2 x 6,1	-	19,4	10,5 x 11,3	14,5
18	<i>Phytophthora cactorum</i>	Compacta, algo radiada, sin bordes definidos, micelio nudoso	0,9	27,8 x 19,4	-	26,1	11,4 x 15,4	23,7
19	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	70,1 x 5,7	-	-	-	-
20	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	66,4 x 7,8	-	25,4	11,3 x 13,5	17,9
21	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	68,8 x 11,8	-	19,55	10,8 x 9,2	16,8
22	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	72,8 x 12,1	-	20,4	7,7 x 7,6	16,3
23	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,0	70 x 15	-	20,2	12,1 x 10	-
24	<i>Pythium irregulare</i>	Radiada, algodonosa, micelio aéreo	3,0	17,2	-	-	-	-
25	<i>Pythium irregulare</i>	Radiada, algodonosa, micelio aéreo	4,5	22,8 x 16,9	-	17,11	7,94 x 5,5	14,6
26	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Tipo aracnoide, escaso micelio aéreo	0,9	29,8 x 21,5	18,5	-	-	-
27	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	67 x 8,1	-	21,3	12,6 x 10,3	18,5
28	<i>Phytophthora cactorum</i>	Compacta, algo radiada, sin bordes definidos, micelio nudoso	0,6	27,5 x 19	-	26,5	11,2 x 14,9	24,1
29	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Sin patrón de crecimiento definido, micelio aéreo	4,5	-	-	21,6	12 x 10,1	17,5
30	<i>Phytophythium vexans</i>	Con patrón estrellado, escaso micelio aéreo, de color castaño claro en el centro y blanquecino en sus márgenes	2,25	15,7	-	-	-	-
31	<i>Phytophythium mercuriale</i>	Arrosetada con escaso micelio aéreo, de color blanco	2,25	24,8	-	27,8	15,1 x 5,5	-

4.1.1 Aislamientos identificados como *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzpatrick 1923

Sinónimos: *Rheosporangium aphanidermatum* Edson (1915), *Rheosporangium aphanidermatum* Edson (1915), *Nematosporangium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. (1923), *Pythium butleri* Subraman., (1919), *Nematosporangium aphanidermatum* var. *hawaiiensis* Sideris (1931), *Nematosporangium aphanidermatum* var. *hawaiiense* Sideris (1931).

Este patógeno fue descrito en un principio por Edson en Estados Unidos en 1915, como agente causal de damping-off en *Beta vulgaris* L. (remolacha). Este autor lo había denominado *Rheosporangium aphanidermatum*. En 1923, Fitzpatrick lo ubicó en el género *Pythium*. En Argentina fue aislado por primera vez por Frezzi en 1950, a partir de plantas adultas de *Pisum sativum* L. (arveja) severamente afectadas por podredumbre radical (40 % de mortandad de plantas) en la EEA Manfredi, Córdoba. Posteriormente fue aislado, también por Frezzi, en los siguientes hospedantes: *Beta vulgaris* (remolacha), *Capsicum anuum* L. (pimiento), *Citrullus vulgaris* (Thumb.) Matsum. y Nakai (sandía), *Cucumis melo* L. (melón), *Cucurbita* sp. L., *Cucurbita pepo* (zapallo), *Phaseolus vulgaris* L. (poroto), *Fragaria vesca* L., entre otros (Frezzi, 1956; Van der Plaats-Niterink, 1981; Palmucci, 2015). Existen 304 relaciones *Pythium aphanidermatum*-hospedante citadas en el mundo, según la información disponible en *Fungal databases* (Farr y Rossman, 2015).

Las colonias obtenidas a partir de la incubación de estas cepas presentaron un exuberante crecimiento de micelio aéreo blanco algodonoso, sin un patrón de crecimiento, en corto tiempo (Tabla 3). Al cabo de 2 días, en promedio, el micelio alcanzaba la tapa de la placa de Petri, independientemente del medio de cultivo utilizado, coincidentemente con la descripción de Van der Plaats-Niterink (1981), quien señaló una rápida tasa de crecimiento para esta especie (>30 mm.día⁻¹).

Pythium aphanidermatum soporta altas temperaturas de crecimiento, siendo la máxima superior a 40°C (Van der Plaats-Niterink, 1981), por lo que es común encontrar esta especie infectando cultivos bajo invernáculo. La temperatura posee gran influencia sobre la infectividad y el daño que puede causar esta especie, siéndole muy favorables las condiciones ambientales que se presentan en la zona en estudio. Esto se asocia además con las fechas de recolección de los aislados pertenecientes a esta especie, ya que la mayoría fue obtenida en

los meses más calurosos del año. Además, fue la especie más frecuente de la colección en estudio, lo que demuestra la importancia de este patógeno en Corrientes.

Todos los aislamientos estudiados de *P. aphanidermatum* presentaron zoosporangios lobulados, similares a hifas vegetativas que en muchos casos contenían tabiques los cuales actúan como barrera para separar zonas vivas (citoplasmáticas), de las muertas de donde el citoplasma ha sido extraído. En cuanto a las estructuras sexuales, se observaron oogonios terminales y anteridio intercalar monoclinos, es decir, que nacía de la misma hifa oogonial (a veces diclino), uno por oogonio, con forma de barril comprimido. Las oosporas eran apleróticas (separadas de la pared oogonial) y de pared lisa, coincidentemente con lo descrito por Frezzi (1956) para esta especie.

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de estos aislamientos presentaron un porcentaje de identidad que varió entre 99 y 100 % (Tabla 2). A continuación, se detallan las características de cada uno de los aislamientos en relación al hospedante del cual fueron aislados.

4.1.1.1 Cepas 2, 5, 6, 7, 17 y 19

Las cepas 2, 5, 6, 7, 17 y 19 fueron aisladas en distintas localidades a partir de plantas de pimiento (Tabla 1). Las características morfológicas que presentaron sus estructuras se presentan en la Tabla 3. Todas las cepas coincidieron con las descripciones realizadas por Frezzi (1956), Van der Plaats-Niterink (1981) y Dick (1990).

Todos los aislamientos resultaron ser patógenos en pimiento, observándose la misma sintomatología que al momento de la recolección de los ejemplares enfermos (Figura 3). Por otro lado, con el aislado 19 se realizaron pruebas de patogenicidad cruzadas en berenjena, observándose síntomas de damping-off.

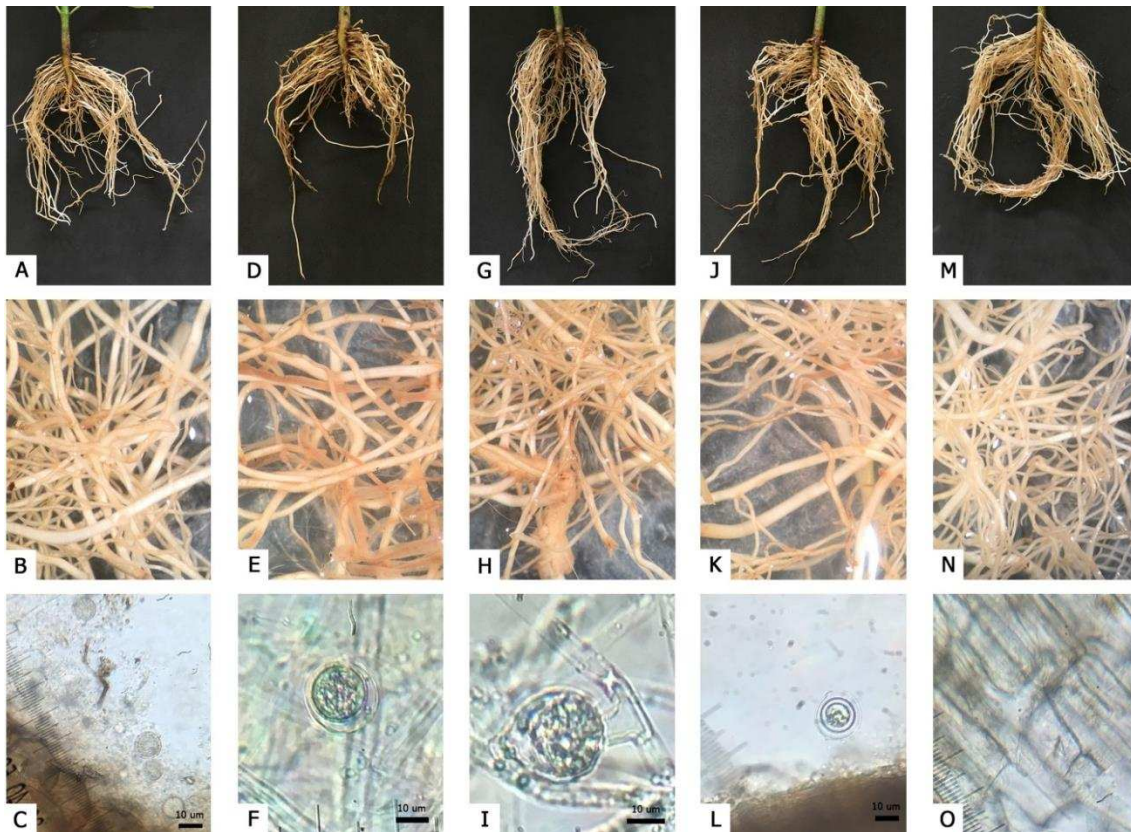


Figura 3. Prueba de patogenicidad de los aislados 5, 6, 7 y 19 en pimiento, exhibiendo raíces y cortes de tejido radical vistos en microscopio óptico. A-B. Raíces de pimiento inoculado con la cepa 5. C. Estructuras en tejido radical inoculado con la cepa 5. D-E. Raíces de pimiento inoculado con la cepa 6. F. Oospora en tejido radical. G-H. Raíces de pimiento inoculado con la cepa 7. I. Oogonio con anteridio intercalar. J-K. Raíces de pimiento inoculado con la cepa 19. L. Oospora en tejido radical inoculado con cepa 19. M-O. Raíces de pimiento testigo sin inocular, mostrando tejido sano.

Este patógeno generalmente se encuentra asociado a otras especies de *Pythium* (*P. ultimum*, *P. myriotylum*), *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., entre otros. En plantas adultas, los síntomas pueden confundirse muchas veces con daños causados por fertilizaciones excesivas, alto porcentaje de sales solubles, estrés hídrico o térmico. Esto ocurre debido a que los síntomas incluyen: reducción del vigor y del crecimiento, clorosis (Roberts, 2003). En este caso, *P. aphanidermatum* fue el único patógeno aislado a partir de las raíces de pimiento.

La relación *Pythium aphanidermatum-Capsicum annuum* fue encontrada frecuentemente en diferentes zonas de la provincia, lo que demuestra la importancia de *P. aphanidermatum* como patógeno de pimiento en Corrientes.

En coincidencia con nuestros resultados, Palmucci *et al.* (2011) describe a *P. aphanidermatum* como patógeno de pimiento en diferentes provincias de Argentina, destacándolo como uno de las especies más frecuentes en cultivos hortícolas y ornamentales después de *P. ultimum* y *P. debaryanum*.

4.1.1.2 Cepa 20

Esta cepa fue obtenida a partir de plantines de berenjena cultivados en bandejas multiceldas bajo invernadero en los que se presentó la sintomatología típica de damping-off. Esta relación patógeno-hospedante fue citada por primera vez en Corrientes por Colombo, *et al.* en el año 2005. Las características morfológicas se presentan en la Tabla 3.

Las pruebas de patogenicidad y patogenicidad cruzada se practicaron en berenjena (Figura 4) y tomate (Figura 5), respectivamente, reproduciendo la enfermedad. El agente causal pudo ser reaislado satisfactoriamente en ambos casos, y sus características se correspondieron con las de la especie.

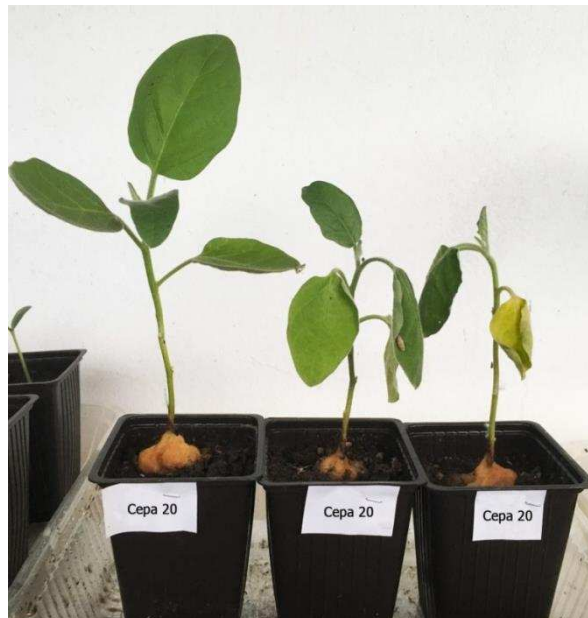


Figura 4. Prueba de patogenicidad del aislado 20 en plantas de berenjena exhibiendo síntomas de damping-off.

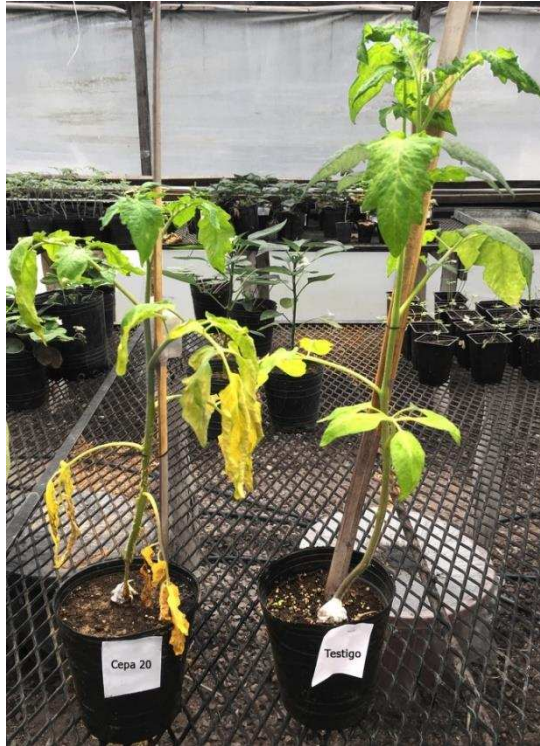


Figura 5. Prueba de patogenicidad cruzada del aislado 20 en planta de tomate, exhibiendo síntomas de damping-off (izquierda) y testigo sin inocular (derecha).

Drechsler (1926) menciona a *P. aphanidermatum* como agente causal de la podredumbre algodonosa de frutos de berenjena, el cual producía la destrucción total de los frutos en tan solo 78 horas, hecho que demuestra la agresividad de este patógeno. En Corrientes, la relación *P. aphanidermatum-Solanum melongena* fue descrita en el año 2005 por Colombo *et al.*, produciendo podredumbre basal de plantas. *Pythium aphanidermatum* es capaz de infectar a todas las especies de solanáceas cultivadas en la provincia de Corrientes, incluyendo además, a otras especies de distintas familias botánicas, por lo que resulta de gran importancia su correcta identificación para realizar un manejo adecuado y evitar reducciones en rendimiento.

4.1.1.3 Cepa 21

Fue aislada a partir de plantas de *Lactuca sativa* (lechuga) producidas en bandejas multicelda con síntomas de damping-off (Tabla 1).

Este aislamiento presentó como estructuras sexuales oogonios de 19,55 μm , anteridios de 10,8 x 9,2 μm y oosporas de 16,77 μm en promedio; y como estructuras asexuales, zoosporangios filamentosos que alcanzaron tamaños de 194 x 19,6 μm (Tabla 3, Figura 6). El crecimiento en placas fue rápido, 45 $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$, presentando micelio aéreo blanquecino, algodonoso.



Figura 6. Estructuras sexuales y asexuales de *Pythium aphanidermatum*, aislado 21. A. Oospora aplerótica. B. Zoosporangio lobulado.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de lechuga con 2 y 4 hojas desplegadas, expresando síntomas a los 21 DDI. En ambos casos fue posible observar los síntomas típicos de damping-off (Figura 7).

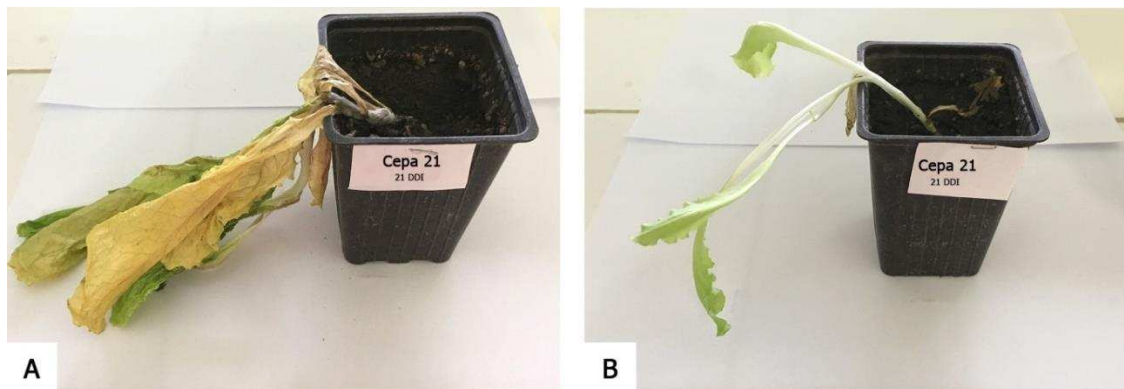


Figura 7. Prueba de patogenicidad del aislado 21. A. Planta de lechuga (4 hojas) inoculada con cepa 21 exhibiendo síntomas de damping-off. B. Planta de lechuga (2 hojas) inoculada con cepa 21 con síntomas de damping-off.

Esta enfermedad puede ocurrir en etapa de semilla, pre y post emergencia. En post emergencia, es posible observar una lesión decolorada, comprimiendo el tallo en su parte más cercana a la superficie del suelo. Esto sucede debido a que el patógeno solo puede destruir la capa externa de células que rodea al tallo. Se produce necrosis de los ápices radicales, pero las posibilidades de sobrevivir aumentan a medida que la planta crece. En este caso, el resultado es la falta de homogeneidad del cultivo, ya que las plantas afectadas disminuyen su crecimiento (Matheron, 1997).

Además de las especies de *Pythium* que causan damping-off, existen otras asociadas al marchitamiento, tizón de la hoja y podredumbre de la raíz de lechuga. En 1993, *Pythium*

uncinulatum Van der Plaats-Niterink y Blok provocó podredumbre de la raíz en lechuga, resultando en pérdidas estimadas del 20-30 % en California. Entre los síntomas se describen amarillamiento de las hojas exteriores, coloración amarillo oscuro a marrón de la raíz principal, necrosis de los ápices de las raíces. Entre las especies encontradas en las raíces de lechuga se citan a *P. spinosum* Sawada, *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. megalacanthum* de Bary, entre otras (Davis y Davis, 1997). Además, este patógeno ha sido encontrado provocando podredumbre de raíces en plantas de lechuga en sistemas hidropónicos (Sutton *et al.*, 2006), hecho que demuestra la importancia de este patógeno, ya que es capaz de provocar daños en diferentes sistemas de producción.

4.1.1.4 Cepa 22

Esta cepa fue aislada a partir de plantas de *Petroselinum crispum* Mill. (perejil) cultivadas a campo con síntomas de marchitez.

Este aislamiento presentó una velocidad de crecimiento de 45 mm.día⁻¹ en APG, cubriendo la placa por completo a las 48 horas con un micelio denso, aéreo, de color blanquecino, característico de *Pythium aphanidermatum*. Los zoosporangios lobulados, oogonios, anteridios y oosporas fueron los característicos de esta especie en cuanto a tamaño y forma (Tabla 3).

Las pruebas de patogenicidad efectuadas en plantas de perejil dieron resultados positivos, observándose estructuras típicas de este oomycete en los tejidos infectados (Figura 8).

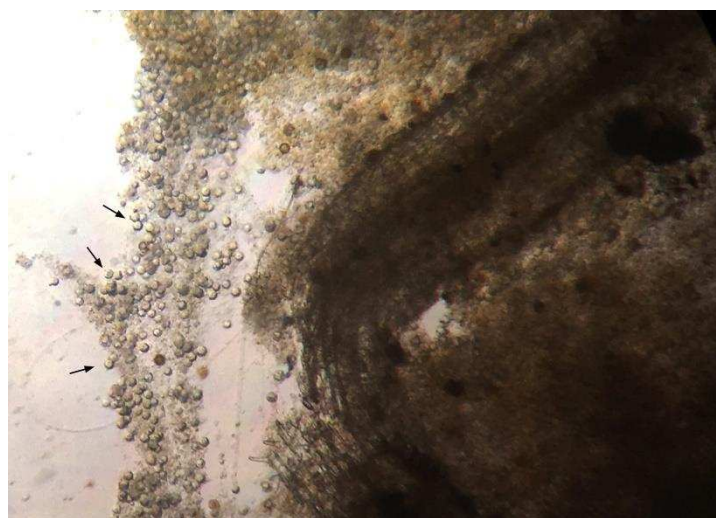


Figura 8. Corte de tejido radical de planta de perejil inoculada con aislado 22 con una gran cantidad de estructuras de reproducción de *Pythium aphanidermatum* (10x).

