

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Phytophthora fragariae, *P. rubi*, *P. citricola*, *P. erythroseptica* en cultivos de fresa y frambuesa



SENASICA, SALUD PARA LAS PLANTAS Y ANIMALES.

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

Imagen de Portada: Christer Olsson, Swedish Board of Agriculture, Bugwood.org (Síntomas en raíces); Abad *et al.*, 2019 (estructuras de *Phytophthora* spp.)

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	2
SÍNTOMAS	3
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	6
Morfología	6
Técnicas de diagnóstico.....	11
Observación directa	11
Incubación en papel secante.....	11
Incubación en medios de cultivo	11
Obtención de cultivos puros	12
Interpretación de resultados.....	13
Corroboración molecular.....	13
REFERENCIAS.....	16
AVISO.....	20

Pudrición de la raíz causada por *Phytophthora* en cultivos de fresa y frambuesa.

GENERALIDADES

El género *Phytophthora* incluye 313 especies descritas, muchas de ellas, de importancia económica en cultivos de regiones tropicales y templadas (Ho, 2018; Cooke *et al.*, 1995). Dicho género pertenece al phylum Oomycota, el cual agrupa organismos diploides relacionados con microorganismos protistas y algas; esta relación se establece debido a la similitud en la composición de la estructura móvil de sus esporas flageladas en la reproducción asexual y la producción de oogonios globosos en la reproducción sexual (Cooke *et al.*, 2000; Ho, 2018). De acuerdo con Petersen y Rosendahl (2000), basándose en el análisis de secuencias parciales de la subunidad ribosomal grande (LSU) del rDNA, el género *Phytophthora* posee una estrecha relación con el género *Peronospora* y *Peronophthora*, colocándolo dentro del Orden Peronosporales.

Se han reportado 12 especies de *Phytophthora* que causan pudrición de la raíz en fresa y frambuesa: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. erythroseptica*, *P. fragariae*, *P. rubi*, *P. megasperma* y *P. syringae* (Ilieva *et al.*, 1995; Kennedy y Duncan, 1995; Wilcox *et al.*, 1993). De estas especies, *P. fragariae* y *P. citricola* presentan una distribución cosmopolita en cultivos de fresa y frambuesa en todo el mundo; mientras que la cercanía de México con el mercado norteamericano y las regiones productoras de berries en Norteamérica, son la razón de que *P. rubi* y *P. erythroseptica* sean de importancia para estos cultivos en México.

Phytophthora fragariae, fue identificada por Hickman (1941) afectando fresa (*Fragaria × ananassa*); posteriormente, un aislamiento morfológicamente similar se asoció a una pudrición de la raíz del cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus*) sin ser patogénico en fresa, diferenciando a *P. fragariae* en dos variedades, *P. fragariae* var. *fragariae* y *P. fragariae* var. *rubi*. Actualmente, se reconocen ambas como especies, *P. fragariae* y *P. rubi*, estrechamente relacionadas y con fuertes similitudes morfológicas y fisiológicas, con diferente especialización de hospedantes, causando la enfermedad estela o núcleo rojo de la fresa y la pudrición de la raíz en frambuesa, respectivamente (Adams *et al.*, 2020; Cooke *et al.*, 1995; Man In 't veld, 2007; Tabima *et al.*, 2018).

P. fragariae, es altamente destructivo en el cultivo de fresa al provocar el colapso de toda la planta (Adams *et al.*, 2020), la enfermedad está presente en todos los países productores de fresa (Gallegly, 2008).

En el cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus*), *Phytophthora* es un patógeno particularmente severo, especialmente en regiones templadas con suelos poco drenados, ya que limita la capacidad de producción de los cultivos y reduce por más de 5 años el tiempo de vida media del cultivo debido a daños causados por la pudrición de la raíz (Gigot *et al.*, 2013; Pattinson *et al.*, 2004.).

P. rubi se considera un patógeno cosmopolita que limita la producción de frambuesas en el noreste del Pacífico, es un patógeno difícil de controlar, hiberna en el suelo como oosporas que pueden iniciar brotes de la enfermedad en los años subsecuentes (Abad *et al.*, 2019; Tabima *et al.*, 2018).

P. citricola, se detectó por primera vez en Europa y por años se consideró la principal causa de pudrición de la raíz en frambuesa para dicho continente. Actualmente, tiene una distribución cosmopolita alrededor del mundo; en México se ha reportado afectando principalmente el cultivo de aguacate (*Persea americana*) (Coffey *et al.*, 1988; Fernández-Pavía *et al.*, 2013).

Finalmente, las primeras detecciones de *P. erythroseptica* se dieron en zonas productoras del Noroeste de E.U.A., ya en la actualidad este patógeno se encuentra presente en Canadá y E.U.A.

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Posición taxonómica:

Reino Chromista, Phylum Oomycota, Clase Oomycetes, Orden Peronosporales, Familia Peronosporaceae

***Phytophthora fragariae* Hickman (1941)**

Sinonimias:

Phytophthora fragariae var. *fragariae*

Nombres comunes:

Corazón rojo de la fresa (español)

Estela roja de la fresa (español)

Pudrición de la raíz de la fresa (español)

Raspberry root rot; red core disease of strawberry (inglés)

Red core of strawberry (inglés)

Red stele disease of strawberry (inglés)

Red stele of strawberry (inglés)

Coeur rouge des racines du fraisier (francés)

Mildiou du fraisier (francés)

Stele rouge du fraisier (francés)

***Phytophthora rubi* W.F. Wilcox & J.M. Duncan, Man in 't Veld (2007)**

Sinonimias:

Phytophthora fragariae var. *rubi*

Nombres comunes:

Pudrición de la raíz (español)

***Phytophthora citricola* Sawada (1927)**

Sinonimias:

Phytophthora cactorum var. *applanata* Chester

Phytophthora pini Leonian

Nombres comunes:

Pudrición negra de la raíz (español)

Pudrición de la semilla (español)

Brown rot of citrus (inglés)

Root rot of seedlings (inglés)

***Phytophthora erythroseptica* Pethybridge (1913)**

Sinonimias:

Phytophthora himalayensis Dastur

Phytophthora erythroseptica var. *erythroseptica* Waterhause

Nombres comunes:

Pudrición rosada (español)

Pink tuber rot (inglés)

Root rot of raspberry (inglés)

SÍNTOMAS

Las plantas con pudrición de la raíz por *Phytophthora* generalmente ocurren en grupos o manchones, donde el suelo tiene relativamente poco drenaje interno o en secciones de la plantación con agua que tiende a acumularse (Wilcox, 1989).