Pythium aphanidermatum fue descrita por primera vez en este hospedante en Hawaii, por Raabe *et al.* en 1981. Frezzi, en 1956, describió a *Pythium irregulare*, *P. mastophorum* y *P. ultimum* causando damping-off en *Petroselinum crispum*. A la fecha, no se encuentran registros de este patógeno en perejil en Argentina.

4.1.1.5 Cepas 23, 27, 29

Estas cepas fueron aisladas a partir de plantas de tomate cultivadas en invernáculo (Tabla 1). Las plantas presentaron un estrangulamiento en la zona del cuello, de color marrón oscuro y marchitamiento.

El crecimiento en placa fue muy rápido para los tres aislamientos, resultando una velocidad promedio de 45 mm.día⁻¹. Se observaron estructuras sexuales y asexuales características de esta especie (Tabla 3, Figura 9).

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en plantas de tomate, reproduciendo los síntomas a los 20 DDI (Figuras 9 y 10). En los tejidos infectados pudo observarse estructuras típicas de *P. aphanidermatum*, que coincidieron con las descritas en la Tabla 3 para estos aislamientos (Figuras 9 y 11).

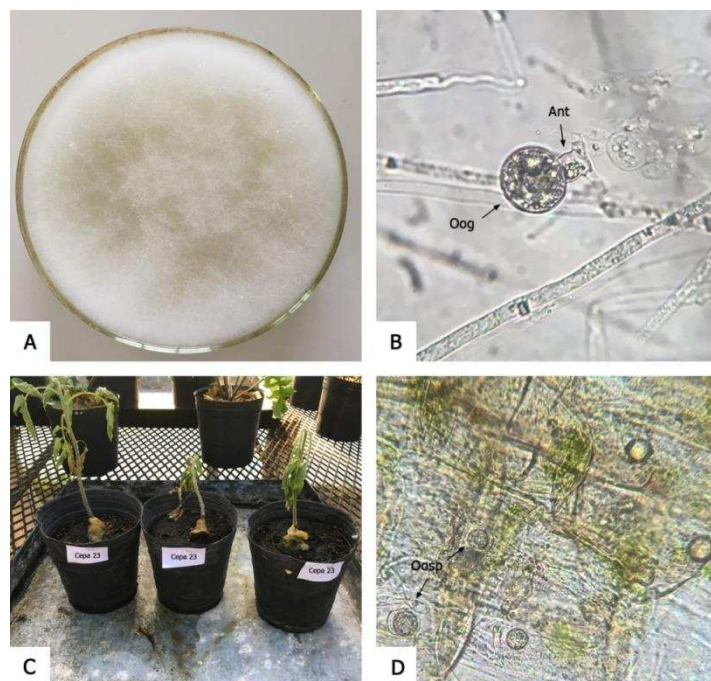


Figura 9. Características morfológicas y prueba de patogenicidad de *Pythium aphanidermatum*, aislado 23. A. Colonia del aislado 23 en APG. B. Oog: oogonio, Ant: anteridio intercalar. C. Plantas de tomate inoculadas con cepa 23 con síntomas de damping-off. D. Oosporas (Oosp) en tejido de tomate inoculado.

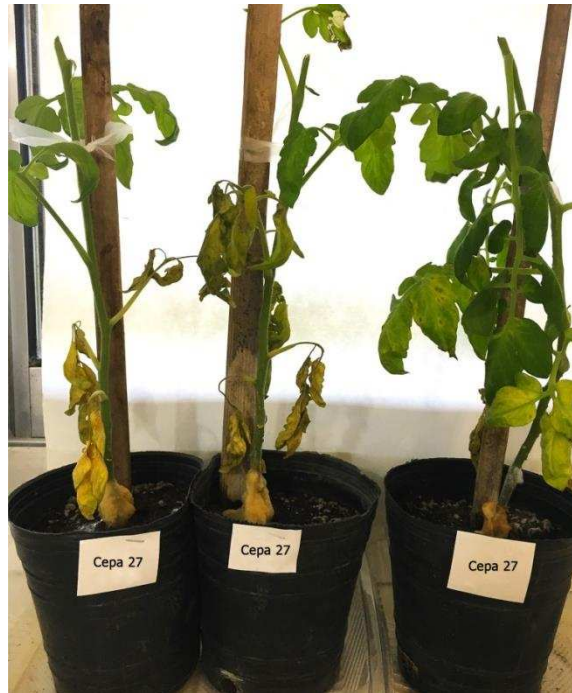


Figura 10. Prueba de patogenicidad del aislado 27 en plantas de tomate exhibiendo síntomas de marchitamiento.



Figura 11. Oogonio y anteridio intercalar correspondientes al aislado 29, coloreados con azul de Amman.

En 1945, Preston describió a *Pythium aphanidermatum* infectando a *Solanum lycopersicum* (tomate) en Oklahoma, EEUU. Grijalba *et al.* en 2015 reportaron por primera vez a este patógeno causando podredumbre basal y muerte de plantas adultas de tomate en Argentina; también resaltan que las condiciones ambientales (temperaturas muy altas) fueron clave para la predisposición de las plantas al ataque de este patógeno. Este hecho se condice con las condiciones ambientales en las cuales fueron obtenidos los aislados 23, 27 y 29, los cuales aparecieron provocando muerte de plantines de tomate en época de trasplante (meses más cálidos del año).

Como se mencionó anteriormente, *P. aphanidermatum* es una especie cosmopolita, con una amplia gama de hospedantes y una velocidad de crecimiento asombrosamente alta. Es capaz de infectar tanto plantas jóvenes como adultas y diferentes órganos, desde raíces y tallos hasta frutos en contacto con el suelo; además fue encontrada en diferentes sistemas de producción (a campo, en sustrato, en hidroponía), lo que demuestra la importancia de su correcta identificación y oportuno control.

4.1.2 Aislamientos identificados como *Pythium irregulare* Buisman

Pythium irregulare Buisman (1927)

Sinónimos: *P. equiseti* Sadebeck (1874), *Pythium irregulare* var. *irregulare* Buisman (1927), *Pythium irregulare* var. *hawaiiense* Sideris (1932), *Pythium polymorphon* Sideris (1932), *Pythium fabae* G. Cheney (1932), *Pythium kunmingense* Yu (1973), *Globisporangium irregulare* (Buisman) Uzuhashi, Tojo y Kakish. (2010).

Esta especie fue descrita por Buisman en 1927, la cual fue aislada de raíces necrosadas de *Cucumis sativus* LINN., *Lupinus* sp., y *Pisum sativum* LINN. en Holanda (Van der Plaats Niterink, 1981). Frezzi en 1949, encontró esta especie por primera vez en raíces de *Hordeum vulgare* en Argentina. Posteriormente, la identificó en 28 hospedantes, entre ellos se destacan: *Arachis hipogea* LINN. (maní), *Daucus carota* LINN. (zanahoria), *Eruca sativa* (rúcula), *Gypsophila* sp., *Lactuca sativa* LINN. (lechuga), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum melongena* (berenjena), *Petroselinum crispum* (perejil), *Phaseolus vulgaris* (poroto), *Pisum sativum* (arveja), entre otras (Frezzi, 1956). Existen 238 combinaciones de *Pythium irregulare*-hospedantes según Farr y Rossman en Fungal Databases (2015).

Pythium irregulare se caracteriza por poseer esporangios esféricos o subesféricos, elipsoidales o limoniformes con septos. Los oogonios pueden presentar algunas espinas (ornamentados) o ser lisos, de 17 µm en promedio (Robertson, 1980). Dicho autor no observó producción de zoosporas, a diferencia de Frezzi (1956), quien fue capaz de obtenerlas rápidamente, luego de colocar zoosporangios de esta especie en agua. Van der Plaats-Niterink (1981) en su Monografía del género *Pythium*, describe hinchamientos hifales para esta especie, los cuales son denominados zoosporangios por otros autores como Frezzi (1956); Robertson (1980); entre otros. Ho (2011) define a los zoosporangios como aquellas estructuras que son capaces de producir zoosporas e hinchamientos hifales a aquellas que no lo hacen. En esta Tesis se tomará el criterio de Frezzi y Robertson, y se denominará a estas estructuras como zoosporangios.

Los aislamientos 1, 11, 13, 14, 24 y 25 presentaron características morfológicas típicas de *P. irregulare* (Tabla 3) y las secuencias de los loci *cox2* e ITS de estos aislamientos presentaron un porcentaje de identidad que varió entre 98 y 100 % con esta especie (Tabla 2). A continuación, se detallan las características de cada uno de los aislamientos en relación al hospedante del cual fueron aislados.

4.1.2.1 Cepas 1 y 25

La cepa 1 fue aislada a partir de raíces de *Gerbera jamesonii* (gerbera) en enero de 2011. La cepa 25 también fue obtenida a partir de plantas de gerbera cultivadas en invernáculo en el año 2016. Los síntomas que presentó este hospedante fueron marchitamiento y pudrición de raíces como se puede observar en la Figura 12. El crecimiento en placas fue rápido, cubriéndolas al cabo de 4 días. La colonia radiada estaba constituida por micelio blanco algodonoso tupido aéreo, sobre todo en los márgenes de la placa de Petri.



Figura 12. Planta de gerbera con síntomas de marchitez causada por el aislamiento 25, identificado como *Pythium irregulare*.

El aislado 1 en APG creció a una velocidad promedio de 18 mm diarios, cubriendo la placa de Petri en 5 días (90 mm), en medio AV8 fue similar. El aislado 25 fue más rápido, alcanzando los 45 mm.día⁻¹.

Se lograron observar zoosporangios esféricos de 17,5 μm para la cepa 25 y de 14,7 μm para la cepa 1; y limoniformes intercalares, de 22,8 x 16,9 μm y de 26,3 x 14,8 μm en promedio (aislado 25 y 1, respectivamente). Los oogonios poseían un tamaño de 15,5 μm y 17,1 μm en promedio, cepa 1 y 25 respectivamente (Tabla 3). En algunos casos fue posible observar espinas, mayormente 1, en la pared del oogonio (ornamentado). Fue posible encontrar anteridios monoclinos persistentes, 1 o 2 por oogonio; la célula anteridial claviforme, oval-alargada separada por un tabique (Figura 13). Al ser colocados en placas con agua libre durante 24 horas, fue posible observar germinación directa de los zoosporangios (como conidios), los cuales fueron producidos en abundancia como fue descrito por Palmucci *et al.* (2011), Díaz-Celaya *et al.* (2011) y Palmucci (2015).

Se realizaron pruebas de patogenicidad en gerbera con resultados satisfactorios a los 14 días después de la inoculación (DDI, Figura 14). La prueba de patogenicidad cruzada se practicó con el aislado 25 en plantas de *Eustoma* sp. (lisianthus) mostrando síntomas también a los 14 DDI. Se logró el reaislamiento del patógeno de ambos hospedantes.

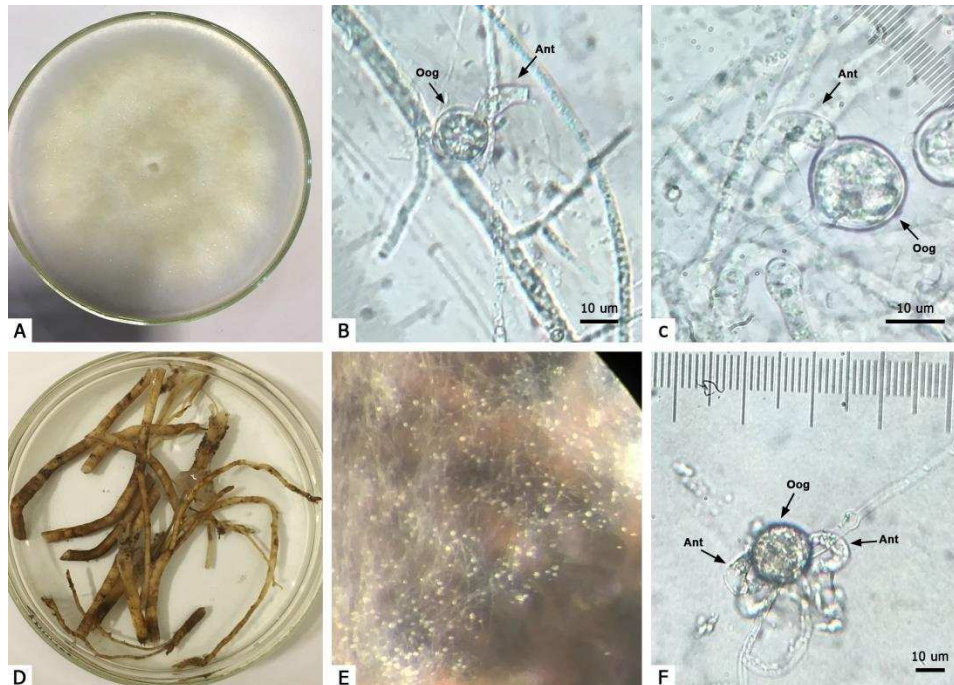


Figura 13. Características morfológicas y patogenicidad del aislamiento 1, *Pythium irregulare*. A. Colonia en medio APG. B-C. Oogonio (Oog) con anteridio monoclinos clavados (Ant). D. Raíces de gerbera inoculadas con cepa 1. E. Micelio con estructuras de *Pythium irregulare* vistas en lupa en raíces, luego de 3 días de incubación. F. Oogonio (Oog) con dos anteridios monoclinos clavados (Ant).

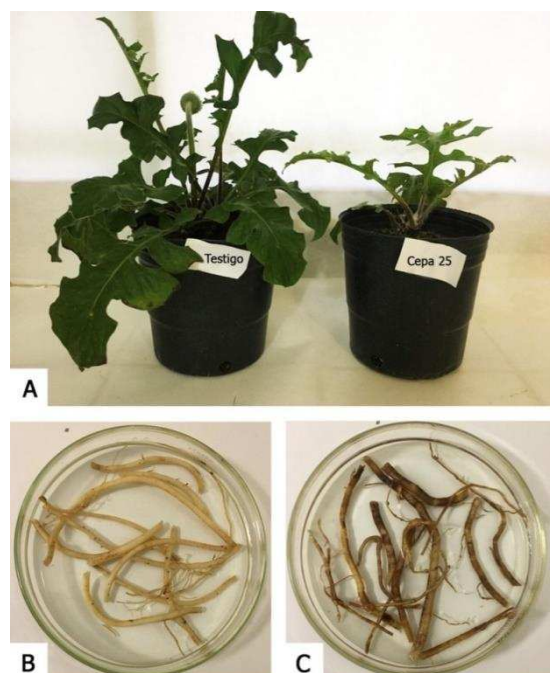


Figura 14. Pruebas de patogenicidad del aislamiento 25. A. Gerbera testigo e inoculada con la cepa 25. B. Raíces de gerbera testigo, sana. C. Raíces de gerbera inoculada con la cepa 25.

P. irregulare en gerbera fue descrita por Katawczik (2008) en Estados Unidos, pero aún no ha sido descrita en Argentina para este hospedante. Algunos investigadores como Ferronato *et al.* (2008) y Cundom (2013) han mencionado a *Pythium* sp. como patógeno de gerbera sin hacer alusión a la especie. En nuestro conocimiento, este es el primer registro de *Pythium irregulare* en gerbera en Argentina.

4.1.2.2 Cepa 11

Este aislamiento fue obtenido a partir de tejido radical de frutilla en julio de 2016 (Figura 15).



Figura 15. Planta de frutilla con síntoma de necrosis en raíces causado por *Pythium irregulare*, cepa 11.

El crecimiento promedio en placa de Petri fue de 24 mm diarios, cubriéndola en 4 días. El crecimiento inicial fue mayor en AV8 (41 mm en 1 día) que en APG (31 mm en 1 día), pero al cabo de 4 días, el hongo cubrió las placas de Petri en ambos medios de cultivo por igual. Presentó oogonio equinulado (ornamentado), con una espina, con anteridio monoclinico (formado a partir de la hifa del oogonio) y célula anteridial claviforme; zoosporangios limoniformes intercalares de 13,7 μm en promedio (Figura 16, Tabla 3).

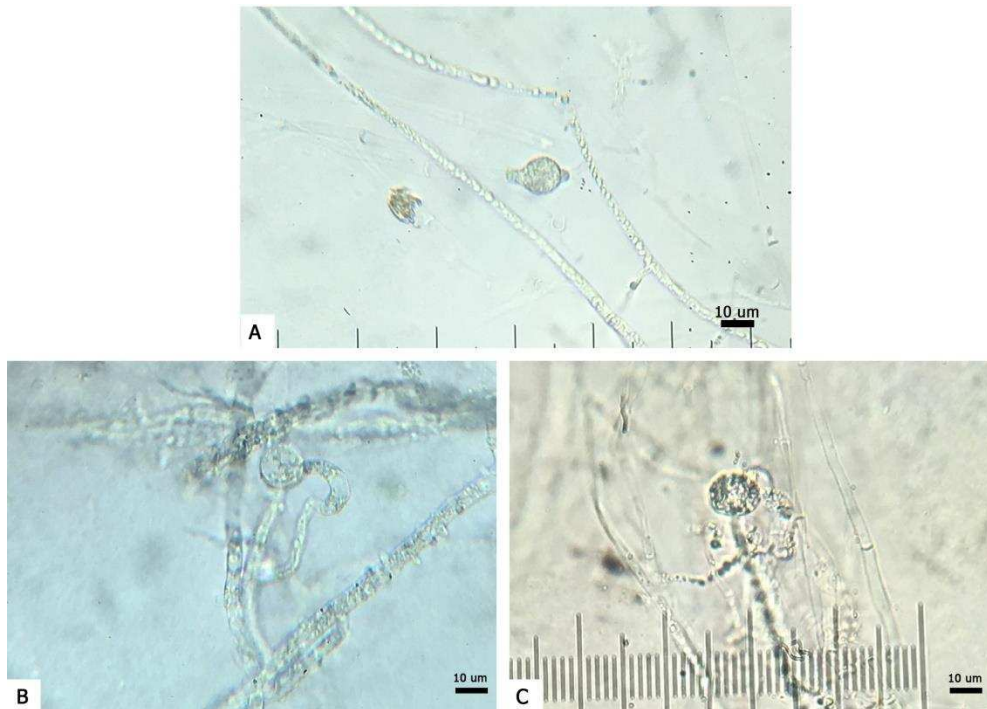


Figura 16. Estructuras sexuales y asexuales características del aislado 11. A. Zoosporangio intercalar. B-C. Oogonio terminal (Oog) con anteridio monoclinico (Ant).

La prueba de patogenicidad se realizó plantas de frutilla, con resultados satisfactorios a los 20 DDI.

Pythium irregulare ha sido descrito como patógeno de *Fragaria x ananassa* (frutilla) en 1970 por Nemeč y Sanders en Illinois, EE.UU. Palmucci *et al.* (2011) en “*Status of the Pythiaceae (Straminipila) in Argentina. I. The Genus Pythium*”, menciona al género *Pythium* como agente causal de podredumbre de raíz en frutilla en Corrientes, Formosa y Santa Fe, pero no ha sido descrita la especie involucrada. Según esta revisión *Pythium irregulare* no está indicado como patógeno de frutilla en el país.

4.1.2.3 Cepas 13 y 14

Estas cepas fueron encontradas causando damping-off en *Citrullus lanatus* (sandía) proveniente de distintas localidades, en septiembre de 2016.

A los 3 días de la siembra en APG y en CMA, el hongo colonizó completamente la placa de Petri con un micelio blanco algodonoso, de crecimiento radiado, característico de esta especie (Figura 17). La velocidad promedio de crecimiento fue de 29 mm.día⁻¹.



Figura 17. Colonia de *Pythium irregulare* en medio CMA (3 días de incubación).

Los zoosporangios, oogonios, anteridios y oosporas de estas cepas coincidieron con las características descritas por Frezzi, 1956; Van der Plaats-Niterink, 1981 para *Pythium irregulare* en cuanto a tamaño y forma (Tabla 3).