Phytophthora fragariae

A finales de primavera o principios del verano, las plantas afectadas presentan síntomas de sequía, y el crecimiento de la planta cesa (Figura 1a).

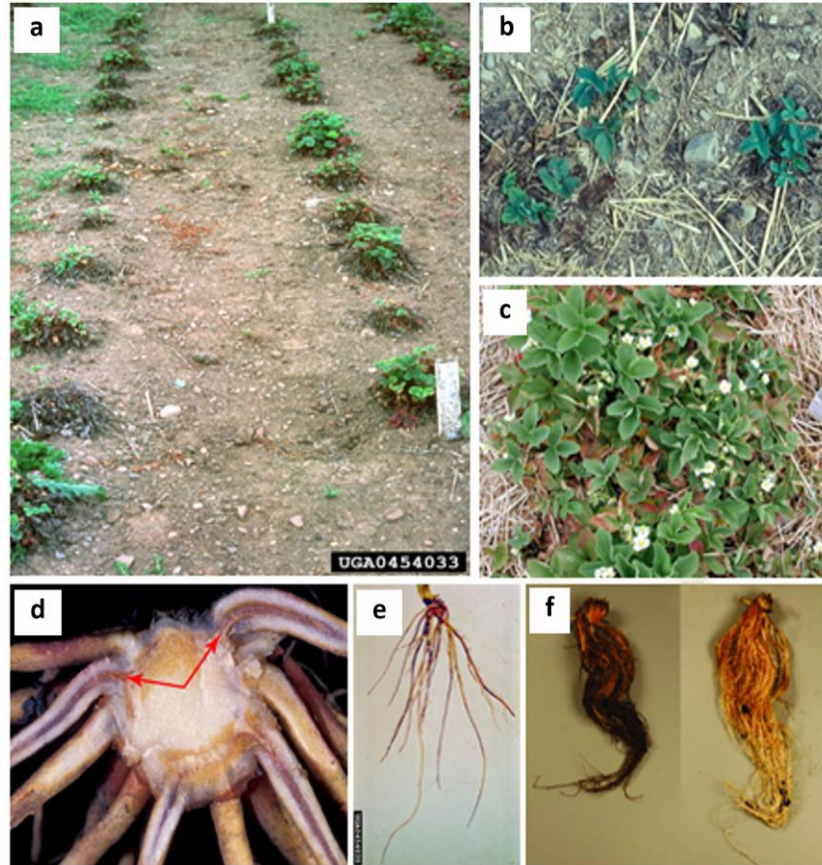


Figura 1 Síntomas en fresa causados por *Phytophthora fragariae*. a-b) cultivo de fresas infectado, plantas con poco crecimiento y marchitas, c) hojas jóvenes permanecen verdes y hojas viejas marrón-rojizas, d) cilindro vascular central rojizo, e) necrosamiento de raíces desde las puntas, f) raíces de una planta susceptible infectada y raíces de una planta resistente al patógeno. Tomado y modificado de: a, e) SCRI-Dundee, 2021; b, d) Thibodeau, 2021; c) Liette Lambert, 2016, f) Adams *et al.*, 2020.

Las hojas recién formadas permanecen pequeñas con los peciolo cortos; las hojas más viejas se tiñen con diferentes tonalidades rojas, amarillo o marrón (Figura 1b y 1c). La infección inicia en las raíces, mostrándose grises o marrón pálido, una decoloración rojiza del cilindro vascular central es observada al raspar el tejido externo de las raíces grandes (Figura 1d) y puede extenderse hacia la corona, desde finales de otoño durante todo el invierno y primavera. Las raíces principales mueren desde las puntas hacia la base (Figura 1e y 1f), la extensión del daño varía según la estación del año. Las raíces laterales son

escasas y se pueden destruir rápidamente. Las plantas afectadas no producen frutos o bien, si los producen son insuficientes, secos y poco útiles (Hickman, 1941; Liberato, 2006).

Phytophthora rubi

Los síntomas superficiales incluyen marchitamiento de plantas (**Figura 2a**), hojas chamuscadas o bronceadas (**Figuras 2b y 2c**) que eventualmente colapsan y retrasan el crecimiento de los tallos de la fruta. Los frutos permanecen pequeños y se marchitan antes de madurar. Las raíces infectadas se vuelven necróticas (**Figura 2d y 2e**), las plantas pueden generar algunas raíces nuevas aparentando su recuperación, pero estas raíces son débiles y carecen de desarrollo lateral (**Figura 2f**).

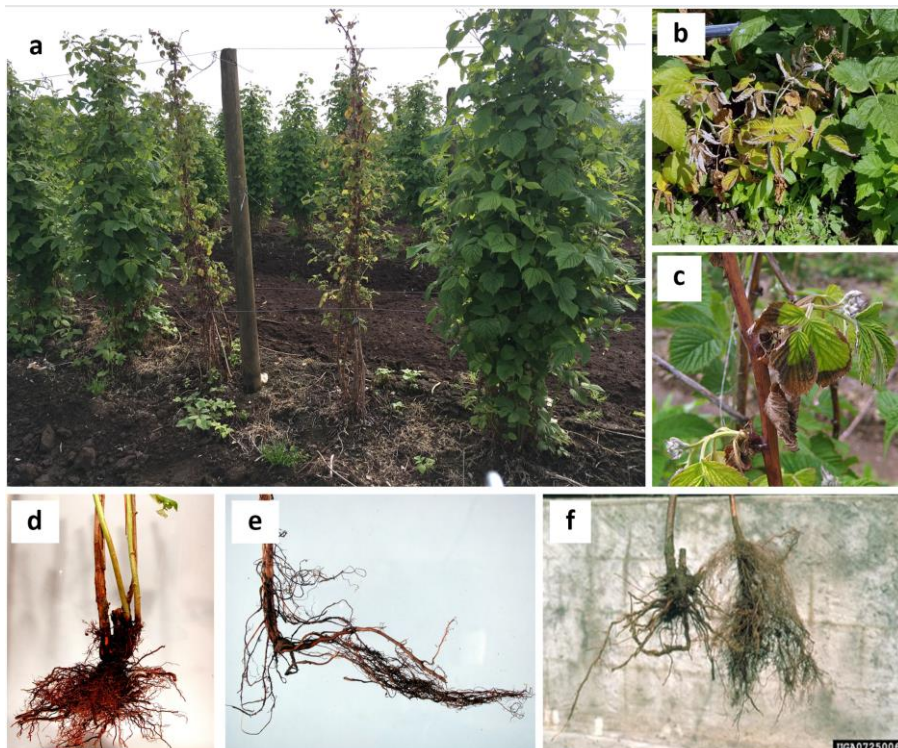


Figura 2 Síntomas en frambuesa causados por *Phytophthora rubi*. a) marchitamiento de plantas infectadas, b-c) hojas chamuscadas, d) pudrición de la corona, e) necrosamiento radical, f) comparativo entre raíces secundarias infectadas (izquierda) y sanas (derecha). Tomado y modificado de: a) Lisa Jones, 2017; d, e) OSU Plant Clinic Collection, 2011; b) Jay W. Pscheidt, 2018; c) Washington State University, 2021; f) André Bolay, 2018.

Posteriormente, las raíces nuevas se infectan durante el clima frío y húmedo, la planta declina progresivamente y se vuelve improductiva. Las lesiones rojizas se extienden por encima y debajo del punto de infección en las raíces y coronas (**Figura 2d**), y finalmente rodean toda la planta (Stewart *et al.*, 2014).

Phytophthora citricola y *Phytophthora erythroseptica*

A nivel de campo es difícil diferenciar *P. citricola* de *P. erythroseptica* debido a que producen síntomas similares; pudiendo afectar raíz, tallo, hojas y tejidos leñosos. Es posible observar amarillamiento en hojas de plantas enfermas; en frambuesa se asocian principalmente al decaimiento de la planta (**Figura 3a**), baja productividad, pudrición de la raíz y muerte regresiva de los tallos (Erwin y Ribeiro, 1996).

La incidencia de plantas enfermas ocurre en parches, los cuales se expanden con suelos poco drenados, anegados o compactos (**Figura 3b**). En plantas susceptibles la severidad de la pudrición de la raíz es mayor al 20 %, aun en ausencia de síntomas aéreos (Kennedy y Duncan 1995). Las plantas enfermas desarrollan un cambio de color progresivo rojizo a café oscuro, de abajo hacia arriba en el tejido de la corona (**Figura 3c**) (Wilcox, 2016).



Figura 3 Síntomas causados por *Phytophthora* spp. en frambuesa (*Rubus idaeus*). Síntomas observados en campo: a) amarillamiento de las hojas y decaimiento de la planta, b) decaimiento y falta de vigor en parches, c) pudrición progresiva de la corona de color rojizo. Tomado y modificado de: Wilcox, 2016.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Morfología

La identificación morfológica de las especies de *Phytophthora* se basa en caracteres de la fase asexual y sexual, así como en la morfología colonial. En la fase asexual se considera la papilación del esporangio y su caducidad, forma del esporangióforo, presencia o ausencia y forma de hinchamientos en las hifas y clamidosporas. En la fase sexual se toma en cuenta si las especies son homotáticas o heterotáticas, forma del gametangio (anteridio y oogonio), y forma de la oospora (Abad *et al.*, 2019).

Phytophthora fragariae

Morfología colonial: sin un patrón distinto después de 7 días en Agar y harina de maíz (CMA), Agar con papa y dextrosa (PDA) y jugo de verduras V-8. Temperatura mínima de crecimiento 3°C, óptima 18°C y máxima 27°C (Abad *et al.*, 2019).

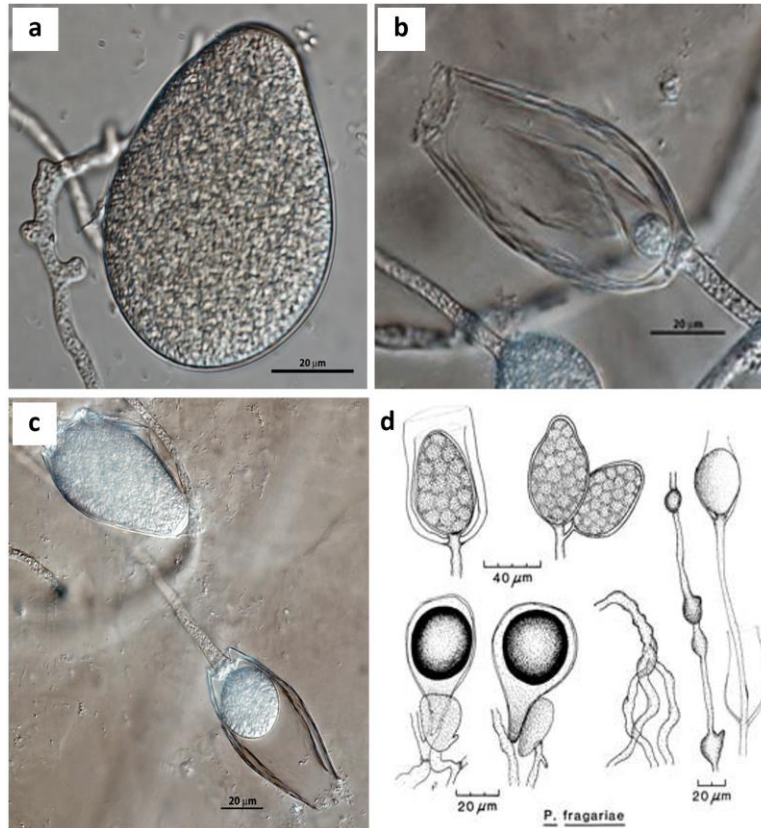


Figura 4 Morfología de *Phytophthora fragariae*. a) esporangio no papilado, ovoide; b-c) esporangio elipsoidal persistente con esporulación interna, d) estructuras de la fase asexual y sexual. Tomado y modificado de: a-c) Abad, 2019a; d) Erwin y Ribeiro, 1996

Fase asexual: Esporangio no papilado (Figura 4a); persistente; obpiriforme, ovoide (Figura 4a), elipsoidal (Figura 4b), de 28-56 μm de largo x 27-49 μm ancho, a menudo marcadamente obpiriforme; proliferación interna y anidada (Figura 4c), originada en esporangióforos simpodiales simples o no ramificados. Hinchamientos de la hifa globosos, subglobosos, coraloide, solitarios y catenulados en cadenas. Clamidosporas ausentes (Abad *et al.*, 2019).