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en plantas de sandía a los 20 días después de la siembra (DDS, Figura 18). La prueba de patogenicidad cruzada fue practicada en plantas de melón a los 20 DDS. En ambos hospedantes, los síntomas de damping-off se manifestaron a los 11 DDI, tanto para el aislamiento 13 (Figuras 18 y 19) como para el aislamiento 14 (Figuras 20 y 21). En ambos casos, el patógeno fue aislado y estudiado en sus características coincidiendo con las descritas para *P. irregulare* (Figuras 19, 20 y 21). Los testigos de los dos hospedantes permanecieron sanos.



Figura 18. Prueba de patogenicidad del aislamiento 13 en plantas de sandía exhibiendo síntomas de damping-off a los 11 DDI.

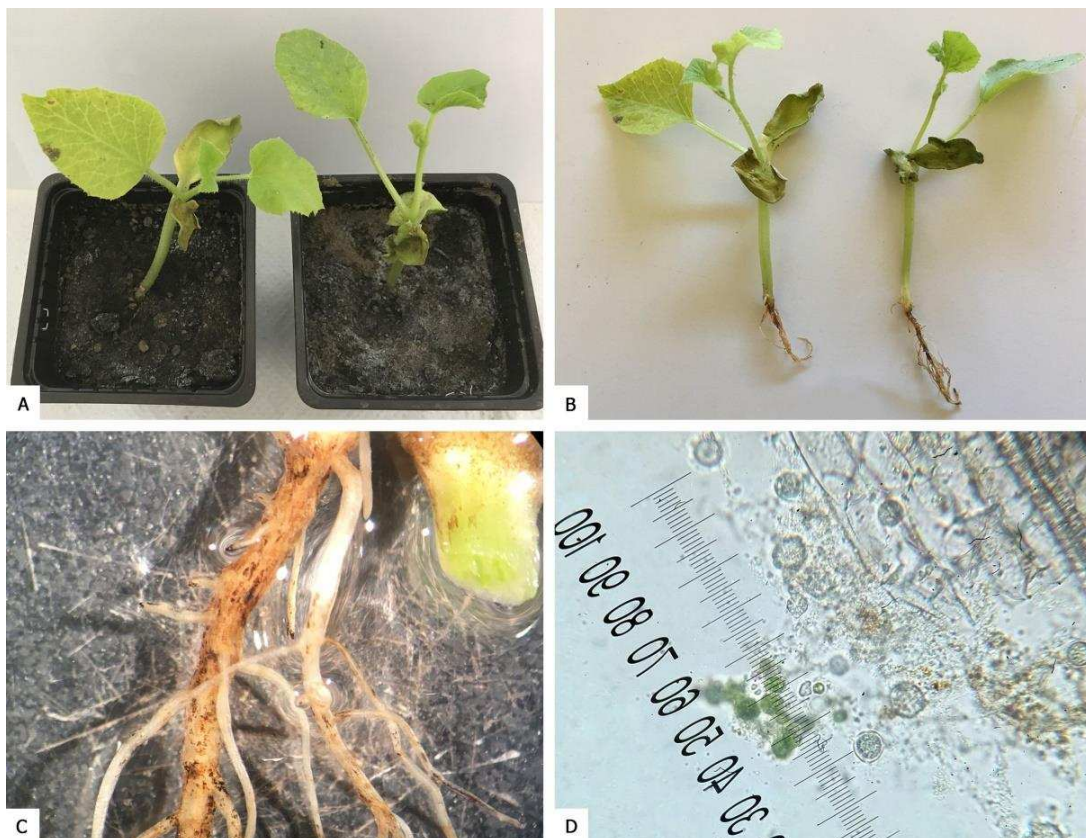


Figura 19. Patogenicidad cruzada del aislado 13 en plantas de melón a los 11 DDI. A-B. Plantas de melón con síntomas de damping-off. C. Raíz de melón sintomática. D. Oosporas de *Pythium irregulare* en corte de tejido radical.

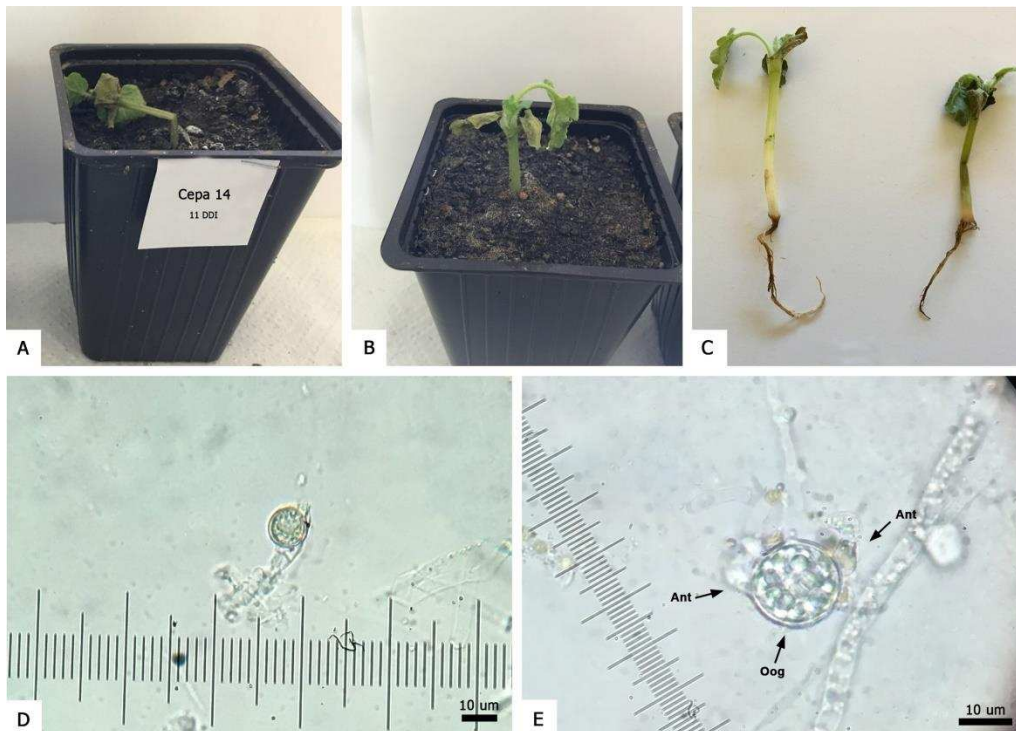


Figura 20. Prueba de patogenicidad del aislado 14 en plantines de sandía a los 11 DDI. A-C. Plantas de sandía con síntomas de damping-off. D. Oospora del aislado 14, *Pythium irregulare*, en tejido radical inoculado. E. Oogonio terminal con dos anteridios monoclínicos.

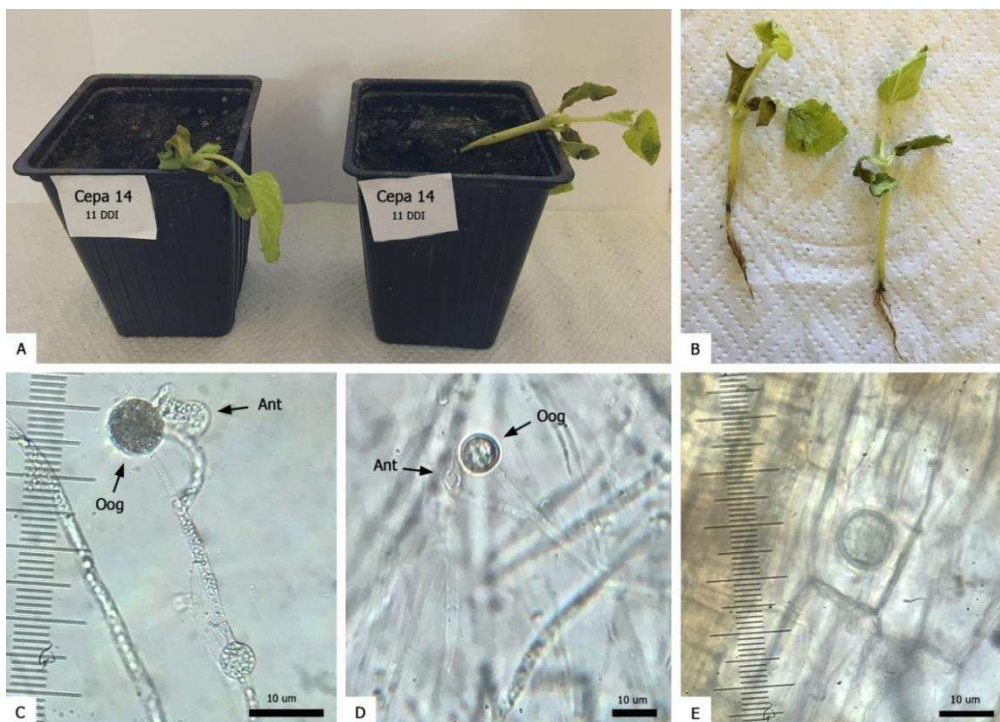


Figura 21. Prueba de patogenicidad cruzada correspondiente al aislado 14. A. Plantas de melón con síntomas de damping-off. B. Estrangulamiento del cuello y pudrición de raíces de melón. C. Detalle de Oogonio (Oog) y anteridio (Ant) monoclino, 100x. D. Oogonio terminal y anteridio monoclino, 40x. E. Oospora en tejido radical de planta de melón inoculada.

P. irregulare ha sido citada como patógeno de sandía en EE.UU en 1938 (Middleton, 1943) y en Papua Nueva Guinea en 1960 (Farr y Rossman, 2015). En Argentina se mencionan distintas especies de *Pythium* como agentes causales de enfermedad en sandía, tales como: *Pythium debaryanum*, *P. ultimum*, *P. acanthicum*, *P. aphanidermatum*, *P. oligandrum* y *P. periplocum*, pero no se hace referencia a *P. irregulare* (Atlas Fitopatológico Argentino, 2019). Según la revisión bibliográfica realizada en esta Tesis de Maestría, este sería el primer reporte de *P. irregulare* en sandía en Argentina.

4.1.2.4 Cepa 24

Este patógeno se aisló a partir de plantas de lisianthus (*Eustoma* sp.) cultivadas bajo invernáculo con síntomas de podredumbre de raíces causada por *Pythium irregulare*.

El oomycete creció rápidamente en placa, cubriéndola al cabo de 3 días con micelio blanco algodónoso, generando una colonia de forma radiada. Se observaron escasas estructuras de reproducción sexual y asexual características de *P. irregulare* (Tabla 3, Figura 22).

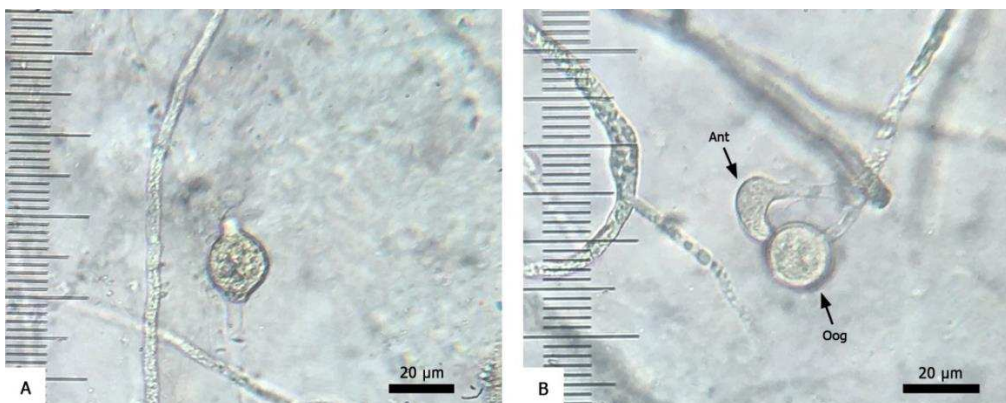


Figura 22. Estructuras sexuales y asexuales características del aislado 24. A. Zoosporangio limoniforme intercalar. B. Oogonio terminal con anteridio monoclinico con célula anteridial claviforme.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en plantines de lisianthus, los cuales mostraron síntomas de marchitez a los 14 DDI (Figura 23). Al microscopio se observaron estructuras correspondientes a *Pythium irregulare*, lo cual se corroboró con aislamientos en placas.

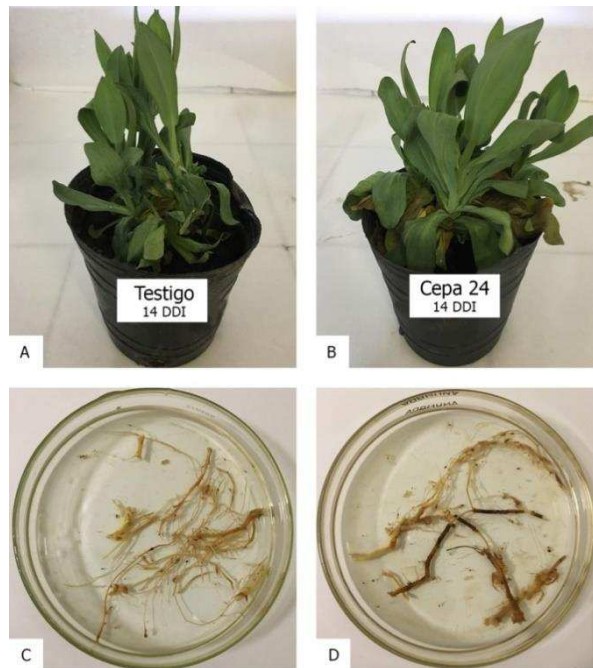


Figura 23. Prueba de patogenicidad del aislado 24 en *Eustoma* sp. a los 14 DDI. A. Testigo. B. Inoculado con cepa 24. C. Raíces del testigo. D. Raíces de la planta inoculada.

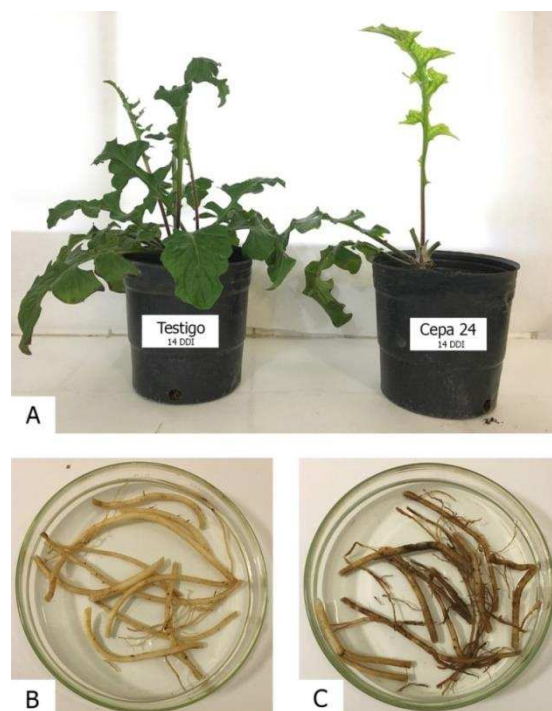


Figura 24. Patogenicidad cruzada del aislado 24 en plantas de gerbera a los 14 DDI. A. Plantas de gerbera, testigo (izquierda) e inoculada (derecha). B. Raíces de gerbera testigo. C. Raíces de gerbera inoculada.

La prueba de patogenicidad cruzada se practicó en plantas de gerbera (Figura 24). A los 14 DDI se observó la presencia de *Pythium* en raíces, el cual fue aislado en placa, corroborando la identidad del patógeno como *P. irregulare*.

La podredumbre de raíces de lisianthus causada por *Pythium* spp. ha sido descrita en diferentes países, como EEUU, España, Ecuador, entre otros. Además de *P. irregulare*, también se encuentran frecuentemente a *P. myriotylum* y *P. spinosum* como agentes causales de esta enfermedad (McGovern, 2016). En Argentina, *P. irregulare* no ha sido descrita como patógena de este hospedante aún.

4.1.3 Aislamientos identificados como *Pythium myriotylum* Drechsler

Pythium myriotylum Drechsler 1930

Fue descrito originalmente en *Solanum lycopersicum* (tomate) en Estados Unidos en 1930. Se presenta en regiones cálidas, pero también ha sido aislado en invernáculos de zonas templadas (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Según la Farr y Rossman (2015), se lo puede encontrar en más de 81 hospedantes en distintas partes del mundo. Entre los hospedantes más importantes se citan: *Citrullus vulgaris*, *Solanum melongena*, *Arachis hypogaea*, *Cucumis sativus*, *Secale cereale*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Daucus carota*, entre otros (Van der Plaats-Niterink, 1981; Farr y Rossman, 2015). March *et al.* (2001) mencionan a *P. myriotylum* como uno de los agentes causales de la podredumbre de la vaina de *Arachis hypogaea* (maní) en la provincia de Córdoba, Argentina.

4.1.3.1 Cepa 15

Esta cepa fue aislada a partir de plantas de *Petroselinum crispum* (perejil) cultivadas a campo.

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de este aislamiento presentaron un porcentaje de identidad con la especie *P. myriotylum* de 99 y 100 % para cada locus, respectivamente (Tabla 2). A continuación, se detallan las características del aislamiento.

Entre sus estructuras, fue posible observar zoosporangios filamentosos lobulados, algunos digitados (Figura 25). Se formaron abundantes apresorios en la base y tapa de las placas de Petri (Figura 26), fácilmente distinguibles por su forma filamentososa, inflada, presentándose como racimos y con ápices globosos, coincidiendo con lo descrito por Van der Plaats-Niterink (1981). El micelio blanco, algodonoso, aéreo, desarrolló una colonia sin un patrón definido, cuya velocidad de crecimiento fue de 48 mm.día⁻¹ (Tabla 3).

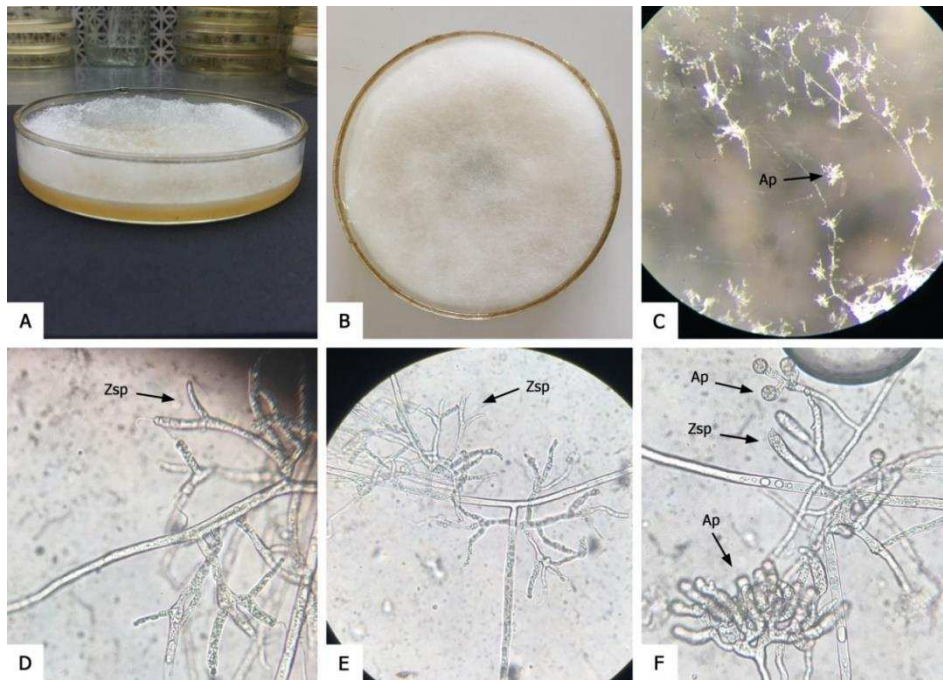


Figura 25. Características morfológicas de la cepa 15, identificada como *Pythium myriotylum*. A. Colonia en AV8. B. Colonia en APG. C. Apresorios (Ap) en tapa de placa de Petri. D-E. Zoosporangios (Zsp). F. Detalle de zoosporangios (Zsp) y apresorios (Ap).

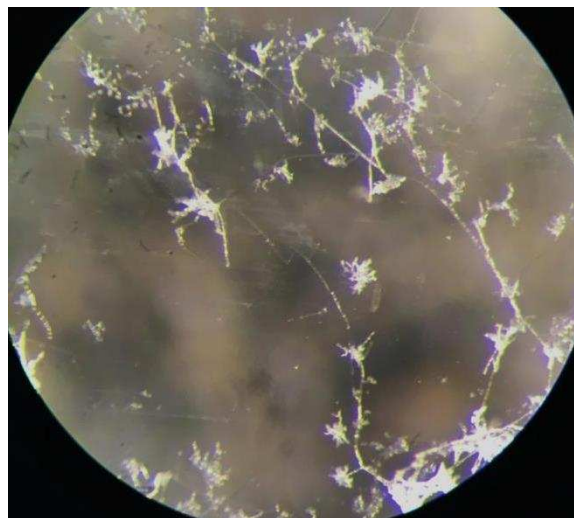


Figura 26. Detalle de apresorios formados en tapa de placa de Petri luego de 4 días de incubación.