Fase sexual: Homotática. Oogonio de paredes lisas, se origina en tallos muy cortos; frecuentemente globosos (28-46 μm de diámetro) con base ahusada; anteridios paraginos o anfígenos (16-30 μm de largo x 12-22 μm de ancho; oosporas esféricas (24 a 44 μm de diámetro), elipsoidales o irregulares (Figura 4d) (Abad *et al.*, 2019).

Phytophthora rubi

Morfología colonial: sin un patrón distintivo después de 7 días en V-8, PDA y Agar con extracto de malta (MEA) (**Figura 5a, 5b y 5c**). Temperatura mínima de crecimiento 4°C, óptima 19-22°C, y máximo 25-28°C (Abad *et al.*, 2019).

Fase asexual: Esporangios no papilados, persistentes; ovoides, obpiriforme, algunas veces con base cónica (36 µm - 68 µm de largo x 24 µm - 44 µm de ancho) mostrando una proliferación interna anidada y extendida (**Figura 5d y 5e**); se originó en esporangióforos simples simpodiales o ramificaciones irregulares. Hifas hinchadas ausentes. Clamidosporas ausentes (Abad *et al.*, 2019).

Fase sexual: Homotálica. Oogonio de paredes lisas, globoso (24 µm - 42 µm de diámetro) algunos con base cónica, tornándose color marrón dorado con la edad de la colonia; anteridios predominantemente anfígeno (**Figura 5f**), cilíndricos cortos, ovoides o irregulares (8-17 µm), a veces producen proyecciones digitadas; oosporas apleróticas (19 µm - 40 µm de diámetro) (Abad *et al.*, 2019).

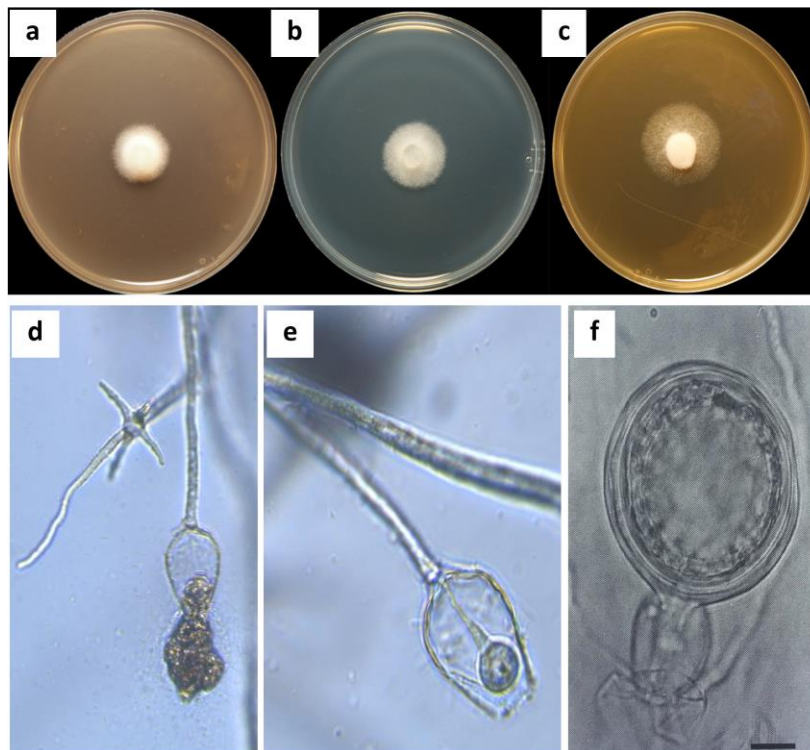


Figura 5 Morfología de *Phytophthora rubi*. Crecimiento colonial después de 7 días; a) en V8; b) en PDA; c) en MEA; d-e) esporangio ovoide persistente y proliferación interna; f) cuerpo sexual con anteridio anfígeno. Tomado y modificado de: a-c) Abad, 2019b; d-e) Ruth D'urban-Jackson, 2018; f) Gallegly, 2008

Phytophthora citricola

Morfología colonial: produce un crecimiento radial con poco micelio aéreo y un patrón característico de pétalos, acentuado en medio de cultivo PDA, V8 y MEA (Figura 6a, 6b y 6c), después de 7 días de incubación. Intervalo de crecimiento óptimo de los 25 a 28 °C (Waterhouse, 1963). Forma esporangios abundantes en medio de cultivo Frijol y agar (FBA) después de 2 a 3 días en ausencia de luz a 25 °C. Los oogonios son escasos y comienzan a formarse en FBA, CMA y V8, después de 7 días a 20°C (Kennedy y Duncan, 1995).

Fase asexual: esporangios de papila ancha y aplanada, semipapilados (Figura 6e y 6f) y septo seguido a la base del esporangio, persistentes sobre el esporangioforo (Figura 6d), con forma variable, ovoides, globosos, elipsoidales, obpiriformes o ligeramente aplanados de un extremo. En ocasiones bifurcados con dos ápices; o de forma irregular con 3 o 2 lóbulos, de 30 µm - (47 µm) -75 µm x 21 µm - (34 µm) -44 µm. Esporangióforos simples o simpodiales (Erwin y Ribeiro, 1996, Abad *et al.*, 2019). Solo se ha reportado la formación de clamidosporas en medio de cultivo OA.

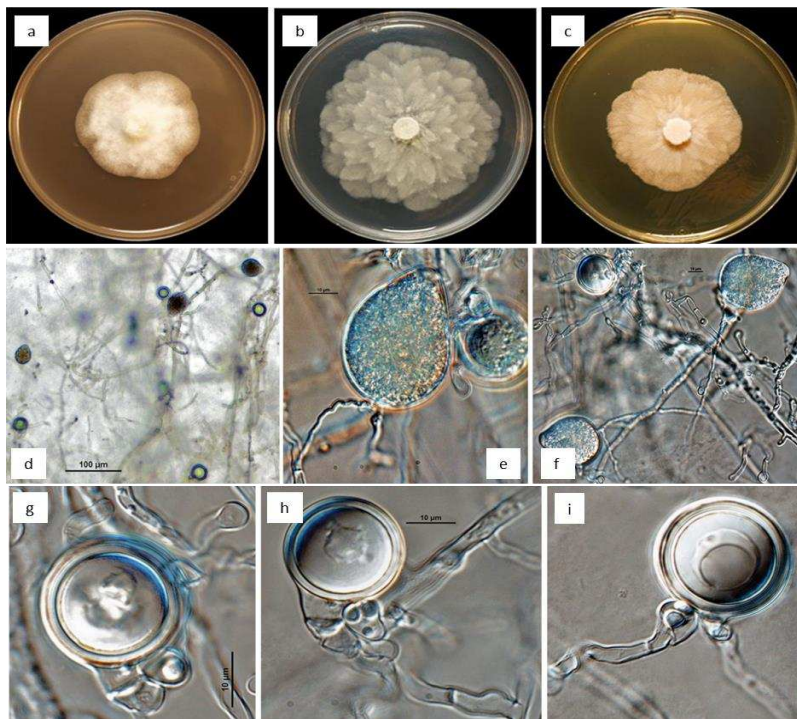


Figura 6 Morfología colonial y microscópica de *Phytophthora citricola*. Crecimiento colonial de 7 días en medio de cultivo; a) V8, b) PDA, c) MEA. Fase asexual en medio de cultivo V8; d) esporangios en esporangioforos simples y oosporas, e) y f) esporangios ovoides, semipapilados y persistentes, rodeados de oosporas. Fase sexual en semillas de cáñamo; g), h), i) oogonios de base cónica, pared suave, anteridio paragino y oosporas pleróticas. Tomado y modificado de Abad, 2019c.

Fase sexual: Homotática, anteridios paraginos, aunque se pueden encontrar algunos anfígenos. Oogonio esférico (Figura 6g) de 18 µm - (25.5 µm) - 35 µm de diámetro, en

ocasiones estrechándose hacia la base en forma de embudo (Figura 6h). Oosporas esféricas, casi pleróticas de 16-(22)-30 μm de diámetro (Figura 6i) (Ilieva *et al.*, 1995).

Phytophthora erythroseptica

Morfología colonial: presenta un crecimiento moderado y radial con forma de roseta o de pétalos en medio de cultivo PDA, V8 y MEA (Figura 7a, 7b y 7c). Su intervalo de crecimiento óptimo va de 25 a 30 °C (Wilcox *et al.*, 1993).

Fase asexual: esporangio no papilado, de 43-(44.2)-69 μm x 26-(27.2)-47 μm , elipsoide, ovoide u obpiriforme (Figura 7d y 7e). Es común observar una constricción que va del extremo distal hasta la parte media del esporangio. Posee una base cónica y germina por proliferación interna. Esporangióforos simpodiales (Figura 7f), con ramificación inmediatamente debajo del esporangio (Wilcox *et al.*, 1993). Clamidosporas ausentes. Hinchamientos hifales redondos de 11 a 27 μm de diámetro, formando cadenas o agrupándose al crecer en medios acuosos.

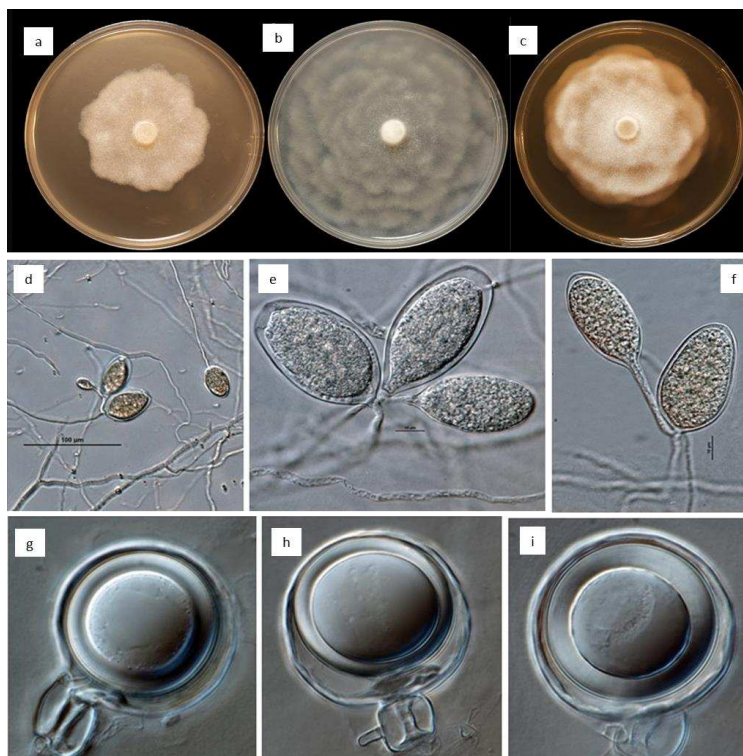


Figura 7 Morfología colonial y microscópica de *Phytophthora erythroseptica*. Crecimiento colonial de 7 días en medio de cultivo; a) V8, b) PDA, c) MEA. Fase asexual; d) e) y f) esporangios no papilados, esporangióforos simpodiales simples en la base del esporangióforo. Fase sexual; g), h), i) oogonios con anteridio anfigeno y oosporas apleróticas. h) anteridio con proyección. Tomado y modificado de Abad, 2019d.

Fase sexual: Homotámica. Anteridios anfígenos, elongados y cilíndricos (Figura 7g). Oogonios de 30-(34.9)-46 μm de diámetro. Oosporas apleróticas de 28-(30.5)-35 μm de diámetro. Se han observado oogonios con 2, 3 o 4 anteridios (Figura 7g, 7h y 7i) (Wilcox *et al.*, 1993).

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La detección del patógeno se realiza a partir de muestras de material vegetal de la planta; raíces, corona y tallo.

Observación directa

Utilizar un microscopio estereoscópico para buscar signos del oomyceto (micelio cenocítico, esporangios, oosporas, clamidosporas.) sobre el sistema radicular con presencia de síntomas de la enfermedad. Elaborar montajes con cinta adhesiva en medio con glicerina deshidratada al 50%, para la observación de las estructuras en un microscopio compuesto. Aislar en medio de cultivo selectivo las estructuras observadas.