Para comprobar la patogenicidad, se realizaron pruebas en plantas de perejil con herida en cuello, que mostraron síntomas de clorosis en hojas, podredumbre de raíces y necrosis en corona, a los 30 DDI (Figura 27). Los testigos sin inocular permanecieron sanos.



Figura 27. Prueba de patogenicidad en planta de perejil, inoculada con cepa 15, *Pythium myriotylum*, a los 30 DDI.

Stirling *et al.* (2009) describen a *P. myriotylum* en *Zingiber officinale* (jengibre) como un patógeno muy agresivo, mostrando síntomas en rizomas a los 7 DDI, y cuya patogenicidad se encuentra favorecida por altas temperaturas. Coincidentemente, la cepa de *P. myriotylum* estudiada en esta Tesis de Maestría fue obtenida en diciembre, cuando las temperaturas de suelo pueden superar los 30 °C. Gull *et al.* (2004) encontraron además a esta especie en sistemas de producción hidropónicos, y hacen referencia a la presencia de este patógeno en agua de riego.

Las características mencionadas indican que este patógeno podría desarrollarse y dispersarse fácilmente en Corrientes. Sin embargo, se ha encontrado una sola cita de *P. myriotylum* en Argentina, y hasta la fecha, según la revisión bibliográfica realizada, a nivel mundial no ha sido descrita aún en *Petroselinum crispum*.

4.1.4 Aislamientos identificados como *Pythium spinosum* Sawada

Pythium spinosum Sawada 1926

Sinónimo: *Globisporangium spinosum* (Sawada) Uzuhashi, Tojo y Kakishima (2010).

Esta especie fue descrita por primera vez en 1926 por Sawada causando damping-off en plantines de *Anthriscum majus* (conejito) en Taiwán. Posteriormente, fue descrita por Sawada y Chen en hospedantes como: *Allium fistulosum*, *Calendula officinalis*, *Chrysanthemum coronarium*, *Coriandrum sativum*, *Cucumis sativus*, *Daucus carota*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongena*, entre otros (Van der Plaats-Niterink, 1981). En Argentina fue citada por primera vez en 1954 por Frezzi como causante de damping-off en *Gypsophila* sp. y *Solanum melongena*. Según Farr y Rossman (2015), existen 82 relaciones *Pythium spinosum*-hospedantes citadas en el mundo, incluyendo a: *Capsicum annuum*, *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cucurbita* spp., *Cucumis melo*, entre otras.

4.1.4.1 Cepa 9

La cepa 9 es la única representante de esta especie dentro de la colección sobre la cual se trabajó en esta Tesis de Maestría. Fue obtenida a partir de plantas de frutilla cultivadas a campo con síntomas de necrosis del tejido radical.

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de este aislamiento presentaron un porcentaje de identidad de 99 % con la especie mencionada (Tabla 2). A continuación, se detallan las características del aislamiento.

El crecimiento en placa de este aislamiento fue lento en un principio, pero al cabo de 72 horas logró cubrir por completo la placa de Petri, con una velocidad promedio de 30 mm.día⁻¹. La colonia blanca algodonosa, aérea, creció sin un patrón definido (Tabla 3).

Los oogonios esféricos, ornamentados fueron producidos en abundancia al cabo de 4 días de incubación (Figura 28), presentando un anteridio por oogonio (Figura 29). Los zoosporangios de forma esférica, subesférica y limoniformes fueron producidos cuantiosamente (Figura 30). No se registró producción de zoosporas, coincidentemente con Frezzi (1956), Robertson

(1980), Van der Plaats-Niterink (1981) y Palmucci (2015); pero se observó germinación directa de los zoosporangios.

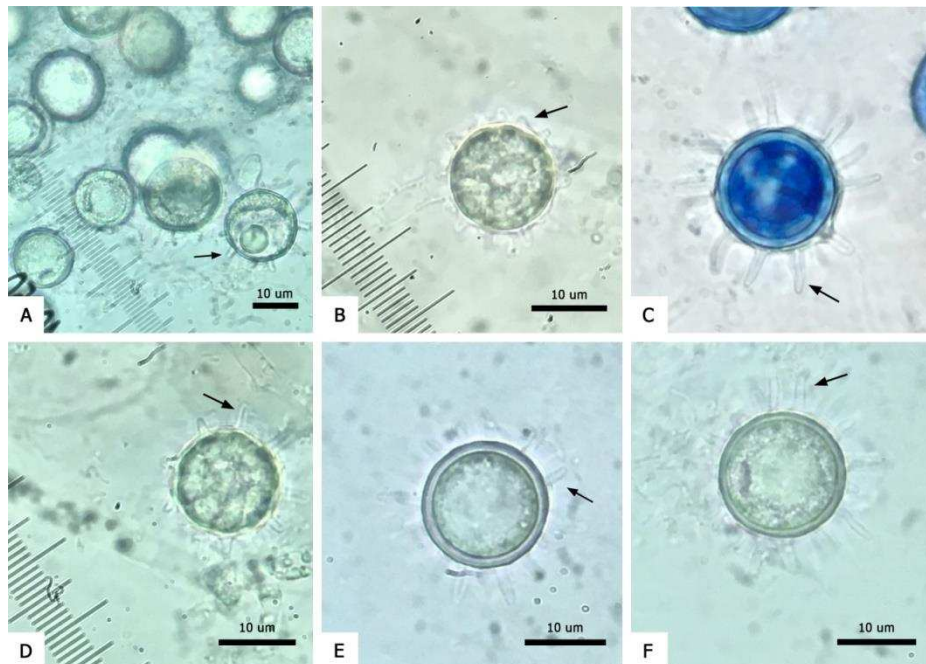


Figura 28. Detalles de oogonio y oosporas de *Pythium spinosum*, cepa 9. A, C, E, F. Oosporas con proyecciones digitadas (espinas) en la pared oogonial. B, D. Oogonio con proyecciones o espinas en la pared.



Figura 29. Oogonio (Oog) y anteridio (Ant) de *Pythium spinosum*, correspondiente al aislado 9.



Figura 30. Detalles de zoosporangios limoniformes delimitados por tabiques.

La prueba de patogenicidad fue realizada en plantas de frutilla, dando resultados positivos. Los testigos sin inocular se mantuvieron sanos.

Esta misma especie fue descrita en Argentina por Meneguzzi *et al.* (2011), causando podredumbre de raíces de frutilla junto con *P. ultimum* Trow en la provincia de Tucumán. Por otro lado, Gull *et al.* (2004) menciona a esta especie en sistemas de producción hidropónicos, provocando podredumbre de raíces en pepino, lo que indica que se encuentra presente en diferentes sistemas de producción. A pesar de que a nivel mundial *P. spinosum* es una especie frecuentemente encontrada provocando daños en diversos cultivos bajo distintos sistemas de producción, en Argentina solo ha sido descrita en cinco cultivos (*Gypsophila* sp., *Solanum melongena*, *Arachis hypogaea*, *Hebe* sp. y *Fragaria x ananassa*), y en esta Tesis de Maestría solo se ha recuperado un ejemplar de la misma.

4.1.5 Aislamientos identificados como *Phytopythium helicoides* Drechsler

Phytopythium helicoides Drechsler (1930)

Sinónimos: *Phytopythium helicoides* (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque (2014), *Ovatisporangium helicoides* (Drechsler) Uzuhashi, Tojo y Kakish. (2010), *Phytophthora fagopyri* S. Takim. ex S. Ito y Tokun. (1935), *Pythium helicoides* Drechsler (1930).

Anteriormente, esta especie estaba clasificada dentro del género *Pythium*. Sin embargo, debido a nuevos estudios morfológicos, moleculares y filogenéticos, las especies de *Pythium* pertenecientes al clado K pasaron a agruparse dentro del género *Phytopythium* (de Cock *et al.*, 2015).

Esta especie fue descrita por primera vez por Drechsler, afectando a *Dahlia* en 1930 en EEUU. Posteriormente, se la encontró en distintas partes del mundo infectando hospedantes de importancia económica como: *Citrullus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Spinacea oleracea*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Pinus ellioti*, *Gossypium* sp.; y en algunas ornamentales como: *Ilex* sp., *Azalea* sp., *Hibiscus* sp., entre otras (Van der Plaats-Niterink, 1981). En Argentina, fue descrita por Grijalba *et al.* en el 2014, causando podredumbre de raíces en *Glycine max* (soja).

4.1.5.1 Cepa 16

Este aislado fue obtenido de plantas de *Chrysanthemum* sp. (crisantemo) cultivadas en suelo en invernáculo. Se observó la sintomatología típica de damping-off en plantas jóvenes de almácigos (Figura 31).



Figura 31. Almacigo de crisantemo con porciones sin plantas debido a la muerte causada por *Phytopythium helicoides*, aislado 16.

El crecimiento en medio AV8 y APG fue rápido, 45 mm.día⁻¹, generando una colonia con abundante micelio blanco, aéreo, con un leve patrón radiado (Tabla 3, Figura 32). En los medios de cultivo empleados, no fue posible observar caracteres morfológicos distintivos de la especie, por lo cual su identificación se realizó a partir de estudios moleculares. Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de este aislamiento presentaron un porcentaje de identidad de 99 y 78 % para cada locus, respectivamente (Tabla 2).



Figura 32. Colonia de *Phytophthora helicoides*, en medio AV8.

La prueba de patogenicidad se practicó en plantas de crisantemo, las cuales exhibieron síntomas de damping-off a los 25 DDI, como se muestra en la Figura 33. El patógeno fue reaislado de las plantas enfermas, aunque nuevamente, no pudieron observarse estructuras morfológicas distintivas de la especie.



Figura 33. Prueba de patogenicidad en *Chrysanthemum* sp. inoculado con cepa 16, exhibiendo síntomas de damping-off, 25 DDI.

Kageyama *et al.* (2002) describe a *P. helicoides* causando podredumbre de raíces de *Rosa hybrida* (rosa miniatura) durante los meses más cálidos del año en Japón. En 2014, Ishiguro *et al.* menciona a *Phytopythium helicoides* como agente causal de la podredumbre de raíz y corona de *Fragaria x ananassa* en Japón, cuya incidencia había sido registrada también en verano, durante la etapa de vivero. Además, hace referencia al incremento de la incidencia de este patógeno en las zonas más cálidas de Japón, ya que en los últimos años ha sido encontrado en numerosos cultivos (i.e. begonia, rosa, kalanchoe, poinsetia, entre otras). Más recientemente, Choudhary *et al.* (2016) aisló a esta especie a partir de agua de tanques de irrigación de invernaderos en cuales se producen crisantemo y poinsetia en Pensilvania, EEUU, pero no describe esta relación patógeno-hospedante.

Como fue previamente mencionado, esta especie ha sido citada en Argentina afectando soja, pero no ha sido documentada infectando crisantemo. Según la revisión bibliográfica realizada en esta Tesis de Maestría, no existen registros de *Phytopythium helicoides* como patógeno de *Chrysanthemum* sp.

En base a lo expuesto anteriormente, *P. helicoides* es una especie que podría desarrollarse fácilmente en la provincia de Corrientes debido a las condiciones climáticas de la zona, por lo que resulta de gran importancia su correcta identificación y control.

4.1.6 Aislamientos identificados como *Phytophthora mercuriale* (Belbahri, B. Paul y Lefort) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque

Phytophthora mercuriale (Belbahri, B. Paul y Lefort) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque (2014)

Sinónimos: *Pythium mercuriale* Belbahri, B. Paul y Lefort 2008, *Ovatisporangium mercuriale* (Belbahri, B. Paul y Lefort) Uzuhashi, Tojo y Kakish. 2010.

Fue descrita por primera vez en Sudáfrica en la rizósfera de *Macadamia integrifolia* (nuez de macadamia). Posteriormente se la encontró en plantines de *Glicine max* (soja) (Farr y Rossman, 2015). Recientemente se la encontró provocando gomosis en *Citrus* sp. en Tunes (Benfradj *et al.*, 2017).

4.1.6.1 Cepa 31

Este aislamiento fue obtenido a partir de plantas de frutilla cultivadas a campo, las cuales presentaron podredumbre de corona (Figura 34).



Figura 34. Sintomatología y colonia de *Phytophthora mercuriale*, cepa 31 en plantas de frutilla. A. Planta de frutilla a campo con síntomas de marchitez causada por *P. mercuriale*. B. Podredumbre de corona de frutilla vista en corte longitudinal. C. Colonia de *Phytophthora mercuriale* correspondiente a la cepa 31, en APG, obtenida a partir de tejido necrosado de corona de frutilla.

La secuencia de la región ITS del rDNA de este aislamiento presentó un porcentaje de identidad de 91 % con *Phytophthora mercuriale* (Tabla 2).

Esta cepa desarrolló una colonia arrosetada (Figura 34) con escaso micelio aéreo, de color blanco, cuya velocidad de crecimiento fue de 22,5 mm.día⁻¹ (Tabla 3). Se observaron zoosporangios ovoides a globosos, papilados, los cuales fueron capaces de germinar como conidios. Las estructuras de reproducción sexual fueron escasamente producidas, observándose oogonios esféricos de pared lisa, que se encontraban rodeados por anteridios (Figura 35, Tabla 3), coincidentemente con la descripción de Belbahri *et al.* (2008).

La prueba de patogenicidad se realizó en plantas de frutilla, las cuales mostraron síntomas de podredumbre de corona a los 8 DDI. Los testigos, sin inocular permanecieron sanos. Es importante destacar la velocidad con la que este patógeno causó enfermedad en las plantas inoculadas, lo que demuestra la agresividad del mismo.

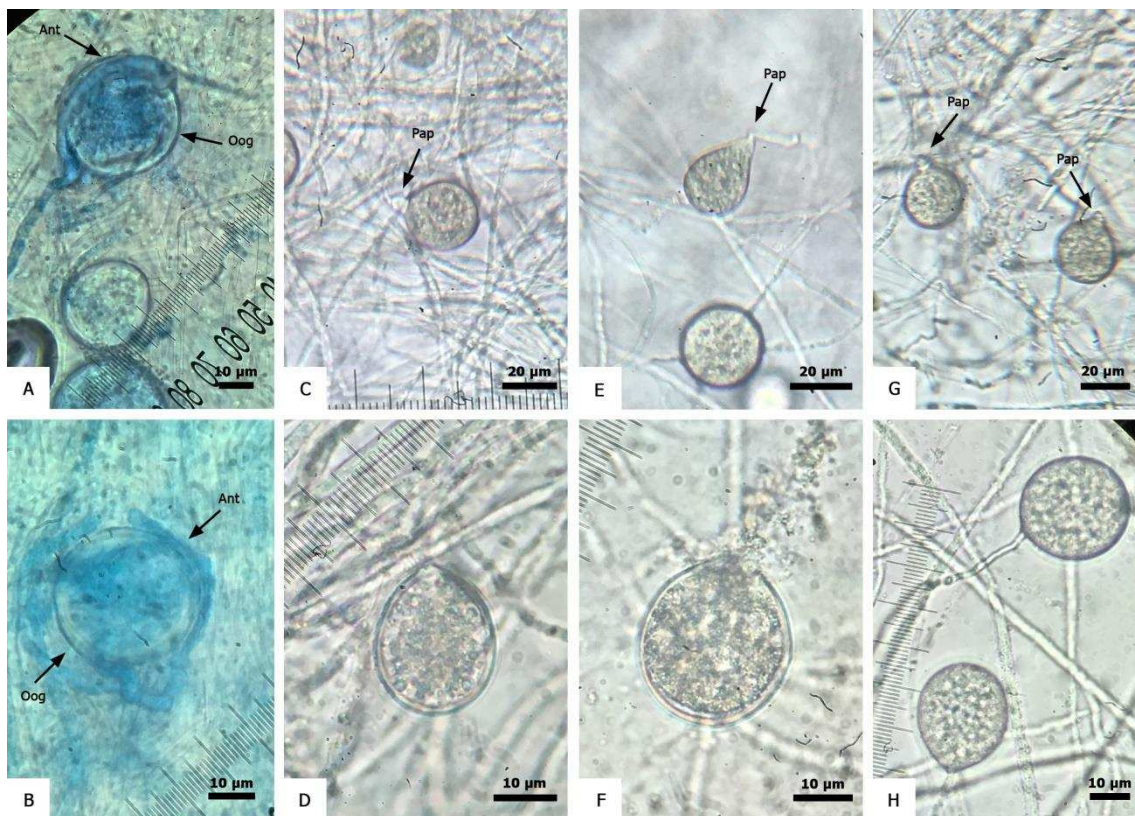


Figura 35. Características morfológicas de *Phytophthora mercuriale*, cepa 31. A-B. Oogonio (Oog) y anteridio (Ant). C-H. Zoosporangios ovoides. G. Zoosporangios globosos con detalle de papila (Pap).

Yang y Hong (2016) encontraron a esta especie en sedimentos de un reservorio de agua de uso agrícola en EE.UU, y en agua del mismo reservorio. La cita más reciente refiere a gomosis en *Citrus* sp. provocada por *Phytophthora mercuriale* junto con *Phytophthora vexans* y tres especies de *Pythium* (Benfradj *et al.*, 2017). Hasta la fecha *Phytophthora mercuriale* no ha sido

descrita en Argentina, más aún, no ha sido posible encontrar registros de esta especie infectando a *Fragaria x ananassa* (frutilla) en el mundo, por lo que en nuestro conocimiento, este sería el primer reporte de *Phytopythium mercuriale* como patógeno de frutilla.

4.1.7 Aislamientos identificados como *Phytopythium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque

Phytopythium vexans (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi y Lévesque (2014)

Sinónimos: *Pythium vexans* de Bary 1876; *Ovatisporangium vexans* (de Bary) Uzuhashi, Tojo y Kakish. 2010; *Pythium allantocladon* Sideris 1932; *Pythium ascophallon* Sideris 1932; *Pythium complectens* H. Braun 1924; *Pythium euthyphyphon* Sideris 1932; *Pythium piperinum* Dastur 1935; *Pythium polycladon* Sideris 1932.

Esta especie fue descrita originalmente por De Bary en 1876 en tubérculos de *Solanum tuberosum* (papa). Posteriormente, en 1932, fue descrita en *Ananas sativus* (ananá) en Hawaii, siendo reportada en más de 40 hospedantes diferentes en Alemania, Francia, Estados Unidos de América, Inglaterra, Holanda, Malasia, Uganda, entre otros. Según Farr y Rossman (2015), existen 119 combinaciones *Pythium vexans*-hospedante, muchas de ellas de gran importancia económica, destacándose los siguientes: *Citrus sinensis*, *Carica papaya*, *Cocos nucifera*, *Malus domestica*, *Manihot esculenta*, *Musa* sp., *Pinus* spp., *Piper* spp., *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Saccharum officinarum*, *Theobroma cacao*, *Triticum aestivum*, *Vitis vinifera*, *Zea mays*, entre otras.

En Argentina, *Phytopythium vexans* fue encontrada en: *Begonia* sp. (begonia), *Begonia rex*, *Celosia cristata* (cresta de gallo), *Celosia plumosa*, *Citrullus lanatus* (sandía), *Dianthus chinensis* (clavel chino), *Eucaliptus teretiformis* (eucalipto) en la provincia de Córdoba, y *Piptademia rigida* (anchico colorado) en la provincia de Misiones (Frezzi, 1956).

4.1.7.1 Cepa 30

Este aislamiento fue obtenido a partir de plantas de frutilla cultivadas a campo, las cuales presentaron podredumbre de corona (Figura 36).



Figura 36. Planta de frutilla exhibiendo podredumbre de corona causada por *Phytopythium vexans*, cepa 30.

La secuencia de la región ITS del rDNA de este aislamiento presentó un porcentaje de identidad de 96 % con *Phytopythium vexans* (Tabla 2).

Este aislamiento desarrolló una colonia con patrón estrellado, escaso micelio aéreo, de color castaño claro en el centro y blanquecino en sus márgenes, cuya velocidad de crecimiento fue de $22,5 \text{ mm.dia}^{-1}$ (Tabla 3). Se observaron zoosporangios esféricos a ovoides, terminales e intercalares los cuales fueron capaces de producir vesículas y zoosporas (Tabla 3, Figuras 37 y 38). Este aislamiento no produjo estructuras de reproducción sexual.



Figura 37. Características morfológicas de *Phytophthora vexans*, cepa 30. A. Colonia estrellada de *P. vexans* en APG. B-C. Zoosporangios papilados germinando. D. Zoosporangio intercalar. E-F. Detalles de zoosporangios (Zoosp) emitiendo tubo de descarga (Td) y vesícula (V) formados después de 20 días de incubación en agua destilada, correspondientes a la cepa 30.



Figura 38. Detalle de liberación de zoosporas de *Phytophthora vexans*, cepa 30. Zoosporangio (Zoosp) con tubo de descarga (Td) y vesícula (V) liberando zoosporas al medio.

La prueba de patogenicidad se realizó en plantas de frutilla, las cuales mostraron síntomas de podredumbre de corona a los 6 DDI. Los testigos, sin inocular permanecieron sanos. La velocidad con la que este patógeno causó enfermedad en las plantas inoculadas, demuestra la agresividad del mismo.

Phytophthora vexans es una especie ampliamente distribuida a nivel mundial, afectando a más de 119 hospedantes de múltiples familias botánicas, causando una gran variedad de síntomas: podredumbre de raíces y corona, damping-off, canchros en tallo, marchitamiento, entre otros (Farr y Rossman, 2015). Frezzi (1956) describió a esta especie provocando enfermedad tanto

en plantas jóvenes como adultas, con una gran agresividad, produciendo la muerte de las mismas, al igual que la cepa 30, la cual provocó la muerte de plantas adultas de frutilla en tan solo 6 días. Zeng *et al.* (2005) describió además a *Phytophthora vexans* en árboles de *Hevea brasiliensis* (caucho), causando canchales en el fuste y Rodríguez-Padrón *et al.* (2018) encontró esta especie provocando daños en raíces y tallos de *Persea americana* (palto). Es importante mencionar este tipo de daños, debido a que resalta la capacidad infectiva y destructiva que posee *P. vexans*, siendo capaz de provocar daños tanto en plantas herbáceas como leñosas, al igual que la cepa 30, la cual produjo podredumbre de corona de plantas de frutilla adultas. Sin una correcta identificación, las pérdidas producidas por este tipo de patógenos serían considerables.

Hasta la fecha, no se ha reportado a este patógeno como agente causal de podredumbre de corona de frutilla en Argentina.

4.1.8 Aislamientos identificados como *Phytophthora cactorum* (Lebert y Cohn) Schröeter

Phytophthora cactorum (Lebert and Cohn) Schröeter (1886)

Sinónimos: *Peronospora cactorum* Leb. y Cohn (1870), *Peronospora sempervivi* Schenk (1875), *Phytophthora fagi* (Hartig) Hartig (1876, 1880), *Phytophthora omnivora* de Bary (1881), *Phloeophthora cactorum* (Leb. y Cohn) G. W. Wilson (1907), *Nozemia cactorum* (Leb. y Cohn) Pethybridge (1913), *Phytophthora pini* Leonian (1925), *Phytophthora paeoniae* Cooper y Porter (1928).

El primer reporte de esta especie fue en cactáceas, *Cereus giganteus* Engelm y *Melocactus nigrotomentosus*, en Checoslovaquia, por Lebert y Cohn en 1870, quienes la llamaron *Peronospora cactorum* (Erwin y Ribeiro, 1996). Posteriormente, en 1886, Schröeter la incluyó en el género *Phytophthora* (Blackwell, 1943). En Argentina fue mencionada por primera vez en *Malus pumila* (manzano) por Lindquist en 1936. Un año más tarde, Fawcett y Bitancourt describen a *Phytophthora cactorum* en frutos de *Citrus limon* (limón), provocando podredumbre morena (Frezzi, 1950).

La podredumbre de corona (o colapso vascular) de la frutilla ha provocado grandes pérdidas económicas en países europeos desde 1960. Predomina en zonas de clima templado, pero también ha sido reportada en países de clima subtropical. Esta enfermedad, inicialmente produce un marchitamiento repentino de hojas jóvenes, seguido por un colapso de la planta entera (Seemüller, 1984).

Es patógena de más de 150 géneros y 60 familias botánicas. Los aislamientos de *Phytophthora cactorum* no suelen ser específicos de un hospedante, lo que implica que un mismo aislamiento puede infectar diferentes especies de plantas (Erwin y Riberiro, 1996). De hecho, Farr y Rossman (2015) nombran 523 relaciones *Phytophthora cactorum*-hospedante en la base de datos *Fungal database*.

4.1.8.1 Cepas 12, 18 y 28

Estas cepas, identificadas como *Phytophthora cactorum*, fueron aisladas a partir de plantas de frutilla cultivadas a campo, las cuales exhibían lesiones en la corona (Figura 39).



Figura 39. Detalle de corona de frutilla con lesiones causadas por *Phytophthora cactorum* (cepa 12).

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de la cepa 12 presentaron un porcentaje de identidad con la especie *P. cactorum* de 99 y 100 % respectivamente (Tabla 2). Las secuencias de la región ITS del rDNA de las cepas 18 y 28 arrojaron un porcentaje de identidad de 100 % con *P. cactorum*. A continuación, se detallan las características morfológicas de los aislamientos.

El crecimiento en placa de esta especie fue lento, de tan solo 9 mm.día⁻¹. En APG desarrolló una colonia blanca, compacta, algo radiada, sin bordes definidos, con micelio nudoso (Tabla 3, Figura 40). Creció escasamente a 30 °C ± 2 °C, por lo que se la incubó a temperatura ambiente (24 °C ± 2 °C). Esto sucedió debido a que la temperatura máxima de crecimiento de esta especie es de 30 °C, y la óptima de 25 °C (Waterhouse, 1963).



Figura 40. Colonia de *Phytophthora cactorum* (cepa 12) en APG.

De acuerdo a la morfología, la especie *P. cactorum* corresponde al grupo I (Waterhouse, 1963). Se observaron zoosporangios papilados, ovoides, caducos con pedicelo corto (Tabla 3, Figura 41). Esta especie es homotática, por lo que fue posible encontrar estructuras sexuales en los medios de cultivo utilizados. Se observó gran cantidad de oogonios con anteridios paráginos y oosporas (Tabla 3, Figura 42). Estas últimas son capaces de sobrevivir en el suelo, soportando bajas temperaturas (hasta $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por algunas horas). Posteriormente germinan dando lugar a zoosporangios, quienes a su vez, pueden volver a germinar, para infectar así a un nuevo hospedante, o bien producir zoosporas e infectar tejido vegetal (Fernandez Valiela, 1978). Las estructuras de los aislamientos caracterizados se encuentran dentro del rango determinado por Frezzi (1950) y Waterhouse (1963) para la especie *P. cactorum*.



Figura 41. Zoosporangios de *Phytophthora cactorum*, cepa 12 (Bar = 10 μm).

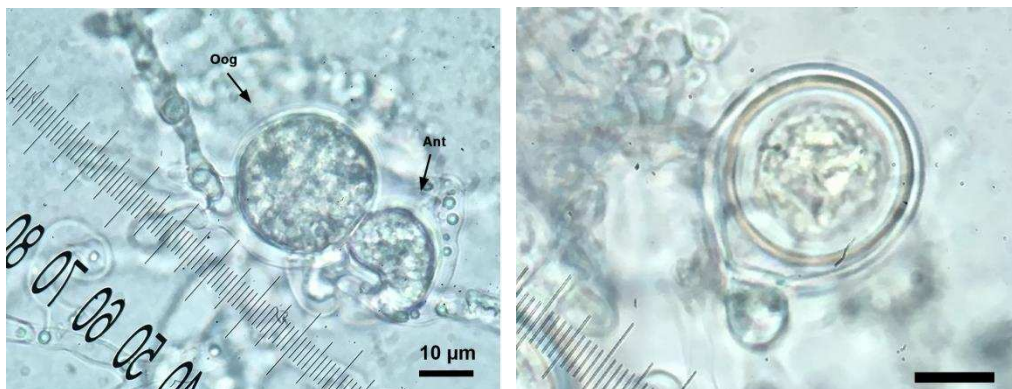


Figura 42. Izquierda: Oogonio (Oog) y anteridio parágino (Ant) de *Phytophthora cactorum*, cepa 12. Derecha: Oospora dentro de oogonio (Bar = 10 μm).

Para comprobar la patogenicidad de los tres aislamientos, se inocularon plantas de frutilla, obteniendo síntomas similares a los observados durante la recolección de las plantas enfermas por estas cepas. En la Figura 43 se muestran los síntomas producidos por el aislado 12. Cabe destacar que las plantas testigo sin inocular permanecieron sanas.



Figura 43. Prueba de patogenicidad en planta de frutilla inoculada con *P. cactorum*, cepa 12. Izquierda: Detalle de hojas basales necróticas. Derecha: podredumbre de corona, vista en corte longitudinal.

Este patógeno posee un amplio rango de hospedantes, siendo capaz de provocar enfermedad tanto en plantas herbáceas como en leñosas. Colombo *et al.* (2011) describió a *P. cactorum* como agente causal de la muerte de plantas de *Eucalyptus grandis* de un año y medio de edad, las cuales presentaban muerte descendente de ramas, raíces de aspecto corchoso y desprendimiento de corteza exterior. Por otro lado, Hantula *et al.* (2000), mencionó que existen diferencias genotípicas entre cepas de *P. cactorum* provenientes de diferentes hospedantes, y, además, algunas cepas provocan síntomas más severos en sus hospedantes originales que en otros. En esta Tesis de Maestría se corrobora este hecho, ya que según los análisis moleculares realizados, las cepas de *P. cactorum* aisladas a partir de plantas de frutilla son morfológica y genotípicamente iguales (Figura 63).

Iribarren *et al.* (2012) mencionó la presencia y la capacidad de supervivencia de *P. cactorum* en suelo, a profundidades de hasta 30 cm, y explica la inefectividad de la solarización para erradicar esta especie, debido a que las temperaturas alcanzadas a esa profundidad no son suficientes para eliminar las oosporas, menos aún con la labranza del suelo, práctica que traslada estas estructuras hacia el interior del perfil. En la investigación realizada por Juárez-Palacios *et al.* (1991) las oosporas de *P. cactorum* no sobrevivieron cuando fueron expuestas a temperaturas de 45 °C durante 30 minutos, pero sí lo hicieron cuando la duración de ese tratamiento fue de solo 20 minutos. Este resultado explica la persistencia de inóculo en suelo,

dado que durante el proceso de solarización muchas veces, las temperaturas alcanzadas son menores a 45 °C o si alcanzan esos valores, no los mantienen por más de 20 minutos. Por esta razón es sustancial acompañar a estas prácticas de desinfección de suelos con una correcta aplicación de fungicidas y manejo del riego para evitar la diseminación y supervivencia de este patógeno.

Phytophthora cactorum es frecuentemente encontrada en Corrientes en los meses de otoño-invierno, durante la implantación del cultivo de frutilla, ya que se presentan las condiciones predisponentes para la infección. Es un momento en el cual las plantas sufren estrés debido al trasplante, por lo que se encuentran más susceptibles, las temperaturas son óptimas para el desarrollo del patógeno, por lo que existen altas probabilidades de desarrollo de la enfermedad. Además, posee un amplio rango de temperatura (desde 2 °C hasta 30 °C) en el cual puede desarrollarse (Waterhouse, 1963), por lo que también es posible encontrarla provocando daños en distintas épocas del año. Aquí radica la importancia de esta especie en el cultivo y en la provincia.

4.1.9 Aislamientos identificados como *Phytophthora capsici* Leonian

Phytophthora capsici Leonian (1922)

Sinónimos: *Phytophthora hydrophila* Curzi (1927), *Phytophthora parasitica* var *capsici* (Leonian) Sarejanni (1936), *Phytophthora palmivora* MF4 Griffin (1977).

Leonian describió por primera vez a esta especie como patógena de *Capsicum annum* (pimiento) proveniente de Nuevo México, Estados Unidos en el año 1922. Posteriormente, Kreutzer, en 1940 la encontró en *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum melongena* (berenjena), *Cucumis melo* (melón) y *Citrullus vulgaris* (sandía) (Tompkins y Tucker, 1941). Durante ese año, Godoy cita a *P. capsici* en pimiento en Argentina; apareciendo luego, causando damping-off en tomate en 1948 (Frezzi, 1950). Farr y Rossman (2015) nombran en *Fungal Databases*, 94 relaciones *Phytophthora capsici*-hospedante, entre ellos se destacan los hospedantes: *Citrullus* spp., *Citrus* spp., *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Daucus carota*, *Fragaria x ananassa*, *Malus pumila*, *Solanum melongena*, *Theobroma cacao*.

Según Erwin y Ribeiro (1996), esta especie produce zoosporangios de gran tamaño (35-138 μm x 20-81 μm ; largo x ancho), de forma subesférica, ovoide, elipsoide, irregular o piriformes, papilados, caducos, con pedicelo largo. Las clamidosporas poseen un diámetro de 29 μm en promedio, y generalmente no son producidas en aislamientos provenientes de *Capsicum annum*. *Phytophthora capsici* es una especie heterotálica, por lo que no es posible observar estructuras sexuales. Según las características morfológicas, *P. capsici* pertenece al grupo II al igual que *P. nicotianae* (Waterhouse, 1963).

A continuación se describen los aislamientos que fueron identificados como *P. capsici* según el hospedante del que fueron aisladas.

4.1.9.1 Cepas 4 y 10

Estos aislados fueron obtenidos a partir de plantas de tomate cultivadas bajo invernáculo, las cuales presentaban manchas pardas en tallo, pecíolo y raquis de las hojas como se puede observar en la Figura 44.

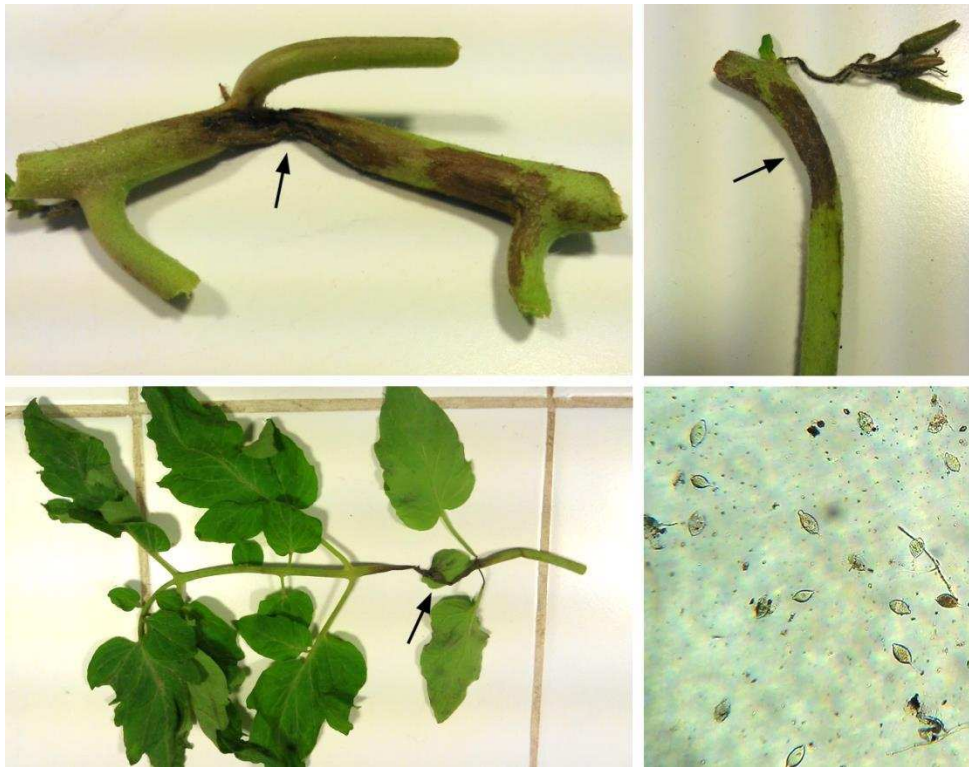


Figura 44. Detalle de tallo y hojas de planta de tomate con estrangulamiento y necrosis. Zoosporangios papilados observados en corte de ese tejido infectado, causado por *Phytophthora capsici*, aislado 4.

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de estos aislamientos presentaron un porcentaje de identidad entre 75 y 99% con *P. capsici* (Tabla 2). A continuación, se detallan las características morfológicas de los aislamientos.

Ambos aislados fueron cultivados en APG y AV8. La cepa 4 no mostró diferencias en velocidad de crecimiento para ninguno de los medios utilizados, siendo ésta de 16 mm.día^{-1} . Por el contrario, la cepa 10 creció a un ritmo de 12 mm.día^{-1} en APG (Tabla 3). En medio AV8, las colonias fueron similares, de color blanquecino, con escaso micelio aéreo, pero la cepa 10 exhibió una colonia un tanto más compacta y con bordes más definidos que la cepa 4 (Figura 45). En APG, el micelio se desarrolló más bien dentro del medio de cultivo que por encima del mismo.

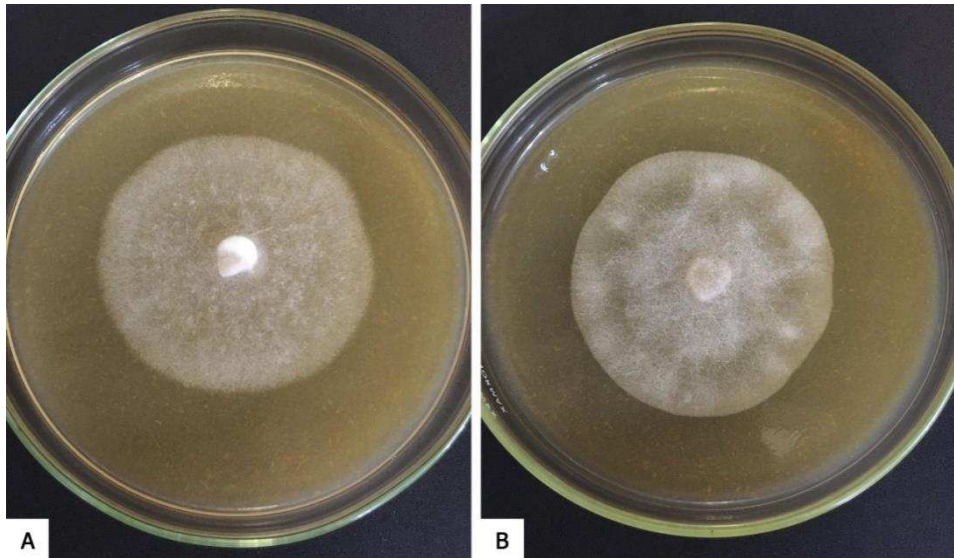


Figura 45. Colonias de *P. capsici* en medio AV8. A. Cepa 4. B. Cepa 10.

Los zoosporangios ovoides, papilados, caducos presentaron un tamaño promedio de 67,8 x 45,2 μm (Tabla 3). Se observaron zoosporangios irregulares en cultivos viejos, como se detalla en la Figura 46.

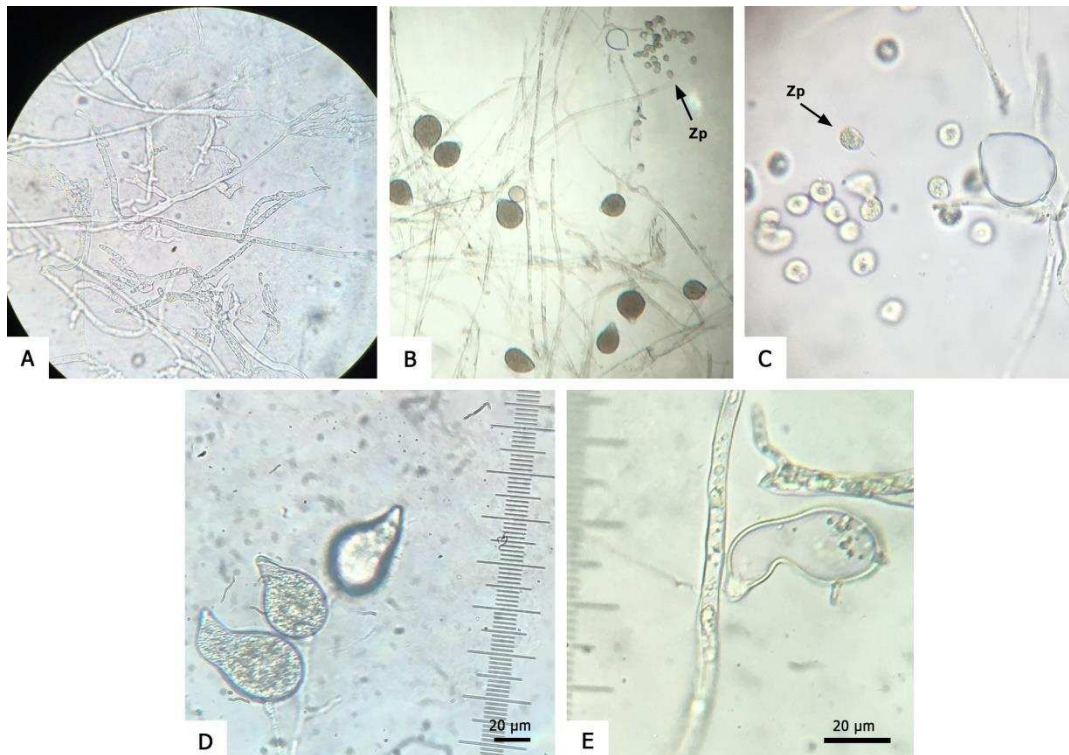


Figura 46. Características morfológicas de *Phytophthora capsici*, aislado 4. A. Detalle de micelio. B-C. Zoosporangio liberando zoosporas (Zp). D-E. Zoosporangios irregulares papilados.