Incubación en papel secante

Lavar el tejido vegetal con agua corriente para eliminar suelo, sustrato u otras partículas adheridas. Obtener pequeños fragmentos (aprox. 1 cm^2) a partir de raíces con o sin síntomas. En condiciones de asepsia, lavar tres veces con agua destilada estéril y permitir su secado sobre papel absorbente estéril.

Adicionar agua destilada estéril a una caja Petri estéril y colocar de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco. Incubar durante 72 horas a 18°C a 25°C bajo oscuridad y condiciones de al menos 80% de humedad (Se recomienda sellar la caja con Parafilm o similar para evitar la desecación), revisar constantemente los crecimientos para su aislamiento (Abad *et al.*, 2019).

Incubación en medios de cultivo selectivos

Realizar el mismo procedimiento que en la técnica de incubación en papel secante, con la diferencia de sembrar de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco en dos cajas Petri con medio de cultivo selectivo PARPH o NARPH (**Cuadro 1**), dejar incubar a 18°C a 25°C bajo oscuridad durante 72 horas, revisando constantemente los crecimientos para su aislamiento (Abad *et al.*, 2019; Plancarte-Soto *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Preparación medio selectivo PARPH / NARPH

Ingredientes	Cantidad	Preparación para 1 L de medio
Agar, harina de maíz	17 g	Adicionar en 1 L de agua destilada, la cantidad de agar con harina de maíz indicada, autoclave a 121°C/15 min. En un vial de 2 ml con agua destilada estéril disolver la ampicilina, himexazol y PCNB. Disolver en otro vial la Pimaricina. Disolver la Rifampicina en una solución de etanol al 95%. Enfriar a 45-50°C y agregar las suspensiones de antibióticos previamente preparados.
Himexazol	50 mg	
Pimaricina	10 mg	
Ampicilina	250 mg	
Rifampicina/ Natamicina	10 mg / 20 mg	
PCNB	100 mg	

Nota: el Himexazol puede inhibir el crecimiento de especies de *Pythium* y *Mortierella*, así como de *Phytophthora cactorum*, *P. infestans*, *P. megasperma*, *P. phaseoli*, *P. porri* y *P. syringiae*. La luz favorece la producción de esporangios, pero los antibióticos son sensibles a la luz (Abad et al., 2019).

Obtención de cultivos puros

A partir de material vegetal o del crecimiento del hongo en cámara húmeda o medio de cultivo, con un microscopio estereoscópico observar el desarrollo micelial y estructuras características del género *Phytophthora* y obtener cultivos puros en medio de cultivo CMA, V8, y MEA (**Cuadro 2**), con o sin antibióticos añadidos, incubar por al menos 7 días a 18 a 25 °C en ausencia de luz. La presencia de oogonios, anteridios u oosporas puede observarse después de 14 hasta 21 días a 20 ± 1 °C en obscuridad (Kennedy y Duncan, 1995). Elaborar montajes con cinta adhesiva en medio con glicerina deshidratada al 50%, para la observación de las estructuras al microscopio compuesto y realizar la medición de las estructuras.

Cuadro 2. Medios de cultivo generales para aislamiento de *Phytophthora*

Medio	Ingredientes/cantidad	Preparación para 1 L de medio
CMA	Difco Agar harina de maíz /17 g	Adicionar en 1 L de agua destilada, la cantidad de CMA indicada. Autoclave a 121°C/15 min.
V8	Jugo V8 / 200 ml CaCO ₃ /2.5 g Agar / 18 g	Mezclar el CaCO ₃ con el jugo V8, centrifugar para clarificar (5 min a 2000 rpm), descartar el precipitado y al resto ajustar el volumen a 1L, agregar el agar. Autoclave a 121°C/15 min.
MEA	Extracto de malta / 9.0 g Agar / 10 g	Mezclar los ingredientes en 1 L de agua destilada. Autoclave a 121°C /15 min

Nota: También se pueden utilizar otros medios de cultivo recomendados en la literatura para el crecimiento y esporulación de especies de *Phytophthora*, por ejemplo: agar centeno, frijol agar, V8-centeno, agar zanahoria al 5%, frijol lima fresco y chícharo.

Interpretación de resultados

Para reportar una identificación positiva a *P. fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* o *P. erythroseptica*, se requiere la detección, observación de colonias y estructuras que correspondan con la descripción morfológica de la especie reportada en la literatura (Gallegly, 2008; Abad *et al.*, 2019). De ser necesario el diagnóstico se debe corroborar molecularmente.

Si no se encuentra crecimiento de hongos con características de *Phytophthora*, deberá realizarse la corroboración a partir de tejido vegetal.

Corroboración molecular

Como prueba de determinación y/o corroboración se deben analizar las secuencias de la región ITS del rDNA y del citocromo oxidasa subunidad I (*COI*). Para la extracción de DNA a partir de cultivos puros se puede utilizar la metodología propuesta por Ceniz (1992) modificada, descrita por Senasica (2018a), y para tejido vegetal (raíces), puede utilizarse el buffer de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1987; Bonants *et al.*, 1997) o bien mediante un Kit de extracción recomendado para oomycetos (Abad *et al.*, 2019).

Utilizar la región ITS con los iniciadores ITS5 e ITS4 indicados en el Cuadro 3 (White *et al.*, 1990) y para la región *COI* los iniciadores COIF-1 y COIR-1 (Plancarte-Soto *et al.*, 2017; Abad *et al.*, 2019). Se recomienda combinar los iniciadores reverse ITS4 y forward D6, para la extracción de ADN directa de tejido vegetal, esta combinación genera un producto de la región ITS para *Phytophthora* y géneros relacionados del orden Peronosporales, evitando así la amplificación del DNA de la planta (Bonants *et al.*, 1997; Cooke *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Iniciadores para la corroboración molecular de *Phytophthora* spp. por PCR punto final

Patógeno	Iniciadores	Secuencia (5' -3')	Tamaño de producto (pb)
<i>Phytophthora</i> spp.	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	~ 800
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
	DC6	GAGGGACTTTGGGGTAATCA	
	COIF-1	TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC	727
	COIR-1	RRHWACKTGACTDATRATACCAAA	

Los números de accesoión de las secuencias de referencia para *P. fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* y *P. erythroseptica*; para las regiones ITS y *COI* se muestran en el Cuadro 4 (Abad *et al.*, 2019; Cooke *et al.*, 2000).

Cuadro 4. Acciones de referencia para *P. fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* y *P. erythroseptica*; para las regiones ITS y COI.