Ambas cepas fueron inoculadas en plantas de tomate para comprobar su patogenicidad, dando resultados positivos a los 15 DDI (Figuras 47 y 48).



Figura 47. Prueba de patogenicidad de *Phytophthora capsici*, aislado 4. Izquierda: Plantas de tomate inoculadas con cepa 4 mostrando síntomas de marchitez a los 15 DDI. Derecha: Zoosporangios (Zsp) ovoide papilados (Pa) obtenidos en el reaislamiento.

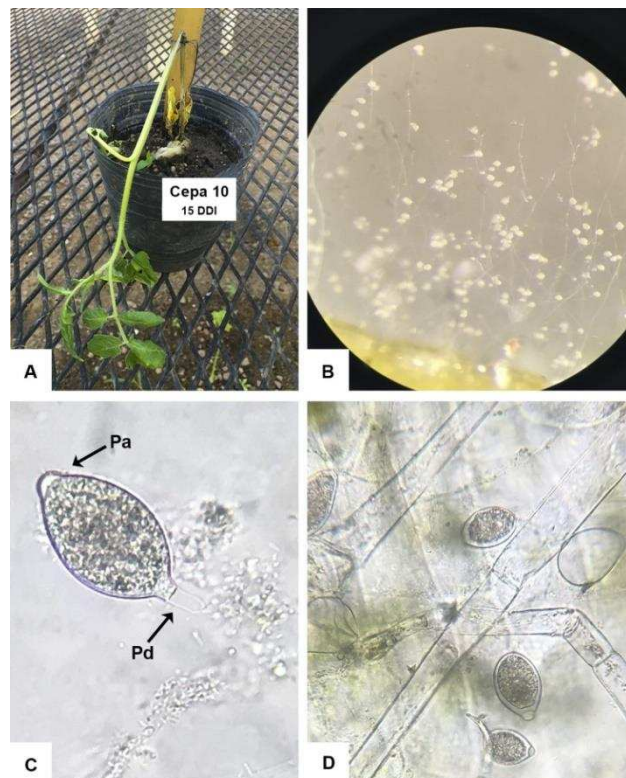


Figura 48. Prueba de patogenicidad de *Phytophthora capsici*, aislado 10. A. Planta de tomate muerta por *P. capsici*, aislado 10 a los 15 DDI. B. Detalle de tejido de planta inoculada con cepa 10, con gran cantidad de zoosporangios, visto en lupa. C-D. Zoosporangios elipsoides papilados, caducos, con detalle de pedicelo (Pd), encontrados en tejido de planta de tomate inoculada con cepa 10.

Se realizaron pruebas de patogenicidad cruzada con el aislado 10 en plantas de pimiento y berenjena. Al cabo de 15 DDI, los diferentes hospedantes exhibieron síntomas de marchitez (Figura 49). Se realizaron los aislamientos correspondientes, encontrando a *Phytophthora capsici* nuevamente como agente causal. Los testigos resultaron sanos.

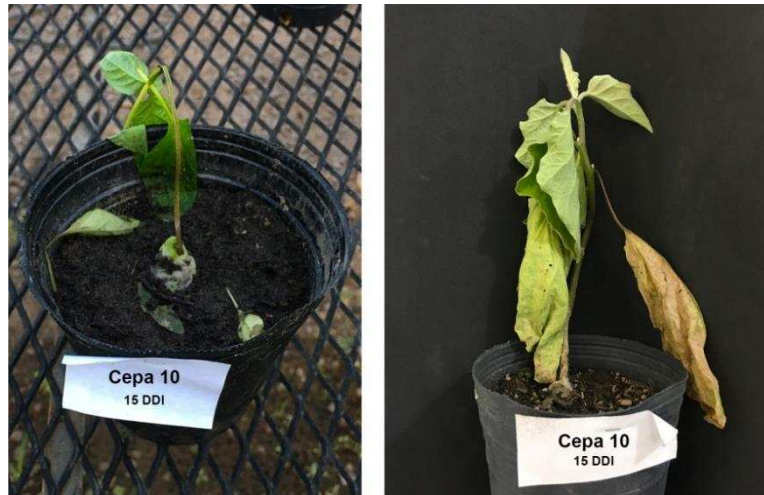


Figura 49. De izquierda a derecha, planta de pimiento y berenjena muertas a los 15 DDI por *Phytophthora capsici*, cepa 10.

P. capsici es un patógeno capaz de producir epidemias severas cuando las condiciones le son favorables. La habilidad de las oosporas para sobrevivir en suelo por largos períodos de tiempo y en fuentes de agua para riego son factores que incrementan las posibilidades de generación de epifitias por parte de este patógeno (Hausbeck y Lamour, 2004; Ristaino, 1991).

Hartman *et al.* (1991) mencionó por primera vez a *P. capsici* provocando daños en follaje de tomate e indicó que ciertas cepas que afectaban esos órganos, no eran capaces de producir podredumbre de cuello en plantas de tomate. Sin embargo, en las pruebas de patogenicidad realizadas en esta Tesis, ambas cepas (4 y 10) provocaron la muerte de las plantas de tomate, pimiento y berenjena al ser inoculadas en el cuello. Al respecto, Hausbeck y Lamour (2004) afirman que raíces de plantas de tomate infectadas con *P. capsici* pueden ser relativamente asintomáticas o presentar solo la detención del crecimiento de las plantas, pero bajo condiciones de precipitaciones intensas, este patógeno puede matar plantas adultas de tomate.

De Cara *et al.* (2009) no encontró evidencias de que exista especificidad patógeno-hospedante cuando se trata de *P. capsici*, a diferencia de lo que ocurre en la interacción específica de *P. nicotianae* en tomate; al igual que Boix Ruiz *et al.* (2017) quien estudió 81 aislados de *P. nicotianae*, y llegó a la conclusión de que esa especie es hospedante específica. En base a las pruebas de patogenicidad realizadas en esta Tesis, *P. capsici* aislada de plantas de tomate, no mostró especificidad con su hospedante de origen, ya que las inoculaciones en pimiento y berenjena dieron resultados positivos, confirmando los resultados de De Cara *et al.* (2009).

En base a los análisis moleculares realizados, las cepas provenientes de ambos hospedantes (tomate y pimiento) poseen secuencias similares, y a pesar de haber sido encontrados causando síntomas en diferentes órganos, todas fueron capaces de provocar muerte de plantas al ser inoculadas en cuello.

El desafío que los investigadores enfrentan es encontrar alternativas de manejo sustentables para el control de esta enfermedad. Quesada-Ocampo *et al.* (2016) evaluó la resistencia a *P. capsici* de plantas de tomate obtenidas por retrocruza de *Solanum lycopersicum* con *Solanum habrochaites*, siendo esta última especie resistente a diferentes aislamientos de ese patógeno. Satisfactoriamente, su investigación concluyó con el hallazgo de líneas resistentes a *P. capsici* con escasa transferencia de genes (introgresión) no deseables de la especie silvestre de tomate.

4.1.9.2 Cepa 8

Este aislamiento fue obtenido a partir de una planta de pimiento cultivada bajo invernáculo que presentaba síntomas de marchitez, lesiones pardas en tallo y manchas en hojas como puede observarse en la Figura 50.



Figura 50. Plantas de *Capsicum annuum* (pimiento) infectadas con *Phytophthora capsici*, cepa 8. Detalle de síntomas en hojas y tallo.

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de este aislamiento presentaron un porcentaje de identidad entre 99 y 79 % respectivamente con *P. capsici* (Tabla 2). A continuación, se detallan las características morfológicas del aislamiento.

El crecimiento en placa fue de 12 mm.día⁻¹, generando una colonia compacta de color blanco, con mayor cantidad de micelio aéreo en AV8 que en APG, teniendo en este último mayor crecimiento dentro del medio de cultivo (Tabla 3, Figura 51).

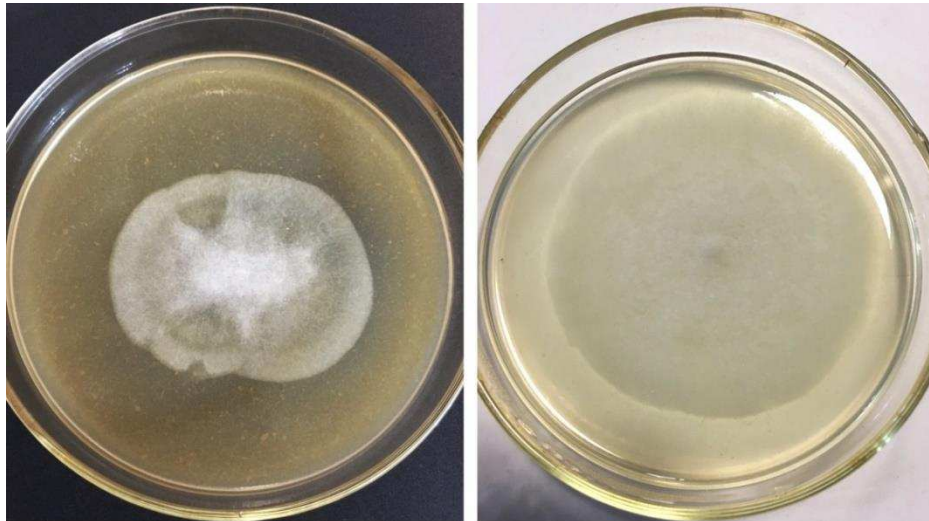


Figura 51. Colonia de cepa 8 en AV8 (izquierda) y en APG (derecha).

Se observó una gran cantidad de zoosporangios al cabo de 3 días de incubación en AA, los cuales presentaron en promedio 49,8 x 28,0 µm (Tabla 3, Figura 52).

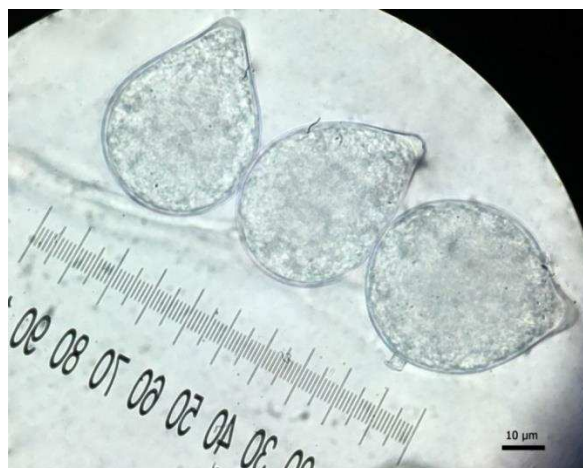


Figura 52. Zoosporangios ovoides - obpiriformes papilados de *Phytophthora capsici*, aislado 8.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de pimiento y berenjena, mostrando síntomas a los 15 DDI. El patógeno reaislado de estas plantas fue identificado como

Phytophthora capsici, encontrándose estructuras típicas de la especie en el tejido infectado (Figura 53). Los testigos sin inocular no mostraron síntomas. Erwin y Ribeiro (1996) indican que la muerte de plantines provocada por este patógeno puede ser mucho más rápida y darse en tan solo 5 días.

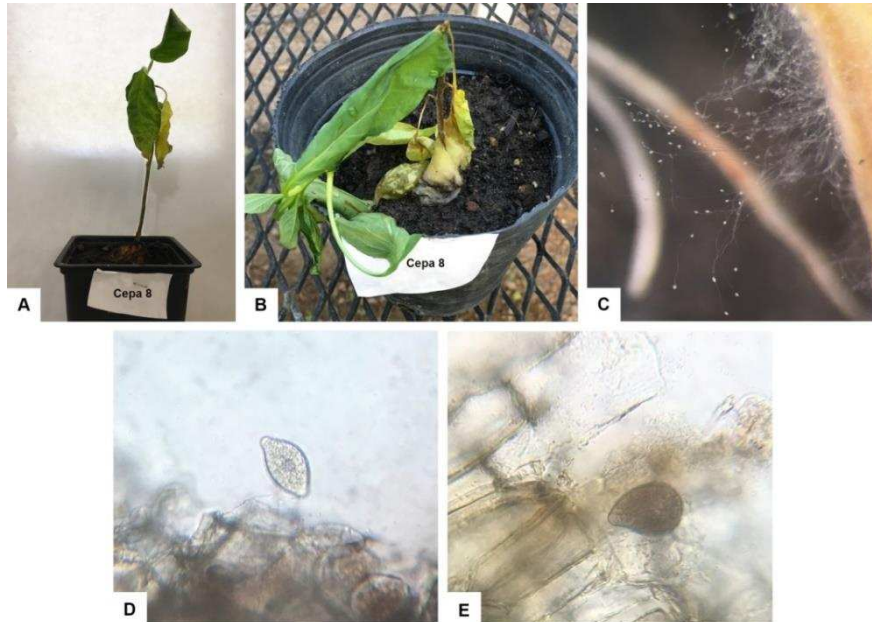


Figura 53. Prueba de patogenicidad de *P. capsici*, aislado 8. A-B. Planta de berenjena (A) y pimiento (B) inoculadas con cepa 8, con síntomas de marchitez, a los 15 DDI. C. Detalle, en lupa, de micelio y zoosporangios en tejido infectado con la cepa 8. D-E. Zoosporangios elipsoide (D), ovoide (E) papilados, en tejido.

Tompkins y Tucker (1941) describieron la podredumbre de raíces de pimiento y calabaza causada por *P. capsici*; inocularon esos aislamientos en tomate, berenjena y zapallo, llegando a la conclusión de que no existe especificidad en la relación *P. capsici*-hospedante. Este hecho coincide con los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad cruzada realizada en plantas de berenjena con la cepa 8, al igual que los presentados previamente para los aislamientos 4 y 10.

Han ocurrido epidemias severas de este patógeno en cultivos de pimiento a campo en distintas regiones de EEUU, donde las pérdidas fueron prácticamente totales (Black, 2003). Las precipitaciones y excesivos riegos son un factor clave en la dispersión y desarrollo de epidemias de este patógeno (Ristaino, 1991). En Corrientes, la producción de pimiento se realiza bajo cobertura plástica y con sistema de riego por goteo, por lo que este tipo de epidemias no ocurren; sin embargo es frecuente encontrar hileras enteras de plantas de pimiento muertas por *Phytophthora capsici*, donde los plásticos se han roto.

Numerosas investigaciones han sido llevadas a cabo para manejar esta enfermedad a través de cultivares resistentes (Oelke *et al.*, 2003; Foster y Hausbeck, 2010; Castro Rocha *et al.*, 2012; Babadoost *et al.*, 2015; Dunn y Smart, 2015; Gomez-Rodriguez *et al.*, 2017). Esta tarea se dificulta debido a que, según Oelke *et al.* (2003) existen razas fisiológicas de *P. capsici*. En su labor, aisló a este patógeno a partir de diferentes órganos de plantas de pimiento y al ser inoculadas en una serie de cultivares de ese mismo hospedante, observó virulencia diferencial. Además, Foster y Hausbeck (2010) determinaron que los frutos de pimiento son más susceptibles al ataque de *P. capsici* que las raíces, hojas o tallos.

La tendencia actual en el manejo de enfermedades reside en la disminución de la frecuencia de uso de agroquímicos, es por esto que a lo largo de los años se han realizado diferentes investigaciones en control biológico de *P. capsici* en pimiento. Ezziyyani *et al.* (2004), Bautista-Calles *et al.* (2014), entre otros han encontrado que es posible disminuir en cierta medida la incidencia de ese patógeno mediante la aplicación de microorganismos benéficos, pero deben ser parte de un plan de manejo integrado para evitar pérdidas económicas.

4.1.10 Aislamientos identificados como *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann

Phytophthora nicotianae Breda de Haan (1893)

Sinónimos: *Phytophthora melongenae* Sawada (1915), *Phytophthora allii* Swada (1915), *Phytophthora terrestris* Sherbakoff (1917), *Blepharospora terrestris* Sherbakoff Peyronel (1920), *Phytophthora parasitica* var. *rhei* Godfrey (1923), *Phytophthora jatrophae* Jensen (1923), *Phytophthora tabaci* Sawada (1927), *Phytophthora parasitica* var. *piperina* Dastur (1913), *Phytophthora formosana* Sawada (1942), *Phytophthora lycopersici* Sawada (1942), *Phytophthora ricini* Sawada (1942), *Phytophthora parasitica* var. *sesami* Kale and Prasad (1957), *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* Waterhouse y Waterston (1964), *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Dastur) G.M. Waterhouse (1963).

Esta especie fue descrita por primera vez en 1893 por Breda de Haan como patógeno de tabaco, pero aparentemente su cultivo se encontraba contaminado con una especie de *Pythium*, por lo que Ashby (1928) reemplazó el nombre *Phytophthora nicotianae* por *Phytophthora parasitica* Dastur (1913). En 1963, Waterhouse lo denomina nuevamente *P. nicotianae*, dando prioridad a la descripción de Breda de Haan. Esta nomenclatura no está mundialmente aceptada aún, por lo que es posible encontrar publicaciones en Estados Unidos con el nombre de *P. parasitica* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Según Farr y Rossman (2015), *Phytophthora nicotianae* se encuentra citada como patógena de 255 géneros de 90 familias de especies botánicas en todo el mundo. En Argentina fue descrita por primera vez en pie de naranjo en 1916 por Fawcett (Erwin y Ribeiro, 1996). Estudios posteriores revelaron la presencia de este patógeno en Argentina causando: Gomosis, podredumbre de pie y podredumbre morena de frutos en *Citrus* spp. y damping-off en *Cucumis melo*, *Fragaria* sp., *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena*, *Impatiens balsamina*, *Pinus halepensis*, entre otras (Frezzi, 1950).

Según las características morfológicas, *P. nicotianae* pertenece al grupo II, el cual se caracteriza por poseer anteridio anfígeno, zoosporangios papilados, ausencia de oosporas en cultivos puros (una sola cepa), entre otras características (Waterhouse, 1963).

En esta Tesis de Maestría dos aislamientos fueron identificados como *Phytophthora nicotianae*.

4.1.10.1 Cepa 3

Este aislado fue obtenido en julio de 2014, a partir de frutos de tomate cultivados bajo invernáculo, los cuales exhibían lesiones pardas con anillos concéntricos, que abarcaban gran parte de los frutos (Figura 54), tal como lo describe Blancard (2012), síntoma típico de esta especie de *Phytophthora* en tomate.



Figura 54. Fruto de tomate inmaduro con mancha parda con anillos concéntricos causada por *Phytophthora nicotianae*, aislado 3.

Las secuencias de los loci *cox2* e ITS de este aislamiento presentaron un porcentaje de identidad de 99 y 75 %, respectivamente con la especie *P. nicotianae* (Tabla 2). A continuación, se detallan las características morfológicas del aislamiento.

El crecimiento en placa de este aislamiento fue muy lento, 8 mm.día^{-1} , desarrollando una colonia blanquecina, chata, con escaso micelio aéreo (Tabla 3, Figura 55).



Figura 55. Colonia de *Phytophthora nicotianae*, correspondiente a la cepa 3, en medio APG en placa de Petri de 90 mm.

Con microscopio óptico, se observaron zoosporangios papilados, ovoides de 32,8 x 24,1 μm en promedio, persistentes, continuando adheridos al esporangióforo (Tabla 3, Figura 56). Este aislamiento presentó clamidosporas de 27,5 μm de diámetro en promedio (Tabla 3). *P. nicotianae* es mayormente heterotálica, sin embargo, ciertos aislamientos producen oogonios y oosporas cuando el inóculo es repicado de cultivos viejos (Tsao *et al.*, 1980; Brasier, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996). Curiosamente, la cepa 3 produjo oogonios de 21,2 μm con anteridios en posición anfígena de 10,3 μm como se observa en la Figura 57.

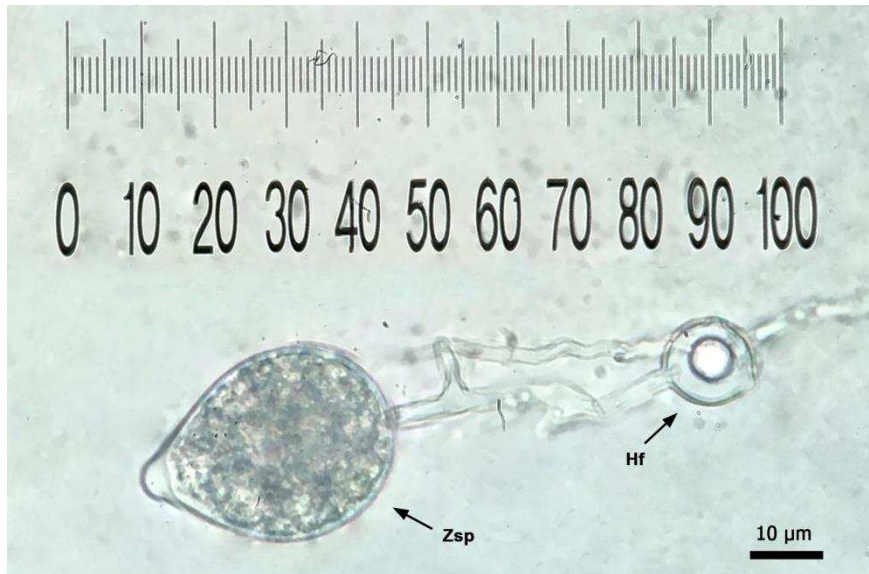


Figura 56. Zoosporangio ovoide papilado (Zsp) con presencia de hinchamiento hifal intercalar (Hf) en el esporangióforo (100x), visualizado en el aislamiento 3, *Phytophthora nicotianae*.



Figura 57. Características morfológicas de *Phytophthora nicotianae*, correspondiente al aislado 3. A. Zoosporangio papilado ovoide. B. Clamidospora terminal. C-D. Oogonios (Oog) con anteridios (Ant) en posición anfígena (Bar = 10 μm).

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en plantas de tomate, las cuales exhibieron síntomas de marchitez al cabo de 15 DDI (Figura 58). Se observaron secciones de tejido radical y del cuello de las plantas en microscopio óptico, logrando apreciar gran cantidad de zoosporangios típicos de esta especie. Los reaislamientos fueron positivos, comprobando la patogenicidad de esta cepa. Cabe aclarar que por cuestiones prácticas, las pruebas de patogenicidad se realizaron en plantas, no en frutos, ya que esta especie también es capaz de infectar a plantines en almácigos, base de tallos y raíces de plantas adultas (Blancard, 2012).



Figura 58. Prueba de patogenicidad en plantas de tomate inoculadas con *P. nicotianae*, cepa 3, mostrando síntomas de marchitez a los 15 DDI.

4.1.10.2 Cepa 26

Esta cepa fue obtenida a partir de plantas de tomate cultivadas bajo invernáculo, cuyas hojas mostraban estrangulamientos y necrosis en la zona del pecíolo y raquis; frutos con manchas marrones, en algunos abarcando casi la totalidad del mismo (Figuras 59-60).



Figura 59. Frutos de tomate con manchas pardas amplias, con anillos concéntricos, causadas por *Phytophthora nicotianae*, aislado 26.



Figura 60. Hoja de tomate con lesión parda y folíolos marchitos, causada por *Phytophthora nicotianae*, aislado 26.

La secuencia del locus *cox2* de este aislamiento presentó un porcentaje de identidad del 98 % con *P. nicotianae* (Tabla 2). A continuación, se detallan las características morfológicas de esta cepa.

El crecimiento en placa fue lento, al igual que la cepa 3, resultando en 9 mm.día⁻¹, formando una colonia blanca en APG, con escaso micelio aéreo tipo aracnoide (Tabla 3, Figura 61). Produjo zoosporangios papilados de 29,8 x 21,5 µm en promedio, y clamidosporas de 18,5 µm (Tabla 3).



Figura 61. Colonia de *Phytophthora nicotianae*, cepa 26 en APG vista desde arriba (izquierda); vista desde su base, donde se visualizan los márgenes con crecimiento aracnoide (derecha).

Se inocularon plantas de tomate en la zona del cuello para comprobar su patogenicidad, obteniendo síntomas a los 15 DDI (Figura 62). Los testigos sin inocular permanecieron sanos.



Figura 62. Prueba de patogenicidad del aislado 26. Izquierda: Plantas de tomate 1 DDI. Derecha: Plantas de tomate a los 15 DDI con síntomas de marchitez.

Este patógeno es capaz de afectar a un amplio rango de especies botánicas, de hecho es una de las especies de *Phytophthora* que presenta el mayor número de hospedantes, encontrándose más de 900 relaciones *P. nicotianae*-hospedante (Farr y Rossman, 2015), a pesar de la especificidad que presenta este patógeno con ciertas especies de plantas (De Cara

et al., 2009; Boix Ruiz *et al.*, 2017). Diversos investigadores (De Cara *et al.*, 2009; Chowdappa *et al.*, 2016; Boix Ruiz *et al.*, 2017) han comprobado la especificidad de *P. nicotianae* con tomate, inoculando a estas y a plantas de pimiento con diferentes aislados de *P. nicotianae*, resultando menos patógena en el segundo hospedante, por lo que concluyeron que ese patógeno posee especificidad con tomate. Cabe resaltar que Chowdappa *et al.* (2016) también encontró especificidad de este patógeno en plantas de berenjena (*Solanum melongena*) y esponja vegetal (*Luffa acutangula*), siendo esta última una cucurbitácea, a diferencia del resto de los hospedantes mencionados los cuales pertenecen a la familia de las solanáceas.

Vaillant Flores y Gómez Izaquirre (2009) en su evaluación de incidencia y distribución geográfica de *P. infestans* y *P. nicotianae* en Cuba, encontraron que el número de hospedantes de la segunda especie había aumentado en los últimos años, afectando en mayor medida a cultivos de gran interés económico como la papa, tomate, tabaco, ananá y ornamentales. Este hecho probablemente esté relacionado con la habilidad de *P. nicotianae* para hibridarse con otras especies como *P. cactorum* (Man In't Veld *et al.*, 1998) o *P. capsici* (Ersek y Schoelz, 1995), lo que posibilitaría ampliar su rango de hospedantes (Ersek y Schoelz, 1995; Panabières *et al.*, 2016).

Entre los síntomas que provoca se destacan la podredumbre de corona y de raíces, pero también puede infectar hojas, frutos y producir damping-off (Blancard, 2012; Farr y Rossman, 2015). Posee además una asombrosa capacidad para subsistir en suelo, tejido vegetal y cursos de agua, hecho que se debe a la gran producción de oosporas y clamidosporas, las cuales son estructuras de resistencia que constituyen la fuente de inóculo para futuras infecciones (Panabières *et al.*, 2016).

En base a las características anteriormente explicadas, este patógeno es uno de los que mayor impacto productivo podría tener dentro de las especies identificadas en esta Tesis, aunque no haya sido el más frecuente, posee un potencial increíble para provocar daños importantes cuando las condiciones ambientales le son favorables.

4.2 Influencia de las condiciones climáticas presentes en la provincia de Corrientes sobre la prevalencia de las distintas especies de Pythiaceas identificadas

Las fechas de trasplante de los principales cultivos (tomate, pimiento) se extienden desde los primeros días de enero hasta los primeros de abril, exponiendo a los plantines a humedad y temperaturas elevadas, causándoles estrés. Esta situación genera un aumento de la susceptibilidad de las plantas al ataque de patógenos.

Al analizar las fechas de recolección de muestras, *Pythium* fue aislado en los meses más cálidos, mientras que algunas especies de *Phytophthora* en los más frescos. Esto es totalmente predecible, ya que las especies de *Pythium* encontradas en esta zona poseen requerimientos de temperaturas de 25-35 °C, expresando su mayor actividad y agresividad en verano. La prevalencia de *Pythium aphanidermatum* en los hospedantes estudiados se explica debido a que es un patógeno de zonas cálidas cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 °C y 40 °C (Van der Plaats-Niterink, 1981; Schroeder *et al.*, 2013). Por otro lado, *Pythium irregulare* posee una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C, por lo que no fue frecuente su aparición dentro de invernáculos (donde las temperaturas muchas veces superan los 30 °C), sino más bien en hospedantes cultivados a campo o en meses más frescos, dentro de invernaderos.

En el caso de *Phytophthora cactorum*, los meses de otoño-invierno les son más favorables, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C, por lo que esta especie fue recolectada en esa época. *Phytophthora capsici* crece vigorosamente a 28 °C, soportando temperaturas de hasta más de 35 °C (Stamps, 1984). Por último, *Phytophthora nicotianae* al igual que *P. capsici*, soportan temperaturas más elevadas que *P. cactorum*, siendo la óptima de 25 °C a 30 °C y la mínima de 11 °C (Waterhouse, 1963), esto podría explicar que fueron encontradas dentro de invernáculos en abril y agosto.

4.3 Relaciones filogenéticas entre los aislamientos de *Phytophthora* y *Pythium* spp.

A fin de analizar las relaciones filogenéticas existentes entre las especies identificadas en cultivos intensivos de la provincia de Corrientes, se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias de los loci ITS rDNA y *cox2* de algunos de los aislamientos en estudio y con secuencias de referencia obtenidas en GenBank, utilizando el método de Máxima verosimilitud con un bootstrap de 1000 (Figuras 63 y 64).

Los árboles filogenéticos resultantes corroboran y refuerzan la identificación de las especies en estudio en esta Tesis de Maestría, agrupándolas además, según los clados a los cuales pertenece cada especie. Los diferentes clados, de acuerdo a la clasificación propuesta por Lévesque y de Cock (2004) y Blair *et al.* (2008), están representados por los recuadros coloreados (Figuras 63 y 64). Estos autores establecieron 10 clados filogenéticos de *Phytophthora*, nominados del 1 al 10; y 9 clados de *Pythium*, nominados desde la A a la I. Entre las especies identificadas en cultivos intensivos de la provincia de Corrientes están representados 2 clados de *Phytophthora* (1 y 2) y 3 de *Pythium* (A, B y F).

Coincidentemente con de Cock *et al.* (2015), las cepas identificadas como *Pythium aphanidermatum* se encuentran agrupadas dentro del clado A, y poseen un porcentaje de similitud del 100 % con la especie correspondiente al acceso KU.211462.1, la cual corresponde a una cepa obtenida de soja en EEUU. Aquellos aislamientos identificados como *Pythium myriotylum* se encuentran incluidos en el clado B, junto con *P. torulosum* y *P. catenulatum*; y el clado F se encuentra conformado por *P. spinosum* y *P. irregulare*.

Las especies del género *Phytopythium* también se encuentra conformando un grupo, distinguiéndose de los demás géneros. La especie *P. mercuriale* es más cercana a *P. helicoides* que a *P. vexans*.

Las secuencias correspondientes a *Phytophthora cactorum*, son idénticas y poseen un porcentaje de similitud del 100 % con el acceso GU.111587.1, perteneciendo al clado 1. Las secuencias de las cepas 8, 10 (identificadas como *P. capsici*), 3 y 26 (identificadas como *P. nicotianae*) obtenidas a través de la amplificación de la región ITS del rDNA no fueron agregadas al análisis filogenético debido a la calidad de las mismas, como se explicó en el apartado 4.1. Estas dos especies se encuentran agrupadas dentro del clado 2 y 1, respectivamente (Figura 64).

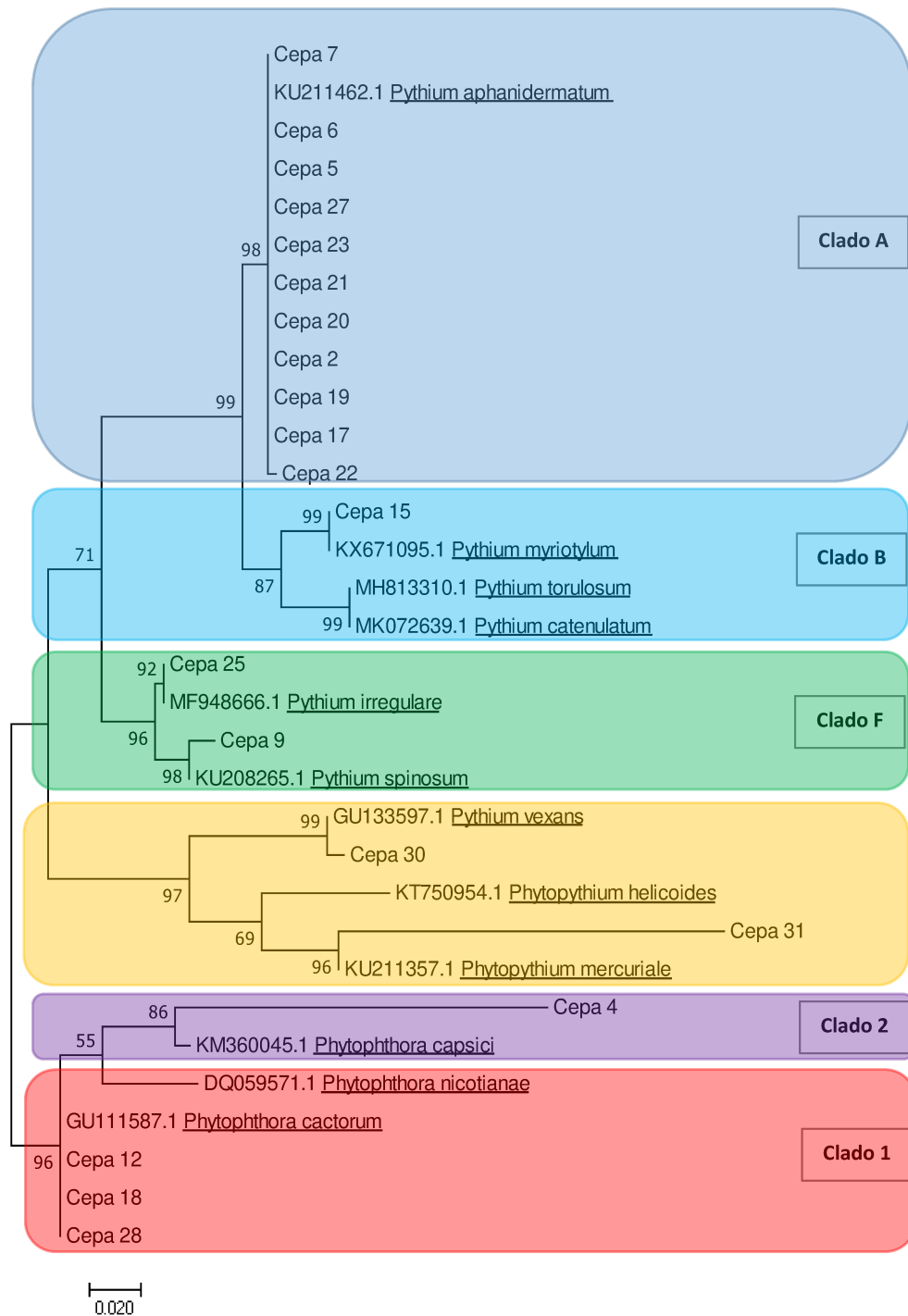


Figura 63. Análisis Molecular filogenético por el método de Máxima Verosimilitud basado en secuencias de la región ITS del rDNA de las especies de *Pythium*, *Phytophthora* y *Phytophythium* con especies de referencia obtenidas del GenBank. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-1617.91). El porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron aplicando el método de Neighbor-Joining a una matriz de distancias en pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Probabilidad Compuesta (MCL). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 32 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 309 posiciones en el conjunto de datos final.

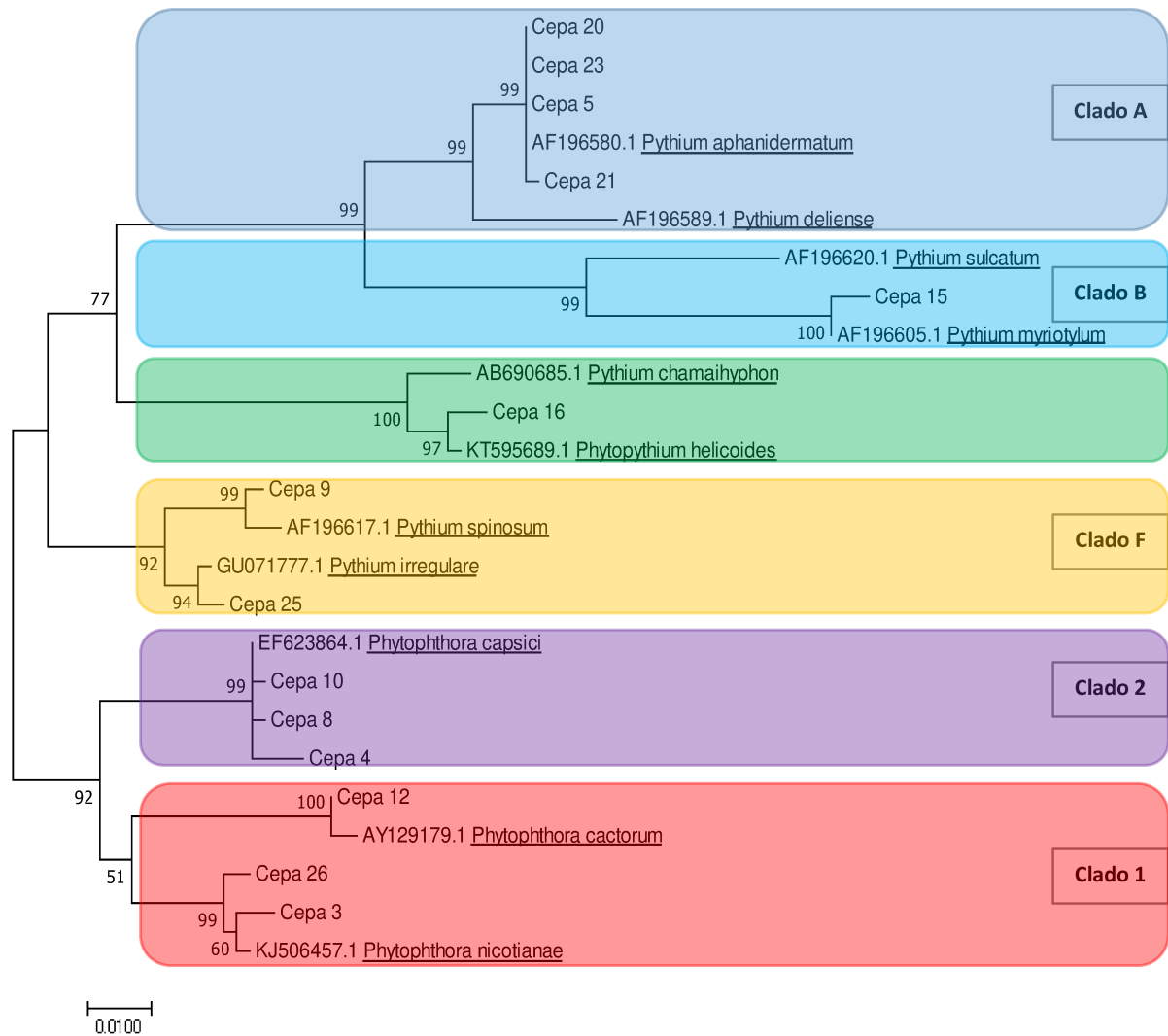


Figure 64. Análisis molecular filogenético por Máxima Verosimilitud basado en secuencias del gen *cox2* de las especies de *Pythium*, *Phytophthora* y *Phytophythium* con especies de referencia obtenidas del GenBank. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-1922.38). El porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron aplicando el método de Neighbor-Joining a la matriz de distancias en pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Probabilidad Compuesta (MCL). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1ra + 2da + 3ra + No-codificante. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 500 posiciones en el conjunto de datos final.

5. Conclusiones

- Se actualizó el conocimiento de las especies de *Pythium* y *Phytophthora* patógenas de cultivos intensivos en la provincia de Corrientes.
- Fueron caracterizados 31 aislamientos, los cuales correspondieron a 4 especies de *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. irregulare* y *P. spinosum*; 3 especies de *Phytophthora*: *P. capsici*, *P. nicotianae* y *P. cactorum*; 3 especies de *Phytopythium*: *P. helicoides*, *P. vexans* y *P. mercuriale*.
- Se identificaron 18 relaciones patógeno-hospedante diferentes, de las cuales 8 no habían sido citadas en el país hasta la fecha (*P. irregulare*-Gerbera; *P. irregulare*-*Citrullus*; *P. irregulare*-*Fragaria x ananassa*; *P. irregulare*-*Eustoma*; *P. myriotylum*-*Petroselinum crispum*; *Phytopythium helicoides*-*Chrysanthemum*; *Phytopythium vexans*-*Fragaria x ananassa* y *Phytopythium mercuriale*-*Fragaria x ananassa*).
- Es el primer registro de *Phytopythium mercuriale* en el país y en frutilla.

6. Bibliografía

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston. 922pp.
- Atlas Fitopatológico Argentino. 2011. INTA. Número 1, Vol.4. ISSN 1851-8974.
- Babadoost, M., Pavon, C., Islam, S. Z. y Tian, D. 2015. *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*) of pepper and its management. Acta Horticulturae, 1105: 61-66.
- Bautista-Calles, J., Huerta-Lara, M. y García-Espinoza, R. 2014. Antagonistas a *Phytophthora capsici* inoculados en sustratos de germinación de *Capsicum annuum* L. y *Mucuna deeringiana* Bort. Avances en Investigación Agropecuaria, 18 (2): 95-114.
- Belbahri, L., McLeod, A., Paul, B., Calmin, G., Moralejo, E., Spies, C. J., Botha, W. J., Clemente, A., Descals, E., Sanchez-Hernandez, E. y Lefort, F. 2008. Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (Pythiaceae). FEMS Microbiology Letters, 284 (1): 17-27.
- Benfradj, N., Migliorinib, D., Luchib, N., Santinib, A. y Boughalleb-M'Hamdia, N. 2017. Occurrence of *Pythium* and *Phytophthora* species isolated from citrus trees infected with gummosis disease in Tunisia. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50 (5-6): 286-302.
- Black, L. L. 2003. *Phytophthora* blight en Compendium of Pepper diseases. The American Phytopathological Society. 17-19pp.
- Blackwell, E. 1943. The life history of *Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet. Transactions of the British Mycological Society, 26 (1-2): 71-89.
- Blancard, D. 2012. Tomato Diseases. Second Edition. Academic Press. 688 pp.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., Kang, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology, 45: 266-277.
- Boix Ruiz, A., De Cara García, M., Marín Guirao, J. I., Gomez Tenorio, M. A., Ruiz Olmos, C., Elizondo Pasten, R. y Tello Marquina, J. C. 2017. Especificidad de *Phytophthora parasitica* sobre tomate. Agrícola Vergel: fruticultura, horticultura, floricultura, 401: 180-186.
- Brasier, C. M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: genetic system, sexuality and the generation of variation. Annual Review of Phytopathology, 30: 153-171.
- Brasier, C. M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. Plant Pathology, 57: 792-808.
- CABI. 2018. *Phytophthora ramorum* (texto original por Frankel, S. J. 2012. Sudden Oak Death Research). En: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International.
- Carluccio, C., Lenscak, M. P., Panelo, M., Colombo M. H., Caseres, S., Molina, N., Scaglia, E. y Pernuzzi, C. 2002. Desarrollo Actual de los Cultivos Protegidos en la República Argentina. 44pp. En: Díaz Alvarez, R. y López Galvez, J. Ed. Situación de la Agroplasticultura en países Iberoamericanos. Tercera Reunión de Coordinación en Caracas, Venezuela. Cyted, Almería, España. 30-71.

- Castro Rocha, A., Fernandez Pavia, S. P. y Osuna Avila, P. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Fitopatología, 30 (1): 49-65.
- Choi, Y., Beakes, G., Glockling, S., Kruse, J., Nam, B., Nigrelli, L. Ploch, S. Shin, H., Shivas, R. G., Telle, S., Voglmayr, H. y Thines, M. 2015. Towards a universal barcode of oomycetes - a comparison of the cox1 and cox2 loci. Molecular Ecology Resources, 15: 1275-1288.
- Choudhary, C. E., Burgos-Garay, M. L., Moorman, G. W y Hong, C. 2016. *Pythium* and *Phytophthora* species in two Pennsylvania greenhouse irrigation water tanks. Plant Disease, 100 (5): 926-932.
- Chowdappa, P., Nirmal Kumar, B. J., Mohan Kumar, S. P., Madhura, S., Reddi Bhargavi, B. y Jyothi Lakshimi, M. 2016. Population structure of *Phytophthora nicotianae* reveals host-specific lineages on brinjal, ridge gourd and tomato in South India. Phytopathology, 106 (12): 1553-1562.
- Colombo, M. del H., Lattar, T., Cardozo, N. y Obregón, V. G. 2011. Muerte de plantas de *Eucalyptus grandis* por *Phytophthora cactorum* en cuello y raíces, Corrientes, Argentina. XXII^o Reunión de comunicaciones científicas, técnicas y de extensión. FCA-UNNE.
- Colombo, M. Del H., Lenscak, M. P. e Iromey, M. 2005. *Pythium aphanidermatum* agente causal de podredumbre de cuello, raíces y frutos en los principales cultivos hortícolas alternativos de Corrientes. XII Congreso Latinoamericano y XXVIII Congreso Argentino de Horticultura: p.317.
- Consejo Federal de Inversiones. 2016. Informe del Sector Hortícola. 10pp.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. y Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genetics and Biology, 30: 17-32.
- Cundom, M. A. 2013. Principales enfermedades de flores y ornamentales en la región NEA. En: Sanidad en cultivos intensivos. Módulo 4: Flores y ornamentales: el difícil arte de la belleza. INTA. Centro Regional Buenos Aires Norte. EEA San Pedro.
- De Cara, M., Palmero, D., Lopez-Durán, C., Sanchez-Lorenzo, A., Santos, M., Coffey, M. D. y Tello, J. C. 2009. Host specificity and pathogenic ability of *Phytophthora parasitica* and *P. capsici* on tomato and sweet pepper. Book of Abstract III Interational Conference of Enviromental an Applied Microbiology (BioMicroWorld2009). Lisbon (Portugal). 202pp.
- de Cock, A. W. A. M., Lodhi, A. M., Rintoul, T. L., Bala, K., Robideau, G. P., Abad, Z. G., Coffey, M. D., Shahzad, S. y Lévesque, C. A. 2015. *Phytophthora*: molecular phylogeny and systematics. Persoonia, 34 (1): 25-39.
- Davis, R. M. y Davis, J. B. "Pythium Wilt and Leaf Blight". En: Compendium of Lettuce Diseases. APS Press The American Phytopathological Society. 1997.
- Díaz-Celaya, M., Rodríguez-Alvarado, G., Silva-Rojas, H. V., Pedraza-Santos, M. E., Salgado-Garciglia, R. y Fernández-Pavía, S. P. 2011. Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3: 431-443.
- Dick, M. W. 1990. Keys to *Pythium*. Publicado por el autor. UK Reading. 64pp.

- Dick, M. W. 2001. Straminipilous Fungi. Systematics of the Peronomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 670 pp.
- Drechsler, C. 1926. The Cottony Leak of Eggplant Fruit Caused by *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, 16 (1): 47-51.
- Dunn, A., R. y Smart, C. D. 2015. Interactions of *Phytophthora capsici* with resistant and susceptible pepper roots and stems. *Phytopathology*, 105 (10): 1355-1361.
- Ersek, T. y Ribeiro, O. 2010. An Annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 45 (2): 251-266.
- Ersek, T. y Schoelz, J. E. 1995. Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology*, 85 (11): 1343-1347.
- Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 562 pp.
- Ezziyiani, M., Perez Sanchez, C., Requena, M. E., Ahmed, S. A. y Candela, M. E. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*, 26: 61-68.
- Farr, D. F. y Rossman, A. Y. 2015. Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> Fecha de acceso: 05/02/2019.
- Ferronato, M. L., Lima Neto, V. C. y Tomaz, R. 2008. Doenças em cultivos de gérbera no estado do Paraná. *Scientia Agraria*, 9 (4): 481-489.
- Fernandez Lozano, J. 2012. La Producción de Hortalizas en Argentina (caracterización del sector y zonas de producción). Secretaría de comercio interior. Corporación del mercado central de Buenos Aires. Gerencia de Calidad y Tecnología. 29pp.
- Fernandez Valiela, M. V. 1978. Introducción a la fitopatología. Volumen III: Hongos (3ra Edición). Colección científica del INTA. 779 pp.
- Foster, J. M. y Hausbeck, M. K. 2010. Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. *Plant Disease*, 94 (1):24-30.
- Frezzi, M. J. 1950. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, IV (1): 47-133.
- Frezzi, M. J. 1956. Especies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, 10: 113-241.
- Fry, W. E. y Grünwald, N. J. 2010. Introducción a los Oomycetes. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0220-01.
- Gomez-Rodriguez, O., Corona-Torres, T. y Aguilar-Rincón, V. H. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. *Crop Protection*, 92: 148-152.
- Goodwin, S. B., Legard, D. E., Smart, C. D., Levy, M., Fry, W.E. 1999. Gene flow analysis of molecular markers confirms that *Phytophthora mirabilis* and *P. infestans* are separate species. *Mycologia*, 91, 796-810.

- Graham, J. y Feichtenberger, E. 2015. Citrus *Phytophthora* diseases: Management challenges and successes. *Journal of Citrus Pathology*, 2 (1): 1-11.
- Grijalba, P. E., Steciow, M. M. y Ridaio, A. del C. 2014. *Pythium catenulatum* y *Phytopythium helicoides* asociados a plántulas de soja. 3er Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán. Libro de Resúmenes: p.187.
- Grijalba, P. E., Zapata, R.L., Palmucci, H. y Baron, C. 2015. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 50 (1): 11-15.
- Grunwald, N. J., Garbelotto, M., Goss, E. M., Heungens, K. y Prospero, S. 2012. Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends in Microbiology*, 20: 131-138.
- Gull, C., Labuschagne, N. y Botha, W. J. 2004. *Pythium* species associated with wilt and root rot of hydroponically grown crops in South Africa. *African Plant Protection*, 10 (2): 109-116.
- Hantula, J., Lilja, A., Nuorteva, H., Parikka, P. y Werres, S. 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron and silver birch. *Mycological Research*, 104 (9): 1062-1068.
- Hartman, G. L., Huang, Y. H. y Wang, T. C. 1991. Infection of pepper and tomato by *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 75: 751.
- Hausbeck, M. K. y Lamour, K. H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: reseach progress and management challenges. *Plant Disease*, 88 (12): 1292-1303.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270: 313-321.
- Ho, H. H. 2011. The genus *Pythium* in Taiwan (2) - an Illustrated diagnostic key. *Mycotaxon*, 116: 33-47.
- Hudspeth, D. S. S., Nadler, S. A. y Hudspeth, M. E. S. 2000. A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia*92 (4): 674-684.
- Iribarren, M. J., Gonzalez, B. A. y Filippini, S. 2012. Distribución de *Phytophthora cactorum* en el perfil de un suelo cultivado con frutilla (*Fragaria x ananassa*). *Summa Phytopathologica*, 38(1): 17-23.
- Iribarren, M. J. 2015. Caracterización de *Phytophthora capsici* como patógeno de especies hortícolas presentes en la zona noreste de la provincia de Buenos Aires. Tesis de doctorado.
- Ishiguro, Y., Otsubo, K., Wantabe, H., Suzuki, M., Nakayama, K., Fukuda, T., Fujinaga, M., Suga, H. y Kageyama, K. 2014. Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 80 (5): 423-429.
- Juarez-Palacios, C., Felix-Gastelum, R., Wakeman, R. J., Paplomatas, E. J. y DeVay, J. E. 1991. Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. *Plant Disease*, 75 (11): 1160-1164.
- Jung, T. y Burgess, T. I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species. *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, 22: 95-110.

- Kageyama, K., Aoyagi, T., Sunouchi, R. y Fukui, H. 2002. Root rot of miniature roses caused by *Pythium helicoides*. *Journal of General Plant Pathology*, 68: 15-20.
- Katawczik, M. 2008. *Pythium irregulare*. NC State - Department of Plant Pathology. Disponible en: https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Pythium_irregulare/Pythium_irregulare.html Fecha de acceso: 10/08/2018.
- Kumar S., Stecher G. y Tamura K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Lévesque, C. A. y de Cock, A. W. A. M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108 (2): 1363-1383.
- Man In't Veld, W. A., Veenbaas-Rijks W. J. C., Llieva, E., De Cock, A., Bonants, P. y Pieters, R. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic ADN. *Phytopathology*, 88 (9): 922-929.
- March, G., Marinelli, A., Oddino, C., Kearny, M., Pastor, S., Vargas Gil, S., Giuggia, J., Remedi, D. y Justianovich, C. 2001. Groundnut crop loss by pod rot. *International Arachis Newsletter*, 21: 36-37.
- Martin, F. N., Abad, G. Z., Balci, Y. e Ivors, K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*, 96 (8): 1080-1103.
- Matheron, M. E. 1997. "Damping-off". En: *Compendium of Lettuce Diseases*. APS Press The American Phytopathological Society. 165pp.
- McGovern, R. J. 2016. "Diseases of Lisianthus" en: McGovern, R. J., Elmer, W. H., Schubert, T., Jeyaprakash, A. y Harmon, C. 2016. *Handbook of Florists' Crops Diseases*. Springer International Publishing. 52pp.
- McLeod, A., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T. y Mostert, L. 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research*, 113 (9): 933-951.
- Meneguzzi, N., Pastor, S., Salerno, C. y Kirschbaum, D. 2011. Identificación de especies de *Pythium* (Peronosporales: Pythiaceae) asociados a síntomas de podredumbre de raíz en frutilla. 2º Congreso Argentino de Fitopatología.
- Middleton, J. T. 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 20 (1): 1-171.
- Mirzaee, M. R., Ploch, S. y Runge, F. 2013. A new presumably widespread species of *Albugo* parasitic to *Strigosella* spp. (Brassicaceae). *Mycological Progress*, 12: 45-52.
- Nemec, S. y Sanders, H. 1970. *Pythium* species associated with strawberry root necrosis in southern Illinois. *Plant Disease Reporter*, 54: 49-51.
- Obregón, V. G., Colombo, M. H., Monteros, J. y Cardozo, N. 2009. Eficacia de la solarización en el control de hongos de suelo en invernaderos en Bella Vista Corrientes. *Jornadas Fitosanitarias: Rio Hondo, Santiago del Estero*. ISBN 978-950-673-600-2. p.54.
- Oelke, L. M., Bosland, P. W. y Steiner, R. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128 (2): 213-218.

Palau, H., Lechardoy, M. y Neyra, F. 2010. Plan de competitividad conglomerado hortícola de Santa Lucía y Bella Vista, provincia de Corrientes. Programa Norte grande. Ministerio de Economía y Finanzas Públicas. Secretaría de Política Económica.

Palmucci, H. 2015. Caracterización de especies fitopatógenas de *Pythium* y *Phytophthora* (Peronospromycetes) en cultivos ornamentales del cinturón verde La Plata-Buenos Aires y otras áreas y cultivos de interés. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. La Plata (Buenos Aires, Argentina). 448 pp.

Palmucci, H. E., Wolcan, S. M. y Grijalba, P. E. 2011. Status de la familia Pythiaceae (Reino Straminipila) en Argentina: I. El género *Pythium*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 46: 197-211.

Palocci, F., Rubini, A., Granetti, B. y Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for reliable 460 identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. Fems Microbiology Ecology, 28: 23-30.

Panabières, F., Ali, G. S., Allagui, M. B., Dalio, R. J. D., Gudmestad, N. C., Kuhn, M., Guha Roy, S., Schena, L., y Zampounis, A. 2016. *Phytophthora nicotianae* diseases worldwide: new knowledge of a long-recognised pathogen. Phytopathologia Mediterranea, 55 (1): 20-40.

Preston, D. A. 1945. Host Index of Oklahoma Plant Diseases. Oklahoma Agricultural and Mechanical College. Agricultural Experiment Station. Technical Bulletin No. 21. 168pp.

Quesada-Ocampo, L. M., Vargas, A. M., Naegele, R. P., Francis, D. M. y Hausbeck, M. K. 2016. Resistance to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici* in a tomato advanced backcross of *Solanum habrochites* and *Solanum lycopersicum*. Plant Disease, 100 (4): 829-835.

Raabe, R. D., Conners, I. L., y Martinez, A. P. 1981. Checklist of plant diseases in Hawaii. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii. Information Text Series No. 22. 313 pp.

Ribeiro, O. K. 2013. A historical perspective of *Phytophthora*. En: Lamour, K. *Phytophthora: a global perspective*. CABI plant protection series. CABI, Cambridge, MA. 244pp.

Ristaino, J. B. 1991. Influence of rainfall, drip irrigation and inoculum density on the development of *Phytophthora* root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. Phytopathology, 81(8): 922-929.

Roberts, P. D. 2003. Damping-Off and root rot. En: Compendium of pepper diseases. The American Phytopathological Society. 62pp.

Robideau, G. P., De Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C. M. M., Hu, C.-H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B. y André Lévesque, C. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer: DNA barcoding of oomycetes with COI and ITS. Molecular Ecology Resources, 11 (6): 1002-1011.

Robertson, G.I. 1980. The genus *Pythium* in New Zealand. New Zealand Journal of Botany, 18: 73-102.

Rodríguez-Padrón, C., Siverio, F., Perez-Sierra, A. y Rodríguez, A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado

orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea*, 57 (1): 89-106.

Schroeder, K.L., Martin, F. N., de Cock, A. W. A. M., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A. y Paulitz, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease*, 97: 4-20.

Seemüller, E. 1984. Crown rot (vascular collapse) en Maas, J. L. *Compendium of Strawberry diseases*. Published by The American Phytopathological Society. 138pp.

Servicio de Información Agroeconómico Subdirección SIA. 2012. Ministerio de Producción, Trabajo y Turismo. Provincia de Corrientes. Disponible en: <https://datos.magyp.gob.ar/>

Stamps, D. J. 1985. *Phytophthora capsici*. *Descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria*, 84: 836.

Stavisky, A. 2015. Situación actual de la plasticultura en Argentina. XX Congreso Internacional de Plásticos en la Agricultura. XV Congreso Iberoamericano para el Desarrollo y Aplicación de los plásticos en la Agricultura. Saltillo, México.

Stirling, G. R., Turaganivalu, U., Stirling, A. M., Lomavatu, M. F. y Smith, M. K. 2009. Rhizome rot of ginger (*Zingiber officinale*) caused by *Pythium myriotylum* in Fiji and Australia. *Australian Plant Pathology*, 38 (5): 453-460.

Sutton, J. C., Sopher, C. R., Owen-Going, T. N., Liu, W., Grodzinski, B., Hall, J. C. y Benchimol, R. L. 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica*, 32 (4): 307–321.

Tamura K. y Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.

Testen A. L., Jimenez-Gasco, M. D., Ochoa, J. B. y Backman, P. A. 2014. Molecular detection of *Peronospora variabilis* in quinoa seeds and phylogeny of the quinoa downy mildew pathogen in South America and the United States. *Phytopathology*, 104: 379-386.

Thines, M. 2013. Taxonomy and phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. En: Lamour, K. *Phytophthora: a global perspective*. CABI plant protection series. CABI, Cambridge, MA. 244pp.

Thines, M. y Kummer, V. 2013. Diversity and species boundaries in floricolous downy mildews. *Mycological Progress*, 12: 321-329.

Tompkins, C. M. y Tucker, C. M. 1941. Root rot of pepper and pumpkin caused by *Phytophthora capsici*. *Journal of Agricultural Research*, 63 (7): 417-426.

Tsao, P. H., Ugale, R., Hobbs, S. y Farih, A. 1980. Control of homotallic oospore formation in *Phytophthora parasitica* by culture manipulations. *Transactions of the British Mycological Society*, 75 (1): 153-156.

Uzuhashi, S., Tojo, M. y Kakishima, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51: 337-365.

Vaillant Flores, D. y Gómez Izaquirre, G. 2009. Incidencia de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora infestans* en Cuba. *Agricultura técnica en México*, 35 (2): 219-223.

- Van der Plaats-Niterink, J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, 21:1-244.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T. y Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98: 410-422.
- Waterhouse, G. M. 1963. Keys to the species of *Phytophthora* De Bary. *Mycological Papers*, 92: 1-22.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. y Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. 315-322.
- Wolcan, S., Ronco, L., y Lori, G. 2007. Podredumbres basales de *Gypsophila paniculata* (Caryophyllaceae): agentes causales y su patogenicidad potencial sobre *Dianthus caryophyllus*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(3-4): 159-167.
- Yang, X. y Hong, C. X. 2016. Diversity and populations of *Phytophthora*, *Phytopythium* and *Pythium* species recovered from sediments in agricultural run-off sedimentation reservoir. *Plant Pathology*, 65 (7): 1118-1125.