Espece	Región de la secuencia	Accesión de referencia
<i>P. fragariae</i>	ITS	MG865494
	COI	MH136890
<i>P. rubi</i>	ITS	MG865584
	COI	MH136976
<i>P. citricola</i>	ITS	AF266788, MG865475
	COI	MH136871
<i>P. erythroseptica</i>	ITS	AF266797, MG865486
	COI	MH136882

Realizar un alineamiento múltiple y análisis filogenético para determinar si hay homología $\geq 99\%$ de similitud entre las secuencias de la muestra problema con las secuencias de referencia.

Se considera como resultado positivo a *P. fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* o *P. erythroseptica*, cuando en el análisis filogenético las secuencias de la muestra problema se agrupen en el mismo cluster que alguna de las secuencias de referencia; además, ambas deben ser homólogas o con mayor similitud respecto al resto de especies que conforman el grupo, tanto para la región ITS como el gen COI.

Se considera como resultado negativo a *P. fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* o *P. erythroseptica* cuando en el análisis filogenético las secuencias de la muestra problema no se agrupen en el mismo cluster que las secuencias de referencia, o de agruparse, estas sean homólogas o con mayor similitud hacia otras especies que no son de interés en frutillas.

Nota: se recomienda que el diagnóstico molecular se realice bajo los siguientes escenarios: cuando los síntomas estén relacionados con oomycetes y no haya crecimiento en medio selectivo; y cuando la caracterización morfométrica sea insuficiente para distinguir especies cercanas.

En caso de resultado positivo deberá conservar:

- Evidencia fotográfica de los signos y síntomas, aislamientos y de las estructuras del hongo.
- Preservación del tejido vegetal sintomático a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 3 meses posteriores a la identificación.
- Montajes permanentes, donde se encuentren las estructuras distintivas del hongo, como evidencia de la identificación morfométrica.
- DNA obtenido, en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de ser posible a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Registro de los resultados de las pruebas moleculares (fotografías del gel y formatos de secuencias).
- Conservar el aislamiento puro, no realizar transferencias continuas del aislamiento, utilizando técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo.

Cuando ocurran primeras detecciones de los patógenos en zonas libres, se debe llevar a cabo la corroboración de los resultados por parte del CNRF, para esto se deberá enviarse lo siguiente:

- Informe técnico con descripción detallada y evidencia de las técnicas utilizadas para el diagnóstico.
- Cultivos puros monospóricos de no más de 8 días de crecimiento a la recepción en el CNRF, en tres medios de cultivo (PDA, CMA y V8).
- Montajes permanentes con las estructuras necesarias para la identificación morfológica.
- DNA del hongo, con soporte documental de la evaluación de la calidad (valor de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , y concentración).
- Imagen de geles
- Archivos generados por secuenciación Sanger con ambos oligonucleótidos en formato. ab1 con su respectivo electroferograma.
- Evidencias del alineamiento de secuencias o árbol filogenético.

REFERENCIAS

- Abad, Z.G., Burgess T., Bienapfl J.C., Redford A.J., Coffey M., and Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for Phytophthora Science and Management, and World Phytophthora Collection. <https://idtools.org/id/phytophthora/index.php> <01.10.2021>
- Abad, G.Z. 2019a. Fact sheet: *Phytophthora fragariae*. IDphy: molecular and morphological identification of *Phytophthora* bases on the types. Vickie Brewster, USDA-APHIS-PPQ [Fotografía]. <http://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=7944>
- Abad, G.Z. 2019b. Fact sheet: *Phytophthora rubi*. IDphy: molecular and morphological identification of *Phytophthora* bases on the types. Krysta Jennings and Leandra Knight, USDA-APHIS-PPQ [Fotografía]. <http://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=8011>
- Abad, G.Z. 2019c. Fact sheet: *Phytophthora citricola*. IDphy: molecular and morphological identification of *Phytophthora* bases on the types. USDA-APHIS-PPQ-S&T Beltsville laboratory. E.U.A. [Fotografía]. <http://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=7931>
- Abad, G.Z. 2019d. Fact sheet: *Phytophthora erythroseptica*. IDphy: molecular and morphological identification of *Phytophthora* bases on the types. USDA-APHIS-PPQ-S&T Beltsville laboratory. E.U.A. [Fotografía]. <http://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=7939>
- Adams, T.M, Armitage A.D., Sobczyk, M.K., Bates, H.J., Tabima, J.F., Kronmiller, B.A, Tyler, B.M., Grünwald, N.J., Dunwell, J.M., Nellist, C.F., and Harrison, R.J. 2020. Genomic investigation of the strawberry pathogen *Phytophthora fragariae* indicates pathogenicity is associated with transcriptional variation in three key races. *Frontiers in microbiology*, 11:1-17 DOI: 10.3389/fmicb.2020.00490
- André Bolay, 2018. St. Fédér. de Recherches Agronomiques de Changins, Bugwood.org. [Fotografía]. <https://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=12164>
- Bonants P., Hagenaar- de Weerd M., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D. and Duncan, J. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 345-355.
- Cenis, L. J. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9): 2380. doi: 10.1093/nar/20.9.2380.
- Coffey, M., Oudemans, P., and Ouimette, D. 1988. *Phytophthora citricola*: another Cause of Avocado Decline. *California Avocado Society*, 72: 127-131.

- Cooke, D.E.L., Duncan, J.M. and Unkles, S. 1995. Diagnosis and detection of *Phytophthora fragariae* in raspberry and strawberry. Bulletin EPPO, 25: 95-98.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier and C.M. 2000. A Molecular Phylogeny- of *Phytophthora* and Related Oomycetes. Fungal Genetics and Biology. 30: 17-32.
- Cooke D.E.L., Young V., Guy G., and Duncan, J.M., 2004. Validation and exploitation of a PCR-based diagnostic for detecting *Phytophthora* in strawberry and raspberry [poster] SCRI Scotland. https://www.hutton.ac.uk/webfm_send/344
- Doyle, J.J. y Doyle, L.J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- Erwin, D.C., y Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota, 562.
- Fernández-Pavía, S.P., Díaz-Celaya, M. and Rodríguez-Alvarado, G. 2013. *Phytophthora* in Mexico. En: Lamour, K. (Ed.), *Phytophthora a global perspective*. CABI. Wallingford. 215-221 pp.
- Gallegly M.E. 2008. *Phytophthora* Identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press. 158 pp.
- Gigot, J., Walters, T.W. and Zasada, A. I. 2013. Impact and Occurrence of *Phytophthora rubi* and *Pratylenchus penetrans* in Commercial Red Raspberry (*Rubus idaeus*) Fields in Northwestern Washington. International Journal of Fruit Science. 13: 357-372.
- Hickman, C. J. 1941. The Red Core Root Disease of The Strawberry Caused By *Phytophthora Fragariae* n. sp. Journal of Pomology and Horticultural Science, 18: 89-118, DOI: 10.1080/03683621.1941.11513556
- Ho, H.H. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. Journal of Bacteriology & Mycology 6:00174 DOI: 10.15406/jbmoa.2018.06.00174
- Ilieva, E., Arulappan, F.X., and Pieters, R. 1995. *Phytophthora* root and crown rot of raspberry in Bulgaria. European Journal of Plant Pathology, 101: 623-625.
- Kennedy, D. and Duncan, J.M. 1995. A papillate *Phytophthora* species with specificity to *Rubus*. Mycological Research, 99: 57-68.
- Jay W. Pscheidt, 2018. Raspberry (*Rubus* spp.)-Root Rot. Pacific Northwest Pest Management Handbooks [Fotografía]. <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/host-disease/raspberry-rubus-spp-root-rot>
- Liberato, J.R. 2006. Strawberry red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) Available online: PaDIL - <http://www.padil.gov.a>

- Liette Lambert. 2016. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) [Fotografía]. <https://www.agrireseau.net>
- Jones, L 2017. Raspberry (*Rubus* spp.)-Root Rot. Pacific Northwest Pest Management Handbooks. [Fotografía]. <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/host-disease/raspberry-rubus-spp-root-rot>
- Man in't Veld, W.A. 2007. Gen flow analysis demonstrates that *Phytophthora fragariae* var. *rubi* constitutes a distinct species, *Phytophthora rubi* com. nov. Mycologia, 99: 222-226
- OSU Plant Clinic Collection, 2011. Raspberry (*Rubus* spp.)-Root Rot. Pacific Northwest Pest Management Handbooks. [Fotografía]. <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/host-disease/raspberry-rubus-spp-root-rot>
- Pattinson, J.A., Wilcox, W.F. and Weber, C.A. 2004. Assessing the Resistance of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Genotypes to *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in Hydroponic Culture. Horticultural Science, 39: 1553-1556.
- Petersen, A.B. and Rosendahl, S. 2000. Phylogeny of the Peronosporomycetes (Oomycota) based on partial sequences of the large ribosomal subunit (LSU rDNA). Mycological Research, 104: 1295-1303.
- Pethybridge, G.H. 1913. On the rotting of potato tubers by a new species of *Phytophthora* having, a method of sexual reproduction hitherto undescribed. Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society 13: 529-565.
- Thibodeau, O. P. 2021. Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA) 2700, rue Einstein, Sainte Foy QC, Canada [Fotografía]. <https://irda.qc.ca> › telechargement › publications.
- Plancarte-Soto, A., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, Y.L., Pedraza-Santos, M.E., López- Pérez, L., Díaz-Celaya, M. y Fernández- Pavía, S. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 8: 1867-1880.
- Ruth D'urban-Jackson. 2018. RSK ADAS Ltd., UK [Fotografía]. <https://gd.eppo.int/taxon/PHYTFU/photos>
- Sawada K. 1927. Descriptive catalogue of the Formosan fungi III. Report of the Department of Agriculture, Government Research Institute of Formosa 27: 1-62.
- Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Guignardia bidwellii*, Anamorfo: *Phyllosticta ampellicida* (Pudrición negra de la vid) [Versión 1.0]. Autor.
- SCRI-Dundee, 2021. Scottish Crop Research Institute, Bugwood.org [Fotografía]. <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=0454033>

- Stewart, J. E., Kroese, D., Tabima, J. F., Larsen, M. M., Fieland, V. J., Press, C. M., Zasada, I. A., and Grünwald, N. J. 2014. Pathogenicity, fungicide resistance, and genetic variability of *Phytophthora rubi* isolates from raspberry (*Rubus idaeus*) in the Western United States. *Plant Disease*, 98:1702-1708.
- Tabima J.F., Coffey M.D., Zazada I.A., and Grünwald N.J. 2018. Populations of *Phytophthora rubi* Show little differentiation and high rates of migration among states in the western United States. *MPMI* 31:614-622 DOI: 10.17957/IJAB/15.1758
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycology*, 92: 1-22.
- Washington State University. 2021. Integrated pest Management for Raspberries [Fotografía]. <http://whatcom.wsu.edu/ipm/manual/rasp/phytophthora.html>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, T., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Ed. By Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. New York: Academic Press Inc. 315-321.
- Wilcox, W.F. 1989. Identify virulence, and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. causing root rot of raspberry in New York. *Phytopathology* 79:93-101.
- Wilcox, W.F., Scott, P.H., Hamm, P.B., Kennedy, D.M., Duncan, J.M., Brasier, C.M., and Hansen, E.M. 1993. Identify of a *Phytophthora* species-attacking raspberry in Europe and North America. *Mycological Research*. 97: 817-831.
- Wilcox, W.F. 2016. Fact Sheet: *Phytophthora* Root Rot of Raspberry. Agriculture and Natural Resources. College of Food, Agricultural, and Environmental Sciences. Ohio State University. E.U.A. <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-14>

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de *Phytophthora fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* y *P. erythroseptica* en cultivos de fresa y frambuesa, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el procedimiento de forma correcta.

Forma recomendada de citar

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2021. Ficha técnica para el diagnóstico de *Phytophthora fragariae*, *P. rubi*, *P. citricola* y *P. erythroseptica* en cultivos de fresa y frambuesa. Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Ángel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa del Departamento de Fitopatología	Revisó
M. en C. Nayeli Carrillo Ortiz Técnico del Laboratorio de Micología M. en C. Adrián González Saucedo Técnico del Laboratorio de Micología	Elaboró

CONTACTO

lab.micologia@senasica.gob.mx
Teléfono y extensión (55) 59051000 ext. 51424, 51373

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control
en el Senasica

55 5905.1000

Ext. 51648

gob.mx/agricultura

gob.mx/senasica



“Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa”