



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**UMBRAL DE DAÑO DE  
*Phytophthora drechsleri* EN  
PRODUCCIÓN HIDROPÓNICA  
DE LECHUGA**

**CLAUDIA MARÍA SOSA HERNÁNDEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2014**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y  
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

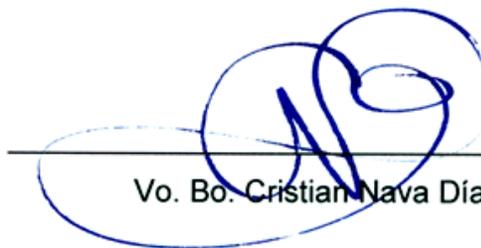
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Claudia María Sosa Hernández**, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Cristian Nava Díaz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Umbral de daño de *Phytophthora drechsleri* en producción hidropónica de lechuga**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 20 de Marzo de 2014.



---

Claudia María Sosa Hernández



---

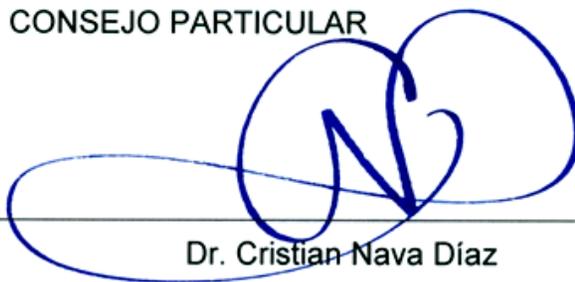
Vo. Bo. Cristian Nava Díaz

La presente tesis, titulada “Umbral de daño de *Phytophthora drechsleri* en producción hidropónica de lechuga”, realizada por la alumna **Claudia María Sosa Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



---

Dr. Cristian Nava Díaz

ASESOR



---

M. C. Alfonsina Judith Hernández

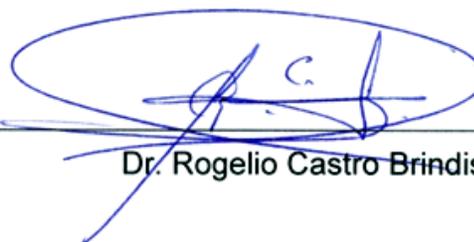
ASESOR



---

Dr. Eduardo Molina Gayosso

ASESOR



---

Dr. Rogelio Castro Brindis

Montecillo, Texcoco, México, 20 de marzo de 2014.

# “UMBRAL DE DAÑO DE *Phytophthora drechsleri* EN PRODUCCIÓN HIDROPÓNICA DE LECHUGA”

Claudia María Sosa Hernández, M. C., Colegio de Postgraduados, 2014

## RESUMEN

La medición y estimación de variables que permitan visualizar la dinámica de las poblaciones plaga en función del medio ambiente y sus repercusiones en la sanidad de las plantas, es una de las herramientas de decisión en las que los productores se pueden apoyar para la implementación de programas de manejo integrado. Por ello se realizó la comparación de la sensibilidad de tres métodos de cuantificación para la detección de zoosporas de *Phytophthora drechsleri* en muestras de agua. Se determinó que es posible detectar cantidades más pequeñas de zoosporas mediante la realización de pruebas ELISA que con la cuantificación en hematocitómetro o la siembra en medio de cultivo. Con los datos de absorbancia obtenidos a partir de pruebas ELISA se realizaron modelos matemáticos para la estimación del número de zoosporas por mililitro en muestras de agua. Estos modelos se emplearon para monitorear la cantidad de inóculo presente en un sistema simulado de producción hidropónica de lechuga en balsas flotantes. Con los datos de número de zoosporas, número de plantas muertas y temperatura de la solución, medidos cada 12 hrs., se generaron modelos de predicción que permitieran estimar el número de plantas muertas y predecir la cantidad de zoosporas presentes en una muestra de agua. Se obtuvieron 1295 modelos para estimar el número de plantas muertas, de los cuales 6 presentaron un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superior al 0.7; y 143 modelos para la estimación del número de zoosporas, 50 de ellos con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) mayores a 0.90. Los modelos más confiables pusieron de manifiesto que las variaciones en temperatura de la solución dentro del rango entre los 16 y los 24°C no son determinantes para la formación de zoosporas ni para el desarrollo de epidemias causadas por *Phytophthora drechsleri*.

**Palabras Clave:** Manejo Integrado de Plagas, oomycetes, cuantificación, hematocitómetro, temperatura de la solución, modelo de predicción.

# “UMBRAL DE DAÑO DE *Phytophthora drechsleri* EN PRODUCCIÓN HIDROPÓNICA DE LECHUGA”

Claudia María Sosa Hernández, M. C., Colegio de Postgraduados, 2014

## ABSTRACT

Measurement and estimation of variables that allow displaying the dynamic of pest population depending on the environment and its impact on plant health, is one of the tools of decision in which producers can support for the implementation of Integrated Pest Management programs. That is why we compared the sensitivity of three methods of quantification for detecting *Phytophthora drechsleri* zoospores in water samples. It was determined that it is possible to detect smaller amounts of zoospores by ELISA tests that by hemocytometer counts or the quantification of colonies in culture medium plates. With the absorbance data obtained from ELISA tests, mathematical models were designed for estimating the number of zoospores per milliliter in water samples. These models were used to monitor the amount of inoculum present in a simulated lettuce production floating hydroponic system. With the number of zoospores data, number of dead plants and solution temperature measured every 12 hrs., prediction models that allow estimating the number of dead plants and predict the amount of zoospores present in a water sample were generated. There were obtained 1295 models to estimate the number of dead plants, of which 6 had a coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.7. And to estimate the number of zoospores we obtained 143 models, 50 of them with coefficients of determination ( $R^2$ ) higher to 0.90. The most reliably models revealed that variations in temperature of the solution within the range between 16 and 24 ° C are not decisive for the formation of zoospores or development of epidemics caused by *Phytophthora drechsleri*.

**Key Words:** Integrated Pest Management, oomycetes, quantification, hemacytometer, solution temperature, prediction model.

Con cariño para todas las personas que siempre han estado a mi lado,  
brindándome su apoyo incondicional a cada momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca educativa para desarrollar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en sus aulas y aprovechar las enseñanzas de las personas que laboran en esta institución.

A la empresa Next Vegetales S.A. de C. V. por las contribuciones económicas y técnicas que permitieron el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario y al Laboratorio de Ecología de Enfermedades de la Raíz por facilitarme el espacio, el material y el equipo necesario para lograr mis objetivos de aprendizaje e investigación.

Al Dr. Roberto García Espinosa (q.e.p.d) por exponerme a puntos de vista y corrientes de pensamiento diferentes, por mostrarme que el conocimiento no tiene límites y que la naturaleza es mucho más compleja de lo que se cree.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su infinita paciencia, su buena disposición y apoyo incondicional, que hacen de él un excelente profesor y una excelente persona.

A la M.C. Alfonsina Judith Hernández por su amistad, sus consejos, apoyo y orientación durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Eduardo Molina Gayosso, por sus cuestionamientos y enseñanzas, que acrecentaron en mi la necesidad de conocimiento.

Al Dr. Rogelio Castro Brindis, por su disposición, tiempo y asesoría para el presente trabajo de investigación.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
LAS PLAGAS Y SU MANEJO .....	2
EL MANEJO INTEGRADO .....	5
NIVEL DE DAÑO ECONÓMICO, UMBRAL ECONÓMICO Y SU APLICACIÓN EN EL CONTROL DE PLAGAS.....	7
LA DIFICULTAD DEL ESTUDIO DE ENFERMEDADES DE LA RAÍZ .....	10
LA HIDROPONIA COMO ALTERNATIVA A LOS PROBLEMAS CON ORIGEN EN EL SUELO .....	11
LOS PROBLEMAS FITOPATOLÓGICOS EN SISTEMAS HIDROPÓNICOS .....	17
LOS OOMYCETES.....	20
<i>Phytophthora drechsleri</i> , CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN HIDROPÓNICA DE LECHUGA .....	26
Taxonomía.....	29
Características Generales .....	26
Filogenia.....	29
Medio Ambiente .....	30
Plantas Hospederas y Distribución.....	31
Síntomas .....	33
Control.....	34
CONTROL QUÍMICO .....	34
CONTROL BIOLÓGICO.....	36
CONTROL CULTURAL.....	36
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
HIPOTESIS .....	40
METODOS.....	41

MUESTREO.....	41
AISLAMIENTO .....	42
PURIFICACIÓN .....	42
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD .....	42
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA-MOLECULAR .....	43
PRUEBA DE SINERGISMO .....	45
DETERMINACIÓN DEL UMBRAL DE DAÑO .....	46
Métodos de cuantificación .....	46
Determinación del umbral.....	49
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 52
MUESTREO.....	52
AISLAMIENTO .....	53
PURIFICACIÓN .....	53
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD .....	54
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA-MOLECULAR .....	57
PRUEBA DE SINERGISMO .....	66
DETERMINACIÓN DEL UMBRAL DE DAÑO .....	68
Métodos de cuantificación .....	68
Determinación del umbral.....	77
 CONCLUSIONES.....	 84
 LITERATURA CONSULTADA .....	 85

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ciclos de temperatura para la amplificación de ADN.....	44
Cuadro 2. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha<0.05$ ) del área bajo la curva del progreso de la enfermedad de los aislamientos inoculados en plántulas de lechuga hidropónica tipo Boston. ....	56
Cuadro 3. Características de los aislamientos 13c, 14c y 15c obtenidos con medio selectivo a <i>Phytophthora spp.</i> Las medias provienen de 25 observaciones por cada aislamiento y las medidas están en micrómetros.....	57
Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha<0.05$ ) del área bajo la curva del progreso de la enfermedad de <i>Phytophthora drechsleri</i> , <i>Pythium dissotocum</i> , y la combinación de ambos al ser inoculados en plántulas de lechuga tipo Boston.....	67
Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha<0.05$ ) de las diferentes concentraciones de zoosporas dentro de cada método de cuantificación.....	69
Cuadro 5. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha<0.05$ ) de los métodos de cuantificación en cada una de las concentraciones de zoosporas.....	69
Cuadro 6. Coeficientes de correlación de Pearson entre las absorbancias de las muestras y las de los controles negativo y blanco.....	70
Cuadro 7. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha<0.05$ ) de las absorbancias obtenidas a diferentes tiempos de medición.....	70
Cuadro 8. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha<0.05$ ) de las absorbancias de diferentes concentraciones de zoosporas a diferentes tiempos de medición. ....	71
Cuadro 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre las absorbancias tomadas a distintos tiempos y los métodos de cuantificación empleados para estimar las concentraciones de zoosporas en las suspensiones evaluadas. ....	72

Cuadro 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre las absorbancias de las muestras y las de los controles negativo y blanco durante la determinación del umbral. ....	77
Cuadro 11. Parámetros estadísticos de los modelos diseñados para la estimación de plantas muertas de lechuga tipo Boston por <i>Phytophthora drechsleri</i> en sistemas hidropónicos. ....	79
Cuadro 12. Parámetros estadísticos de los modelos diseñados para la estimación de zoosporas de <i>Phytophthora drechsleri</i> presentes en la fase líquida de sistemas hidropónicos. ....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de producción de lechuga hidropónica en bandejas flotantes..	41
Figura 2. Síntomas de pudrición de raíz en lechugas hidropónicas tipo Boston de 15(a), 25(b), 35(c) y 45(d) días después de la siembra. ....	52
Figura 3. Desarrollo de micelio a partir de fragmentos de raíz de lechuga hidropónica tipo Boston en medio selectivo a <i>Pythium spp.</i> (izq.) y <i>Phytophthora spp.</i> (der.).....	53
Figura 4. Aislamientos purificados por punta de hifa de colonias formadas a partir de fragmentos de raíz de lechuga hidropónica tipo Boston en medio selectivo a <i>Pythium spp.</i> (izq.) y <i>Phytophthora spp.</i> (der.).....	53
Figura 5. Curvas promedio del progreso de la enfermedad de los aislamientos al ser inoculados en plántulas de lechuga hidropónica tipo Boston. ....	54
Figura 6. Re-aislamiento de los agentes causales de la pudrición de raíz de plántulas de lechuga tipo Boston en pruebas de patogenicidad.....	56
Figura 7. Formación de roseta y crecimiento micelial a 35°C de los aislamientos obtenidos con medio selectivo a <i>Phytophthora spp.</i> .....	58
Figura 8. Estructuras observadas de los aislamientos 13c, 14c y 15c obtenidos con medio selectivo a <i>Phytophthora spp.</i> A. Hinchamientos hifales. B. Esporangióforo con hinchamiento en la base del esporangio. C. Esporangio vacío con proliferación de esporangióforo en su interior. D. Oospora plerótica con anteridio anfígeno. ....	58
Figura 9. Estructuras observadas de los aislamientos 2c, 3c, 5c, 6c, 7c, 9c y 10c., obtenidos con medio selectivo a <i>Pythium spp.</i> I. Esporangio. II. Vesículas con zoosporas en su interior. III. Oogonio terminal. IV. Apresorio.....	61
Figura 10. Curvas promedio del progreso de la enfermedad de <i>Phytophthora drechsleri</i> (PHY), <i>Pythium dissotocum</i> (PYT), y la combinación de ambos (PHY+PYT) al ser inoculados en plántulas de lechuga tipo Boston. ....	67
Figura 11. Modelo de regresión lineal para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 60 min. ....	74

Figura 12. Modelo de regresión exponencial para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 60 min. ....	74
Figura 13. Modelo de regresión lineal para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 90 min. ....	75
Figura 14. Modelo de regresión exponencial para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 90 min. ....	75
Figura 15. Modelo de regresión lineal para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 120 min. ....	76
Figura 16. Modelo de regresión exponencial para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 120 min. ....	76

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas hidropónicos surgieron como una alternativa para evitar los problemas que implica la producción en suelo, y aunque se han tenido grandes avances en la mejora de la productividad, el elemento fitosanitario se ha convertido en una de sus principales limitantes.

Microorganismos como *Pythium spp.* y *Phytophthora spp.*, capaces de sobrevivir y dispersarse rápidamente en ambientes acuáticos, son algunas de las principales amenazas con las que los productores de alimentos hidropónicos tienen que lidiar constantemente. La rápida devastación de las plantas en prácticamente todas las etapas del cultivo, junto con la dificultad para controlar estos microorganismos los convierte en un punto de atención para la investigación y la creación de nuevas tecnologías que permitan el desarrollo exitoso del cultivo con el mínimo impacto ecológico.

El Manejo Integrado es considerado la forma más eficiente para el control de organismos plaga, ya que mediante la aplicación de principios ecológicos se logra mantener a las poblaciones dentro de ciertos límites que permiten que el cultivo se desarrolle adecuadamente sin tener pérdidas económicas causadas por problemas sanitarios.

La determinación de estos límites está basada en el monitoreo constante tanto de las condiciones ambientales como de la fenología del cultivo y de las densidades poblacionales de los organismos plaga, y constituye el objeto de estudio en el presente trabajo, enfocado a la determinación de técnicas de monitoreo de *Phytophthora drechsleri* en muestras de agua y la relación cuantitativa de este microorganismo con la pudrición de raíz en lechugas producidas en sistemas hidropónicos de bandejas flotantes.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## LAS PLAGAS Y SU MANEJO

El término “plaga” se define como cualquier organismo perjudicial para el hombre. Las plagas agrícolas son organismos que interfieren con el valor de los productos provenientes de los cultivos con los que se encuentran asociados, al alterar el funcionamiento normal de las plantas que las hospedan. Los principales organismos plaga de las plantas son hongos, virus, bacterias, nematodos, insectos, malezas, roedores, moluscos y pájaros. (Glass, 1976; López, 1985b; Melgarejo *et al.*, 2005).

Desde el descubrimiento de la agricultura, las plagas han sido uno de los problemas más críticos en la producción agrícola, ya que además de reducir los volúmenes de producción y la calidad del producto, pueden causar pérdidas parciales o totales de los cultivos (ONU, 2001; Gómez *et al.*, 2011).

Para reducir las pérdidas causadas por las plagas en forma eficiente, económica y con el menor impacto ambiental posible, es indispensable integrar diversas estrategias de manejo y efectuarlas en el momento oportuno. Así, a cualquier procedimiento que se utiliza para reducir las poblaciones de plagas o evitar sus efectos perjudiciales se le denomina “Control de Plagas” (Glass, 1976; Cisneros, 1992; ONU, 2001).

Si las prácticas adecuadas de protección de los cultivos se inician incluso antes de la siembra y se siguen hasta que el producto llega al consumidor, las pérdidas en productos agrícolas por el ataque de plagas pueden reducirse al mínimo. Es por ello que los primeros factores a considerar para el control de plagas inician con una adecuada selección de variedades con resistencia a las plagas más comunes, el establecimiento del cultivo en fechas oportunas, el empleo de

densidades adecuadas de siembra, la desinfección de herramientas y equipos, una apropiada preparación del suelo, nutrición balanceada del cultivo, rotación permanente e intercalado de cultivos, el uso de barreras vivas, la aplicación de extractos repelentes, el uso de agentes biológicos de control, el establecimiento de trampas, y un buen manejo del agua, entre otras. (López, 1985a; ONU, 2001; Gómez *et al.*, 2011).

Así, por ejemplo, el uso de una buena densidad de siembra y un espacio adecuado entre plantas mejora sustancialmente el microclima del suelo de la parcela, reduciendo la humedad relativa y disminuyendo la propagación de hongos y bacterias fitopatógenas entre las plantas. El uso de sistemas de riego dirigidos, como es el caso del riego por goteo, además de optimizar el uso del agua, reduce considerablemente los daños por enfermedades, especialmente en las hojas inferiores, al reducir la humedad relativa y evitar la deposición de agua sobre las hojas. La limpieza y desinfección antes de cada labor del motocultor, arado u otro implemento, puede evitar la contaminación con nematodos, hongos y bacterias provenientes de otras parcelas (Gómez *et al.*, 2011).

La eficiencia de estas estrategias se verá afectada no solo por la oportunidad de su implementación, sino también por el tipo de patógeno y las características propias del mismo, por lo que es necesario conocer las modalidades de ataque de la plaga en cuestión, sus hábitos alimenticios, su ciclo de vida, sus posibles antagonistas, los factores ambientales que propician su desarrollo, la etapa del cultivo en la que ocasiona el mayor daño, así como la etapa de su ciclo de vida en la que es más susceptible a las estrategias que se apliquen, ya que un mejor conocimiento de la biología y epidemiología del patógeno al que va dirigido el control, hará que éste sea siempre más eficaz (Melgarejo *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2011).

Con el desarrollo de sistemas de producción cada vez más intensivos, el impacto de las plagas insectiles y enfermedades de origen biótico se ha incrementado,

dificultando cada vez más su manejo y control, orillando al productor a tomar acciones en función directa de la plaga, idealizando su máxima mortalidad o erradicación temporal, y dejando un poco de lado el resto de los elementos que participan en el proceso de desarrollo de una epidemia (Glass, 1976; Cisneros, 1992; ONU, 2001).

Así, en la guerra contra las plagas, la agricultura moderna ha tomado como principal método de control la aplicación de plaguicidas, los cuales son un método de acción rápida, que actúa sobre las poblaciones plaga de manera devastadora. Desafortunadamente, la mayoría de los plaguicidas no son selectivos, y afectan tanto a la plaga que se quiere controlar a otros organismos, entre los cuales se encuentran organismos benéficos y enemigos naturales tanto de la plaga que se desea controlar como de otras, alterando de esa manera la regulación natural de las poblaciones en el agroecosistema. Ello deriva no solo en un retorno potencial de la plaga inicial, sino también en el desarrollo de nuevas poblaciones de organismos plaga, que hasta entonces no se habían comportado como tal, pero que ahora, con la ausencia de sus respectivos enemigos naturales se reproducen sin limitaciones a muy altos niveles provocando daños en los cultivos cada vez más severos (Gómez y Zavaleta, 2001; Porcuna *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2011).

Ligado a esto, es de amplio conocimiento que el uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura genera resistencia en las plagas, de tal manera, que los que utilizan el control químico como única herramienta, muy pronto se ven envueltos por una u otra causa, en una espiral que les obliga a utilizar cada vez mayores cantidades de productos químicos para controlar los problemas originales, incrementando considerablemente los costos de producción (Gómez y Zavaleta, 2001; Porcuna *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2011).

Además, el abuso de plaguicidas y fertilizantes sintéticos contamina el ambiente, llegando a afectar el suelo, las aguas superficiales, las aguas subterráneas,

poniendo en peligro no solo la biodiversidad del planeta tierra sino también la salud humana (Gómez y Zavaleta, 2001; Gómez *et al.*, 2011).

A partir del incremento indiscriminado del uso de agroquímicos y el descubrimiento paulatino de sus repercusiones, nace la necesidad de buscar y desarrollar otras estrategias de manejo de plagas que permitan reducir la cantidad de aplicaciones de plaguicidas en la producción agrícola, y que además garanticen la sanidad de los cultivos para la obtención de productos de calidad, libres de residuos de agroquímicos y amigables con el ambiente (Gómez y Zavaleta, 2001).

## **EL MANEJO INTEGRADO**

A partir del descubrimiento de los efectos negativos del uso indiscriminado de plaguicidas, se han generado tendencias enfocadas a desarrollar sistemas de producción de alimentos de calidad, en cantidad, de una manera rentable, socialmente aceptable y sin dañar el medio ambiente (Viñuela, 2005).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es la alternativa de control más usada para substituir el uso inadecuado de los agroquímicos, dado que permite controlar eficazmente las plagas agrícolas disminuyendo la dependencia en el uso de productos químicos, mediante la aplicación de principios ecológicos para aprovechar al máximo los beneficios de la biodiversidad en la agricultura (Nicholls, 2008; Alatorre, *et al.*, 2012).

En el enfoque del MIP las plagas son parte de un sistema ecológico en el que interactúan con plantas cultivadas y no cultivadas, con otras plagas, con organismos benéficos, con enemigos naturales, y demás seres vivos que habitan la parcela, formando una comunidad biológica compleja, que se encuentra inmersa en un medio ambiente del cual dependen todos ellos. Es decir, las plagas no viven aisladas, cada una de ellas es un componente de un agroecosistema,

que mantiene interacciones con los otros componentes del ecosistema, por lo que es un grave error no tomar en cuenta todos estos factores con los que interactúan para llevar a cabo un control eficiente. Bajo esta concepción, el MIP es un sistema que no pretende eliminar o controlar totalmente las plagas o enfermedades, sino solo mantenerlas en niveles que sean asumibles económica y ecológicamente, con la premisa de que mediante el manejo de los componentes del agroecosistema, se puede dificultar el desarrollo de las plagas o contribuir a su mortandad natural (Glass, 1976; Cisneros, 1992; Alatorre, *et al.*, 2012).

El MIP se basa principalmente en la implementación de prácticas culturales con orientación al control de plagas, así como en la capacidad que tienen las plantas de activar sus mecanismos de defensa para tolerar o resistir cierto nivel de daño sin tener afectaciones significativas en la calidad o volumen de producción, y en la posibilidad de potenciar los métodos naturales de mortandad de las plagas (Alatorre, *et al.*, 2012).

De esta manera, los medios de control físicos que se aplican en el MIP pretenden crear un sistema de producción cerrado con cierto nivel de autorregulación, y apoyándose en los medios de control biológicos se pretende reforzar el equilibrio del sistema reduciendo las poblaciones de aquellos elementos que por las causas que fuesen han adquirido niveles de desarrollo muy altos respecto a otros elementos (Porcuna *et al.*, 2010).

Los programas de manejo integrado deben desarrollarse para cada unidad de producción dependiendo del valor económico de los productos a proteger, de la región, el clima, la complejidad misma del agroecosistema, y de los recursos disponibles, ya que de ello dependerán las estrategias a establecer y el éxito de las mismas (López, 1985a; López, 1985b; Graves *et al.*, 1999; Brechelt, 2004).

De manera concreta, algunos ejemplos de estrategias de control empleadas en el MIP son la utilización de especies vegetales resistentes a plagas, la modificación

del medio ambiente con el establecimiento de barreras vivas, intercalado de cultivos, rotación de cultivos, el manejo de poblaciones plaga con la introducción de organismos estériles, la introducción y establecimiento de enemigos naturales como parasitoides y depredadores, la quema de residuos y únicamente ante situaciones emergentes, el empleo racional de alternativas de control químico que causen el mínimo efecto ecológico (López, 1985b; Brechelt, 2004).

Dado que no se debe de perder de vista la rentabilidad de los sistemas productivos, y en vista de que la aplicación de un programa de MIP se hace buscando la eliminación de los daños económicos causados por las plagas, se puede decidir desde no intervenir, a usar una sola técnica de control o una combinación de varias minimizando siempre el uso del control químico. Ello dependerá en gran medida de que se pueda prever de alguna manera la dinámica de las poblaciones de organismos plaga que se van a presentar durante el ciclo de cultivo, para de esta manera decidir las medidas de control que se van a implementar y hacerlo lo antes posible. Así, en primer lugar se pone énfasis en la utilización de medidas preventivas, en la vigilancia de las poblaciones de las especies plaga importantes y en la aplicación de umbrales económicos, antes de llegar a la aplicación de una medida directa de control encaminada a eliminar la porción de la población plaga que nos está causando pérdidas económicas en el cultivo (López, 1985a; Graves *et al.*, 1999; Viñuela, 2005; Porcuna *et al.*, 2010).

## **NIVEL DE DAÑO ECONÓMICO, UMBRAL ECONÓMICO Y SU APLICACIÓN EN EL CONTROL DE PLAGAS**

Las plantas tienen la capacidad para soportar cierto grado de daño sin reducir su rendimiento ni calidad de la producción. Sin embargo cuando la población plaga sobrepasa ciertos niveles, dependiendo de la variedad, estado de desarrollo, estado nutricional y fisiológico, los volúmenes y calidad de la cosecha pueden disminuir (Cisneros, 1992).

Ya que la presencia de un organismo perjudicial no justifica necesariamente una acción destinada a controlarlo, es esencial establecer técnicas de monitoreo para detectar cambios en las poblaciones plaga que pudieran constituir un problema, así como los límites de infestación que pueden ser tolerados por el cultivo sin que afecte su rendimiento o calidad (López, 1985b; Cisneros, 1992; Meneses, 2011).

Estas densidades críticas de población de organismos plaga son la clave en los programas de Manejo Integrado, ya que brindan información para la toma de decisiones respecto a la aplicación de medidas de control (Cisneros, 1992).

El Nivel de Daño Económico (NDE) se define como la densidad de población de plaga que causa pérdidas económicas suficientes para justificar la aplicación de medidas de control. Es decir, por debajo del NDE el costo derivado de aplicar las medidas de combate excede a las pérdidas causadas por ésta. En términos económicos, si la densidad de la plaga excede ese límite sin que se apliquen medidas de control se producen pérdidas económicas elevadas y si se aplican antes se incurre en un gasto innecesario (Stern *et al.*, 1959; López, 1985a; Cisneros, 1992).

El umbral de acción, umbral de daño económico o umbral económico, es la densidad poblacional de la plaga a la cual las medidas de control deben ser implementadas para prevenir que el incremento en la población continúe y evitar así que alcance el NDE (Stern *et al.*, 1959; Serrano, 2006).

Ambos índices están basados en datos obtenidos a partir de técnicas de monitoreo de la plaga en cuestión, y expresan la densidad de plaga en el cultivo, es decir, el número de organismos, o cantidad de inóculo, por unidad de muestra (planta, hoja, racimo, etc.). Para definirlos se debe tomar en cuenta la susceptibilidad de las variedades, el estado de desarrollo de la planta, el estado biológico de la plaga, la disminución del rendimiento que puede causar, las

condiciones ambientales prevalecientes, entre otros factores (Serrano, 2006; Alatorre, *et al.*, 2012).

Aunque los daños causados por la mayoría de las plagas de las plantas se distinguen por la presencia de algún tipo de síntoma o síntomas que evidencian el número de plantas infectadas o permiten estimar la cantidad de tejido afectado por algún organismo, entre el momento del daño y la aparición de síntomas visibles hay un periodo de tiempo variable que depende entre otros factores de las condiciones ambientales. Es por ello que en algunos casos es posible definir el NDE y el umbral económico a partir de sistemas de pronóstico basados en la medición de las condiciones ambientales potencialmente favorables al desarrollo de la plaga durante la etapa de susceptibilidad del hospedero (Webster, 1982; Arauz, 1998).

En otros casos, dado que la severidad de los síntomas generalmente está relacionada con la producción de inóculo o densidad de población de la plaga, las medidas que nos permitan estimar la cantidad de éste proveen una evaluación buena del progreso de una epidemia (Arneson, 2001).

A pesar de que aparentemente la determinación del NDE y umbral de acción no es sencillo, el uso de los mismos en el MIP es necesario, efectivo y redituable para los productores. Las principales ventajas de su implementación como herramienta de decisión son su facilidad de uso y el hecho de que en la práctica han resultado eficaces en la reducción del número de aplicaciones de plaguicidas sin relegar el combate de la plaga o enfermedad (Arauz, 1998; Alatorre, *et al.*, 2012).

El valor del tanto del NDE como del umbral de acción, no solo está expresado en términos monetarios, está basado en la evaluación de daños potenciales, ecológicos, sociológicos y costos generados por las medidas de control. Se les considera como una medida para preservar la calidad del medio ambiente contra

la contaminación, al priorizar la aplicación oportuna de tácticas de manejo opcionales previo a la necesidad de la aplicación de plaguicidas, contribuyendo a la sustentabilidad del agroecosistema, a la conservación del medio ambiente y a una disminución en los costos de producción, al mismo tiempo que se protege la producción agrícola contra los daños de las plagas (Norgaard, 1976; Webster, 1982; López, 1985a; Cisneros, 1992; Arauz, 1998; Meneses, 2011).

## **LA DIFICULTAD DEL ESTUDIO DE ENFERMEDADES DE LA RAÍZ**

Sobre todo en el caso de plagas insectiles la determinación del NDE y del umbral económico ha sido mucho más fácil de definir, sin embargo cuando se trata de relaciones parasíticas con microorganismos, la determinación se vuelve más compleja. En el caso específico de las enfermedades de la raíz, dado que los patógenos que las inducen residen en el suelo, no es posible la observación directa y constante del progreso de la enfermedad, lo que dificulta el monitoreo y control (Webster, 1982; Arauz, 1998; García, 2010).

La complejidad del suelo como ecosistema junto con las especiales particularidades de los microorganismos, tales como su tamaño microscópico y las dificultades para una diferenciación basada en su morfología, han proporcionado una visión del mundo microbiano edáfico como un verdadero reto. Primero porque las definiciones clásicas de especie no se aplican a los microorganismos dado que muchos no tienen ciclo sexual, por lo que se considera como especie al conjunto de organismos que se parecen tanto entre sí como a sus progenitores. El aspecto morfológico en este caso no es muy útil para encontrar parecidos, ya que morfológicamente muchos microorganismos distintos se parecen demasiado entre sí, de esta forma se tiene que echar mano de las características fisiológicas para definir especies. Otro obstáculo a superar es el hecho de que un mismo microorganismo puede comportarse de maneras muy distintas ante cambios del ambiente, lo que genera la necesidad de mantener

condiciones controladas por lo que es necesario aislar y estudiar los microorganismos preferentemente en un laboratorio (Carrillo, 2003; Nogales, 2005).

A pesar de la importancia que han supuesto los análisis de la diversidad microbiana tanto de organismos benéficos, como fitopatógenos, las dificultades metodológicas hacen que su estudio esté muy rezagado respecto del estudio de otros ambientes. Aunque el uso de técnicas moleculares se ha convertido en una alternativa para los análisis de comunidades microbianas en el suelo, el conocimiento de los microorganismos ha quedado limitado a aquellos pocos que pueden obtenerse en cultivos de laboratorio con medios especialmente formulados para ello. Sin embargo la comparación de recuentos microscópicos directos con los obtenidos en placas de cultivo ha puesto de manifiesto que al menos el 99% de los microorganismos presentes en el suelo son incapaces de crecer en medios de cultivo. Por lo tanto, la mayor parte de la diversidad microbiana que habita el suelo queda fuera del alcance de los métodos de estudio tradicionales, dejando importantes preguntas que resolver en cuanto a la composición y estructura de las comunidades microbianas edáficas, su respuesta a diferentes condiciones ambientales, y por supuesto su papel en el funcionamiento del ecosistema (Carrillo, 2003; Nogales, 2005).

## **LA HIDROPONIA COMO ALTERNATIVA A LOS PROBLEMAS CON ORIGEN EN EL SUELO**

La hidroponía o cultivo sin suelo, puede ser definida como una técnica de cultivo en la cual los nutrientes necesarios para las plantas se suministran a través de soluciones nutritivas, prescindiendo del uso del suelo. Consiste básicamente en utilizar un medio inerte, tal como grava, arena, turba, vermiculita, tezontle o aserrín, como medio de soporte para las plantas, al cual se añade una solución de nutrientes que contiene todos los elementos esenciales necesitados por la planta

para su crecimiento y desarrollo normales (Stanghellini y Rasmussen, 1994; Resh, 2001; Oriz *et al.*, 2009).

Las técnicas hidropónicas permiten reemplazar las funciones que realiza el suelo en la agricultura tradicional, facilitando el cultivo de plantas en condiciones donde el suelo no es favorable para la producción. Dado que las cuatro funciones principales del suelo en la producción agrícola son actuar como un depósito de minerales y nutrientes, ser un suministro de agua para las plantas, funcionar como apoyo al sistema radical de la planta y proporcionar oxígeno a la raíz, cualquier sistema hidropónico requiere basarse en estos principios para poder ser cultivado. Así, el uso de un medio inerte sirve para sostener el sistema de raíz de la planta, los nutrientes esenciales pueden disolverse fácilmente en el agua para absorción por la planta y el oxígeno se puede suministrar utilizando una bomba de aire, satisfaciendo así las necesidades de las plantas que debería cubrir el suelo (Resh, 1995; Oriz *et al.*, 2009).

Los registros más antiguos del cultivo de plantas sin suelo se remontan a la época de las primeras civilizaciones, con los jardines colgantes de Babilonia, los jardines flotantes de los aztecas en México, y los de la China imperial, existiendo también jeroglíficos egipcios fechados cientos de años antes de Cristo que describen el cultivo de plantas en agua. El desarrollo de la hidroponía comenzó a partir de los descubrimientos hechos hacia el año 1600, cuando Jan Van Helmont demostró que las plantas obtienen sustancias a partir del agua para su crecimiento. Así, en Inglaterra, Woodward, en 1699, fue el primero que hizo crecer plantas en un medio líquido al que había añadido diferentes cantidades de suelo (Resh, 2001; Urrestarazu, 2004).

El interés sobre la aplicación práctica del cultivo en agua no llegó hasta cerca de 1925, cuando tanto investigadores como productores lo vislumbraron como una respuesta a la necesidad de rotar los terrenos de cultivo con frecuencia para evitar los problemas de estructura, fertilidad y enfermedades del suelo. Como resultado

W. F. Gericke, del departamento de nutrición vegetal de la Universidad de California, en los años 1929 y siguientes, decidió transferir toda la tecnología hasta entonces desarrollada en laboratorio a sistemas de producción comerciales. De esta manera, la primera producción efectiva a gran escala se produjo durante la Segunda Guerra Mundial, cuando el Ejército de los Estados Unidos de América estableció unidades de producción hidropónicas en diversas islas del Pacífico, utilizando sustratos volcánicos de la zona, para alimentar a las tropas (Resh, 2001; Urrestarazu, 2004).

Dado el éxito de ésta tecnología, el uso de la hidroponía se expandió rápidamente por todo el mundo. Entre los años 1945 a 1960, países como Holanda, España, Francia, Inglaterra, Alemania, Suecia, la URSS e Israel comenzaron a experimentar con el cultivo hidropónico, encontrando que era un método de producción adecuado para países con poca precipitación y suelos poco fértiles. En la década de 1970, los cultivos de arena florecieron, el sistema NFT fue consolidado por el Dr. Allen Cooper, el sustrato lana de roca fue desarrollado en Dinamarca, se incrementó la producción de plásticos para la agricultura y la fabricación de bombas de alta tecnología, lo que permitió el éxito de los sistemas hidropónicos (Resh, 2001; Urrestarazu, 2004; Rodríguez-Delfín, 2012).

Hoy en día la técnica de cultivo sin suelo es la forma más intensiva de producción hortícola que se aplica en todo el mundo. Se utiliza en áreas con suelos no aptos, en zonas de producción comerciales, en zonas urbanas y suburbanas, patios, pequeños jardines, paredes, balcones y tejados. Su gran versatilidad permite su aplicación a pequeña, mediana y gran escala, cultivando casi cualquier tipo de planta (Caldeyro, 2003; Oriz *et al.*, 2009; Rodríguez-Delfín, 2012).

La agricultura hidropónica ofrece muchas ventajas en comparación con la agricultura convencional. En primer lugar permite la producción agrícola en lugares donde el suelo es poco fértil, tiene algún tipo de contaminación, es altamente salino, está infestado con algún fitopatógeno, o en términos generales

no es apto para la agricultura (Jones, 1997; Resh, 2001; Abad *et al.*, 2005; Oriz *et al.*, 2009).

Debido a que los sistemas hidropónicos se encuentran relativamente aislados, la contaminación por plagas del suelo como insectos y pequeños animales, así como la presencia de malezas es mínima. Los sustratos empleados son más fáciles y económicos de esterilizar, lo que permite prevenir la presencia de plagas y enfermedades que ataquen la raíz, o que utilicen el suelo como hogar durante alguna etapa de su ciclo de vida (Jones, 1997; Resh, 2001; Gilsanz, 2007; Oriz *et al.*, 2009).

Los sistemas de agricultura hidropónica requieren menos trabajo ya que no se realizan labores de labranza, ni eliminación de malas hierbas con tanta intensidad como en los sistemas de producción en suelo. Además, la simplicidad en su funcionamiento permite la automatización del cultivo mediante bombas, cronómetros, motores, sensores y computadoras, lo que reduce drásticamente los costos por mano de obra (Jones, 1997; Oriz *et al.*, 2009).

La producción en hidroponía permite darle a las plantas todos los nutrientes que ellas necesitan, en la proporción y momento que lo requieren, por lo que éstas crecen más y más rápido que las plantas que viven en el suelo. Esto significa que hay ciclos de producción más cortos, por lo que hay más cosechas por año. Además ya que las plantas no tienen que competir entre sí para obtener los nutrientes que necesitan, el espacio entre ellas sólo está limitado por la cantidad de luz disponible, por lo que es posible tener mayores densidades de plantación en sistemas hidropónicos comparado con el cultivo en suelo. Así, un mayor número de plantas, de mayor tamaño y en menor tiempo, nos conduce a un incremento en la producción por unidad de tiempo y superficie (Resh, 2001; Oriz *et al.*, 2009).

La productividad que se puede alcanzar dentro de un área reducida empleando sistemas hidropónicos es realmente elevada y la versatilidad de la técnica permite su implementación en prácticamente cualquier región del mundo, conduciendo a la producción de alimentos de alta calidad, sin muchas de las dificultades que presenta la producción en suelo. Es por ello que la hidroponía se ha destacado como una de las alternativas productivas para lograr una agricultura sustentable, que permite satisfacer la alimentación humana, haciendo un uso eficiente de los recursos (Zinnen, 1988; Caldeyro, 2003; Osorio, 2008).

Los sistemas hidropónicos son muy eficientes en cuanto al uso de agua y fertilizantes. Ya que se tiene un mayor control sobre la rizósfera, es posible determinar la cantidad precisa de agua y nutrientes que se necesitan aplicar. En general, las plantas hidropónicas sólo utilizan una décima parte de la cantidad de agua utilizada por las plantas cultivadas en el suelo debido a que en la agricultura tradicional el agua pasa a través de la raíz rápidamente, drenándose en su mayoría. Además, en los sistemas hidropónicos la pérdida por evaporación es menor, y en algunos casos es posible reciclar la solución nutritiva más de una vez. (Resh, 2001; Abad *et al.*, 2005; Oriz *et al.*, 2009).

A pesar de las grandes ventajas que representa la hidroponía, también presenta ciertas limitantes. Desde el punto de vista económico, el establecimiento de una unidad de producción basada en hidroponía representa una fuerte inversión. Aunque se han diseñado sistemas hidropónicos basados en el uso de materiales reciclados o de bajo costo, la compra de semillas, fertilizantes, tanques, bombas, plaguicidas, entre otros, es inevitable. Es por ello que la producción hidropónica se recomienda sobre todo para productos de alto valor económico, con la finalidad de recuperar rápidamente la inversión realizada (Stanghellini y Rasmussen, 1994; Resh, 1995; Resh, 2001; Oriz *et al.*, 2009).

Si se opta por la instalación de sistemas automatizados, o simplemente se instala una bomba de agua en el sistema hidropónico, se va a generar la necesidad de

contar con un mecanismo fiable que garantice la continuidad y suministro de energía eléctrica, para evitar que las plantas puedan sufrir algún tipo de estrés por falta de agua. Es decir, los sistemas hidropónicos son dependientes de la energía eléctrica (Oriz *et al.*, 2009).

Es evidente que ya que los sistemas hidropónicos requieren agua para proporcionar los nutrientes a las plantas, es indispensable tener una fuente de abastecimiento de agua de buena calidad, sobre todo libre de contaminantes y de excesivas sales, con un pH cercano a la neutralidad. Si esta condición se presenta de manera natural en la zona de producción, será una gran ventaja económica, ya que no requerirá de formulaciones especiales, ni de la instalación de equipos de tratamiento para mejorar la calidad del agua (Gilsanz, 2007).

Los sustratos utilizados en hidroponía no poseen las cualidades de buffer con las que cuenta el suelo, por lo que las plantas son más susceptibles a presentar problemas nutricionales complejos frente a alteraciones en el suministro de nutrientes, manifestando de forma casi inmediata síntomas tanto de excesos como de deficiencias nutricionales. Sin embargo, si estos problemas se detectan a tiempo, la hidroponía permite también corregirlos rápidamente. Es por ello que es necesario que los productores de cultivos hidropónicos posean un mayor grado de conocimientos respecto al funcionamiento del cultivo, para que sean capaces de detectar dichos problemas de manera oportuna (Resh, 2001; Gilsanz, 2007; Oriz *et al.*, 2009).

De la misma manera, en los sistemas hidropónicos el desarrollo de epidemias severas puede ser intensificada por el ambiente favorable, la riqueza nutrimental de la solución nutritiva y por el monocultivo intensivo de plantas suculentas, por lo que una vez que algún patógeno se establece en estos sistemas, los productores tienen pocas opciones para su control (Zinnen, 1988; Stanghellini y Rasmussen, 1994).

## LOS PROBLEMAS FITOPATOLÓGICOS EN SISTEMAS HIDROPÓNICOS

La hidroponia se diseñó en un principio como una alternativa para resolver los diferentes problemas que acarrea la producción en suelo. Aunque presenta grandes ventajas productivas, desde el punto de vista de la sanidad vegetal, se ha observado que no es la solución definitiva para los problemas de enfermedades, o al menos no de aquellas que atacan la raíz (Zinnen, 1988; Stanghellini y Rasmussen, 1994; Resh, 2001; Gómez, 2005; Oriz *et al.*, 2009).

No existen enfermedades exclusivas de los sistemas hidropónicos, sin embargo, las condiciones microclimáticas que se generan en estos cultivos, la abundancia de un hospedante genéticamente homogéneo y el uso de sustratos estériles crean un ambiente ideal para que sobre todo los patógenos de la raíz puedan desarrollarse fácilmente en estos sistemas de cultivo con un mínimo de competencia microbiana (Zinnen, 1988; Stanghellini y Rasmussen, 1994; Santos *et al.*, 2004; Gómez, 2005; Botero, 2009).

Dadas las características de la solución nutritiva como son un pH ligeramente ácido y un alto contenido de sales, el número de microorganismos fitopatógenos que pueden sobrevivir en los sistemas hidropónicos es menor que en los sistemas de producción en suelo. La mayoría de las enfermedades en hidroponia son causadas por bacterias como *Erwinia spp.* y *Pseudomonas spp.*, hongos como *Rhizoctonia spp.*, *Cercospora spp.*, *Septoria spp.*, *Fusarium spp.* y *Verticillium spp.*, y oomycetes como *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Plasmopara spp.*, y *Olpidium spp.*, todos ellos capaces de dispersarse rápidamente en ambientes acuáticos (Stanghellini y Rasmussen, 1994; Resh, 2001; Guzmán, 2004).

Es por ello que el agua con la que se prepara la solución nutritiva suele ser la principal fuente de contaminación de los cultivos sin suelo y el principal mecanismo de dispersión. Ya que en todos los casos al momento de instalar un módulo de producción hidropónica es necesario contar al menos con un depósito

de agua y nutrientes con el cual se abastece toda la superficie cultivada mediante una red conductora, si algún patógeno llegara a introducirse en el sistema, su dispersión sería extremadamente rápida y uniforme, pudiendo causar severas epidemias en poco tiempo. Así, el conocimiento de la calidad biológica del agua que se emplea en los sistemas hidropónicos desde su origen es indispensable (Resh, 1995; Santos *et al.*, 2004; Oriz *et al.*, 2009; Nichols y Savidov, 2012).

No solo el agua que entra al sistema puede ser la fuente de contaminación. El sustrato es otra de las principales entradas de inóculo al sistema si no se esteriliza de manera adecuada. Aunque la mayoría de los sustratos empleados en hidroponía son de origen inerte, como la lana de roca, el tezontle, la perlita, la arena etc., si se reutilizan de manera excesiva, podrían funcionar como medio de propagación para los microorganismos. También se ha documentado que sustratos como la arena de río y la turba han sido la fuente de introducción de especies de *Pythium*, *Fusarium*, *Oplidium* y *Thielaviopsis* en sistemas hidropónicos (Stanghellini y Rasmussen, 1994; Sanz *et al.*, 2003).

Si bien en hidroponía se prescinde del uso del suelo para la producción, éste sigue siendo una fuente de inóculo, ya que es constantemente introducido en la mayoría de las instalaciones por la maquinaria y vehículos que se emplean en el proceso productivo, así como en el calzado del personal que labora en los invernaderos. De la misma manera, se recomienda que el piso del invernadero se encuentre cubierto para evitar la posible dispersión de patógenos por salpicaduras o generación de polvo (Stanghellini y Rasmussen, 1994).

Otra fuente de dispersión de inóculo son los insectos. Las mosquitas conocidas como “Fungus gnats” (*Bradysia spp.*) y “shore flies” (*Scatella stagnalis*) son plagas de insectos comunes en los invernaderos, que se alimentan generalmente de algas, hongos y materia orgánica en descomposición, y aunque no causan pérdidas directas en los cultivos, se ha descubierto que tanto en estados larvarios como en adultos, estos dos insectos actúan como vectores de algunos patógenos,

sobretudo hongos y bacterias (Stanghellini y Rasmussen,1994; Mansilla *et al.*, 2001).

En el caso de los sistemas hidropónicos cerrados, dónde la recirculación de la solución nutritiva es parte del proceso, las epidemias pueden ser devastadoras y muy difíciles de controlar pudiendo llevar al sistema productivo al fracaso, lo que obliga a los productores a realizar análisis frecuentes del agua de recirculación y a implementar mecanismos de esterilización de la solución como métodos de control preventivos. Tratamientos como la radioterapia, ozonificación, tratamiento por temperatura, filtración, etc., son métodos efectivos solo contra algunos hongos y bacterias, ya que se ha encontrado que algunos de ellos no combaten a organismos como *Pythium spp.* y *Phytophthora spp.* Es así que con la tecnología actual no se han encontrado métodos que aseguren una desinfección efectiva y a bajo costo de las soluciones nutritivas en los sistemas de cultivo sin suelo (Resh, 2001; Sanz *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004).

Otro de los factores que incrementa el riesgo de desarrollo de epidemias en los sistemas hidropónicos, radica en que el sistema de raíces se encuentra totalmente expuesto. Al no tener la protección de las partículas del suelo, y los microorganismos benéficos que en él habitan, la raíz se encuentra completamente susceptible al ataque de cualquier microorganismo fitopatógeno. Aunado a ello, las sales disueltas en la solución nutritiva producen microheridas que debilitan las raíces y permiten la fácil penetración de los patógenos (Jenkins y Averre, 1983).

La implementación de prácticas de saneamiento de materiales, maquinaria y equipos, así como la esterilización de agua, sustratos y solución nutritiva para prevenir la introducción de patógenos, son las medidas de control más eficientes que se recomienda implementar en cualquier sistema hidropónico. Y en caso de que el problema ya se encuentre presente, al igual que en los sistemas de producción en suelo, es esencial realizar la identificación exacta de los

microorganismos involucrados para la selección apropiada de las estrategias de control y el monitoreo constante de la sanidad del cultivo (Jenkins y Averre, 1983).

Los sistemas de cultivo sin suelo se han utilizado en todo el mundo durante muchos años. Se plantearon como una alternativa para evitar los daños causados por los patógenos de la raíz, y aunque se han reportado pocas enfermedades en los cultivos hidropónicos, estas son devastadoras y capaces de limitar severamente la productividad del sistema, al grado de causar el abandono temporal o permanente de la unidad de producción. Es por ello que la hidroponía constituye un reto para el desarrollo de nuevas estrategias eficientes, económicas y de bajo impacto ambiental para el manejo de los patógenos de la raíz (Bates y Stanghelleni, 1984).

## **LOS OOMYCETES**

Los oomycetes, también conocidos como mohos acuáticos, son un grupo de organismos eucariotas similares a los hongos en la formación de micelio filamentoso, la nutrición por absorción y la reproducción a través de esporas. Aunque los oomycetes fueron considerados durante mucho tiempo como “hongos inferiores”, los estudios moleculares, bioquímicos y la profundización en el estudio de las características morfológicas, han permitido definir que este grupo de organismos se encuentran filogenéticamente más relacionados con las algas y las plantas, mientras que los hongos parecen estar más relacionados con los animales. Es por ello que al representar una línea evolutiva única se les ha clasificado junto con las algas y diatomeas de color marrón y dorado dentro del dominio *Eukarya*, reino *Chromalveolata*, phylum *Heterokontophyta*, también conocido como *Stramenopiles* o *Heterokonta* (Van West *et al.*, 2003; Fry y Niklaus, 2010; Heffer *et al.*, 2012).

Hay muchas características que distinguen a los oomycetes de los hongos verdaderos. Los oomycetes producen hifas cenocíticas, es decir, carentes de paredes celulares transversales o poco frecuentes, lo que resulta en la formación de micelio multinucleado. Los núcleos de las células vegetativas son típicamente diploides, mientras que en los hongos verdaderos son haploides o dicarióticos. Al igual que los hongos, los oomycetes se dispersan a través de esporas, sin embargo estas presentan flagelos heterokont, es decir, flagelos desiguales en tamaño o forma, característica típica del phylum, los que le dan motilidad a las esporas, cualidad por la que se les denomina zoosporas. Además, la pared celular de los oomycetes está compuesta por  $\beta$ -1,3-glucano,  $\beta$ -1,6-glucano,  $\beta$ -1,4-glucano, es decir, contiene celulosa, a diferencia de los hongos verdaderos que presentan quitina en su estructura. Además los oomycetes también contienen hidroxiprolina, un aminoácido no esencial también presente en la pared celular vegetal (Erwin y Ribeiro, 1996; Van West *et al.*, 2003; Fry y Niklaus, 2010; Heffer *et al.*, 2012).

Los oomycetes tienen una amplia distribución debido a su capacidad de colonizar una gran variedad de sustratos. Son de hábitos terrestres y acuáticos, y aunque en la naturaleza la mayoría de las especies viven como saprofitos, algunos también actúan como parásitos de plantas, peces, insectos y mamíferos. Se encuentran entre los microorganismos acuáticos más conocidos, participan en la descomposición de restos vegetales y animales en ecosistemas de agua dulce, siendo más abundantes y diversos en suelos inundados, que en ambientes secos (Chul *et al.*, 1978; Bruin y Edgington, 1983; Hendrix y Campbell, 1983; Nechwatal *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de los oomycetes se encuentran diversos géneros que actúan como patógenos de un gran número de plantas de importancia económica. Entre los más destructivos se conocen los mildius causados por géneros como *Bremia*, *Sclerospora*, *Peronospora*, *Plasmopara* y *Pseudoperonospora*, que se asocian con enfermedades foliares de cultivos como la vid, lechuga, maíz, cebolla,

espinaca, melón, pepino, calabaza, y sandía, entre otros. Los géneros *Phytophthora* y *Pythium* son algunos de los patógenos de plantas más destructivos del mundo, representan en conjunto pérdidas de miles de millones de dólares en cultivos comerciales a nivel mundial. En la actualidad, se han descrito más de 60 especies de *Phytophthora* como agentes causales de enfermedades en plantas, arbustos y árboles. Las principales especies altamente devastadoras del género *Phytophthora* incluyen *P. infestans*, agente causal del tizón tardío de la papa; *P. cinnamomi*, patógeno de la raíz de más de 900 especies de plantas; *P. palmivora* y *P. megakarya*, causantes de tizones, canchales, pudrición de mazorcas y raíz en cacao; y *P. sojae*, origen de la pudrición del tallo y raíz en soya. Las enfermedades causadas por *Pythium spp.* son muy comunes e importantes sobre todo en el contexto de los cultivos protegidos, en particular en las etapas iniciales de desarrollo del cultivo. Especies como *P. aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. myriotylum*, y *P. ultimum* son los causantes de *damping-off*, pudrición de raíz, podredumbre de tallo y muerte de plántulas en viveros e invernaderos forestales y agrícolas alrededor del mundo. *Pythium* y *Phytophthora* están ganando importancia en los cultivos hidropónicos. En el interior de los invernaderos con producción hidropónica se generan condiciones ecológicas especialmente favorables, donde las altas densidades de plantas, el empleo de variedades genéticamente uniformes, la continuidad en la producción, la abundancia de raíces suculentas, el flujo continuo de solución nutritiva, temperaturas ambientales constantes y los elevados niveles de humedad generan el ambiente ideal para el desarrollo y propagación de los oomycetes ( Bruin y Edgington , 1983; Hendrix y Campbell, 1983; Stanghellini y Miller; 1997; Van West *et al.*, 2003; Nechwatal *et al.*, 2008;).

El ciclo de vida de los oomycetes consta de dos fases que son estimuladas por diferentes condiciones ambientales. La reproducción sexual se da mediante la producción de oosporas después de la unión de dos gametangios llamados oogonio y anteridio. Normalmente cada individuo produce tanto oogonios como anteridios. En algunos casos es necesaria la interacción con otros individuos para

lograr el apareamiento. Cuando se requiere de la presencia de individuos distintos con gametangios compatibles para la reproducción, se trata de especies heterotálicas. Y en aquellas en las que los gametangios compatibles se encuentran en un solo individuo, es decir, son autofecundables, se trata de especies homotálicas. La fertilización se produce a través del vaciado del contenido del anteridio dentro del oogonio, lo que lleva al desarrollo de una oospora con paredes gruesas adaptadas para la hibernación y la supervivencia en condiciones ambientales adversas. Esta espora en reposo puede mantenerse en latencia durante periodos prolongados para luego germinar en condiciones adecuadas, y producir tubos germinativos múltiples o individuales, los que a su vez desarrollan posteriormente en esporangios o gametangios en función de las condiciones ambientales. La fase asexual se caracteriza por la producción de esporangios, los que pueden germinar directamente en un líquido o sobre una superficie, o producir zoosporas biflageladas mediante un proceso de división citoplasmática. Las zoosporas liberadas nadan en agua libre, lluvia, rocío o agua de riego en busca de alimento, donde se asientan y se enquistan, para después desarrollar un tubo germinativo que penetra las células de las que se alimenta, directamente o a través de un apresorio. Las hifas se ramifican a través del tejido infectado desarrollando una malla de micelio de la que se producen nuevamente los esporangios. Otro tipo de reproducción asexual son las clamidosporas las cuales son generalmente redondeadas de paredes gruesas, similares a las oosporas y funcionan también como estructuras de sobrevivencia, no son comunes en todos los oomycetes, por lo que su formación puede constituir un carácter distintivo de ciertas especies. La reproducción de tipo asexual es predominante en condiciones ambientales favorables, permitiendo una rápida diseminación, asegurando así la persistencia de microorganismo (Hendrix y Campbell, 1983; Stanghellini y Miller, 1997; Van West *et al.*, 2003; Fry y Niklaus, 2010).

La propagación por medio de zoosporas es una de las etapas más importantes en el ciclo de vida de los oomycetes, y es estrictamente dependiente de la presencia

de agua, no sólo para la etapa de nado libre, sino también para las fases finales en la formación y el desempeño de las zoosporas, como el enquistamiento y penetración de las células. Es por ello que todos los oomycetes están restringidos en su ciclo de vida, en su ciclo de infección y epidemiológicamente por la disponibilidad de agua libre. En el caso de los oomycetes que infectan la parte aérea de las plantas, la dependencia del agua para la producción de zoosporas puede ser tan estricta como la necesidad de fuertes lluvias que ocasionen pequeños depósitos de agua estancada en los verticilos de hojas, o tan simple como el uso del rocío formado en la planta para completar su ciclo de vida. La propagación aérea de estos organismos puede darse ya sea a través del contacto directo entre las hojas infectadas, las corrientes de aire con altos niveles de humedad o por salpicaduras de agua sobre todo en sistemas de producción que emplean riego por aspersión (Lange y Olson , 1983; Stanghellini y Miller; 1997 )

La supervivencia de los oomycetes fitopatógenos que habitan en el suelo definitivamente está vinculada a la humedad contenida en éste. Aunque muchas especies pueden sobrevivir solo con el agua presente entre las partículas del suelo, otros requieren condiciones de anegación. En términos generales, el desarrollo de una epidemia por oomycetes requiere de condiciones constantes de humedad, ya que la abundancia de ésta en un solo evento no es tan determinante; así por ejemplo, en suelos con excelente drenaje y después de una fuerte lluvia es poco probable que se tengan problemas fitosanitarios relacionados con oomycetes, sin embargo con la recurrencia de condiciones de humedad durante épocas del año frescas , cuando la evaporación es lenta, y en suelos con drenaje deficiente, los daños por oomycetes son más evidentes. En condiciones de inundación, el déficit de oxígeno también favorece la aparición de enfermedades causadas por oomycetes, ya que el desarrollo de raíces se reduce y se favorece una considerable proliferación de raíces secundarias, y dado que las condiciones anaerobias alteran la suberización y la lignificación, los oomycetes tienen a su disposición un creciente número de raíces inmaduras para su colonización (Schmitthener, 1970; Lange y Olson , 1983 ).

Las oosporas, y en su caso las clamidosporas, son las únicas estructuras que sobreviven condiciones secas en el suelo; los esporangios, zoosporas y micelio son fácilmente degradados en condiciones de déficit de humedad. Por ello, el hecho de que la formación de zoosporas y la descarga de las mismas sólo se complete cuando el agua libre suficiente está presente puede ser una garantía de que existan condiciones satisfactorias para establecer una extensa infección y no sólo una lesión local que permita la sobrevivencia de la especie (Schmitthenner, 1970; Lange y Olson, 1983).

Se han desarrollado numerosas estrategias para el control de enfermedades causadas por oomycetes, incluyendo diversos métodos culturales, físicos y biológicos, siendo las más exitosas aquellas en las que se emplean variedades resistentes y el manejo de la humedad en las parcelas. El impacto económico de los oomycetes no está determinado solo por las pérdidas que ocasionan, sino también por los costos que implican los cambios en los procesos de producción que evitan su proliferación. Con frecuencia, para mejorar el drenaje es necesaria la incorporación de materia orgánica en el suelo, en el caso de la producción de plántula se deben adquirir sustratos complementarios para mejorar el drenaje en los almácigos en lugar de emplear únicamente materiales disponibles localmente, en muchos casos las variedades con mayor rendimiento y mejor calidad comercial no pueden ser cultivadas a causa de susceptibilidad a estos organismos, y en el caso de la hidroponia, la implementación de sistemas de esterilización de sustratos y solución nutritiva representan fuertes inversiones. Es por ello que el uso de plaguicidas químicos ha sido el método más eficaz y económico de control de los oomycetes desde su descubrimiento. El uso continuo y la dependencia a los plaguicidas, en particular a los sistémicos, ha llevado al desarrollo y selección de cepas resistentes a los ingredientes activos más comunes en el mercado, dificultando y encareciendo aún más su control (Hendrix y Campbell, 1983; Stanghellini y Miller; 1997; Resh, 2001; Sanz *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004).

## ***Phytophthora drechsleri*, CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN HIDROPÓNICA DE LECHUGA**

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta anual típica de climas frescos que es utilizada principalmente para el consumo humano. Como alimento, provee fibra, carbohidratos, proteínas y una mínima cantidad de grasa. México se encuentra en el 10º lugar en producción de lechuga a nivel mundial; junto con el tomate, pepino, espinaca y pimiento, la lechuga es uno de los principales cultivos de hortalizas producidos en sistemas hidropónicos, es una de las 15 hortalizas con mayor valor de producción, y dada su importancia dentro de la economía nacional, la protección de la sanidad vegetal es un factor decisivo en la comercialización tanto nacional como internacional de este producto (Stanghellini y Rasmussen, 1994; FAO, 2006; DGSV, 2010; SIAP, 2010).

*Phytophthora drechsleri* Tucker es un oomycete que pertenece a la familia *Pythiaceae*, es un patógeno acuático que puede sobrevivir y diseminarse como oosporas y zoosporas en un rango de temperaturas muy amplio. Aunque es esporádico en la naturaleza, puede causar severas epidemias cuando las condiciones ambientales son propicias para su desarrollo. En particular, en los cultivos hidropónicos es altamente destructivo a causa de su fuerte patogenicidad, rápida reproducción y propagación pudiendo afectar a los cultivos en cualquier etapa de crecimiento y en prácticamente todas las estaciones del año. En lechuga, *P. drechsleri* se caracteriza por causar una rápida pudrición de raíces, marchitez y la eventual muerte de la planta, causando pérdidas de hasta el 100%, llegando a constituirse como el principal factor limitante de la producción de lechuga hidropónica en invernaderos infestados (Kannaiyan *et al.*, 1994; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; Hyeong-Jin *et al.*, 2002; CPC, 2010).

### **Características Generales**

*P. drechsleri* produce micelio blanco, algodonoso, que forma una leve roseta en medio de agar harina de maíz, PDA o medio V8-agar. Las hifas son hialinas,

filamentosas, cenocíticas, bastante uniformes, delgadas, de 3-6  $\mu\text{m}$  de ancho. Con temperaturas menores a los 35°C forma hinchamientos hifales angulares o redondeados de 12-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. (Tucker, 1931; Holliday, 1980; Bush *et al.*, 2006; CPC, 2010).

En su fase asexual rara vez forma clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares o terminales, de 11-21  $\mu\text{m}$  de diámetro (CPC, 2010).

Los esporangióforos, es decir, las estructuras sobre las que se desarrollan los esporangios, son similares a las hifas, ligeramente más estrechos, de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un pequeño ensanchamiento por debajo del esporangio. Por lo general no son ramificados, por lo que solo producen un esporangio terminal simple. Una vez que éste ha vaciado su contenido, el crecimiento se reanuda a través de la base del esporangio evacuado, formando un nuevo esporangio en el interior de las paredes del esporangio vacío (Tucker, 1931; Whaterhouse, 1963; Whaterhouse, 1970; Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; CPC, 2010).

Los esporangios son hialinos, persistentes, no papilados, de forma ovada a piriforme, en ocasiones asimétricos, ligeramente estrechos en la base y con un leve engrosamiento y aplanamiento apical, de tamaño variable entre los rangos 26-40 x 36-70  $\mu\text{m}$ . En laboratorio normalmente no se forman en medios sólidos, a excepción del medio V8-agar, sin embargo se producen abundantemente cuando el cultivo se coloca en agua esterilizada (Tucker, 1931; Whaterhouse, 1963; Whaterhouse, 1970; Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; Bush, *et al.*, 2006; CPC, 2010; Sociedad Española de Fitopatología, 2010).

En cada esporangio se forman de 8 a 20 zoosporas, las cuales se liberan una vez que se disuelve la parte apical del esporangio. Las zoosporas maduran dentro de éste y emergen de manera individual. Pueden permanecer en nado libre durante 2 a 5 horas, hasta que encuentran un hospedero sobre el cual germinan, o se agrupan entre sí para formar conglomerados de los cuales se producen uno o

más tubos germinativos. Las zoosporas se caracterizan por ser estructuras de forma ovoide a reniforme, hialinas, biflageladas, con un leve estrechamiento hacia el extremo anterior (CPC, 2010).

*P. drechsleri* se considera un organismo heterotálico, por lo que generalmente requiere los tipos de compatibilidad A1 y A2 para completar la fase sexual y producir oosporas. Sin embargo en ocasiones presenta el fenómeno conocido como homotalismo secundario, lo que permite la formación de oosporas sin la interacción con otro individuo (Tucker, 1931; Whaterhouse, 1963; Mortimer *et al.*, 1977; Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2003; Sociedad Española de Fitopatología, 2010).

Los oogonios son esféricos, lisos, con paredes gruesas, hialinos o de color ámbar claro en su fase temprana, y purpuras o marrones una vez que maduran, de 22-53  $\mu\text{m}$  de diámetro. Durante la reproducción, los anteridios se colocan por debajo del oogonio, es decir, son anfígenos, de forma oval, hialinos y persistentes, con dimensiones de 14-15 x 13  $\mu\text{m}$ . Las oosporas son globosas, de 26  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, pudiendo variar desde las 17  $\mu\text{m}$  hasta las 50  $\mu\text{m}$ , lisas, del mismo color que los oogonios, con paredes gruesas de hasta 3  $\mu\text{m}$  de espesor, y se caracterizan por ser pleróticas, por lo que prácticamente llenan todo el oogonio (Tucker, 1931; Whaterhouse, 1963; Whaterhouse, 1970; Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; CPC, 2010; Sociedad Española de Fitopatología, 2010).

*P. drechsleri* tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo, aún sin la presencia de un huésped vivo. Permanece en forma de oospora en los restos de cultivos enfermos o produciendo zoosporas al parasitar malezas hospederas. La lluvia, el viento, corrientes naturales o artificiales de agua como los escurrimientos superficiales o el riego, son los principales mecanismos de dispersión, y no se tienen evidencias de que este patógeno se pueda transmitir por semilla (Sharma *et al.*, 2006; CPC, 2010; Sociedad Española de Fitopatología, 2010).

## **Taxonomía**

(CPC, 2010; Sociedad Española de Fitopatología, 2010; Wolcan *et al.*, 2010)

Dominio: *Eucariontes*

Reino: *Chromista*

Filo: *Oomycota*

División: *Eumycota*

Barrio: *Mastigomycotina*

Clase: *Oomycetos*

Orden: *Pythiales*

Familia: *Pythiaceae*

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora drechsleri*

## **Filogenia**

Dentro de la clasificación de las especies de *Phytophthora*, *P. drechsleri* se ubica en el clado 8, junto con *P. cryptogea*, *P. lateralis*, *P. erythroseptica*, *P. syringae*, *P. trifolii*, *P. medicaginis*, *P. primulae* y *P. porri*, lo que indica que son especies hermanas procedentes de un ancestro común, por lo que poseen características morfológicas similares (Brasier, 2008; Olson, 2010).

De todas ellas, *P. drechsleri* posee extremada similitud morfológica con *P. cryptogea*, siendo difíciles de diferenciar solo mediante la observación de estructuras. En general, los aislamientos de *P. drechsleri* son más agresivos que los de *P. cryptogea*, tanto los esporangios como los oogonios de *P. drechsleri* son más grandes que los de *P. cryptogea* y la principal característica que los distingue es la alta temperatura óptima de *P. drechsleri*, lo que le permite desarrollar crecimiento micelial de 5 mm o más en 24 horas con temperaturas cercanas a los 35°C, mientras que *P. cryptogea* detiene totalmente su crecimiento en las mismas condiciones (Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; Bush, *et al.*, 2006 Olson, 2010)

## **Medio Ambiente**

Se cree que *P. drechsleri* es originaria del noroeste del continente Americano, específicamente de Alaska suroriental. Aunque se le encuentra como habitante natural de las zonas de bosque húmedo y pantanos, tiene una gran capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas, lo que lo convierte en un patógeno de potencial importancia económica capaz de producir enfermedad en todas las estaciones del año en la mayor parte del mundo (Hansen y Hamm, 1988; Makambila, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996)

En ambientes cálidos y húmedos se pueden producir múltiples ciclos de infección en poco tiempo, causando epidemias más severas de junio a agosto. Al ser un oomycete, la disponibilidad de agua es determinante para el desarrollo de *P. drechsleri*. Es por ello que días nublados, lluvias frecuentes y abundantes, suelos con drenaje deficiente, y en general cualquier situación que ocasione la acumulación de agua en raíz y tallos por hasta 12 horas, favorece el rápido desarrollo de la infección, causando la muerte de las plantas en poco tiempo. (Duniway, 1975; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2002; Lamour *et al.*, 2003; Pande *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006).

El rango de temperaturas en las que *P. drechsleri* puede sobrevivir se encuentra entre los 5 y 37°C. A los 30°C se produce el máximo crecimiento. Sólo produce oosporas a los 25°C., por lo que la temperatura óptima para su crecimiento y reproducción se encuentra entre los 25 y 32°C, siendo capaz de producir enfermedad a partir de los 10°C (Tucker, 1931; Whaterhouse, 1970; Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; CPC, 2010).

Se ha observado que plantas susceptibles a este patógeno tienen elevadas cantidades de azúcares reductores, comparadas con plantas resistentes, por lo que en laboratorio, el enriquecimiento de los medios de cultivo con D-glucosa, D-fructosa, D-manosa y D-galactosa favorece el crecimiento de *P. drechsleri*. De igual manera, la presencia de compuestos fenólicos, como el ácido gálico, ácido

protocatéquico y ácido clorogénico, en variedades resistentes a *P. drechsleri* después de la inoculación, sugiere que estos compuestos inhiben el desarrollo del patógeno (CPC, 2010).

También se ha observado un incremento acelerado de la enfermedad durante la noche, ya que la luz actúa como un inhibidor para la germinación de las zoosporas, y se considera que pH cercanos a 6.5 son ideales para este microorganismo (CPC, 2010).

Otro factor que favorece el desarrollo de las epidemias por *P. drechsleri* es el estrés por salinidad, lo que aumenta la susceptibilidad de las plantas. Además, la presencia de *P. drechsleri* en soluciones nutritivas de entrada y drenaje en sistemas hidropónicos, sugiere la tolerancia de este patógeno a elevadas conductividades eléctricas (Bush *et al.*, 2003; Roustaei *et al.*, 2004; Bush, *et al.*, 2006).

### **Plantas Hospederas y Distribución**

Aunque originalmente *P. drechsleri* fue descrito en Irlanda como un patógeno de la papa (*Solanum tuberosum*), actualmente se ha encontrado parasitando una amplia variedad de plantas alrededor del mundo. Se tienen reportes de la presencia de este patógeno en Egipto, Madagascar, Zimbabue, Irán, India, Japón, Corea, Líbano, Malasia, Australia, Nueva Zelanda, Papúa Nueva Guinea, Francia, Grecia, Reino Unido, Canadá, México, EE.UU., Argentina, Brasil, Colombia, Chile y República Dominicana, entre otros (Tucker, 1931; Holliday, 1980; Nene *et al.*, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996).

Se le ha descrito causando *damping-off* y pudrición de raíces y tallos en garbanzo (*Cicer arietinum*), alfalfa (*Medicago sativa*), lenteja (*Lens culinaris*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*), yuca (*Manihot esculenta*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), azafrán (*Crocus sativus*), girasol (*Helianthus annuus*), gerbera (*Gerbera spp.*), margarita (*Bellis perennis*), cinerarias (*Cineraria spp.*),

osteospermum (*Osteospermum spp.*), boca de dragón (*Antirrhinum majus*), coleus (*Solenostemon scutellarioides*), sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), calabaza (*Cucurbita pepo*), tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*), pimiento (*Capsicum annuum var. annuum*), zanahoria (*Daucus carota*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris subsp. vulgaris var. altissima*), col (*Brassica oleracea var. capitata*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y rábano (*Raphanus sativus*), siendo de gran importancia en cultivos hidropónicos de pepino (*Cucumis sativus*) y lechuga (*Lactuca sativa*), especialmente de variedades con hoja roja (Tucker, 1931; Cather y Griffin, 1973; Thomas y Hill, 1977; Holliday, 1980; Hayes *et al.*, 1985; Makambila, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996; Álvarez *et al.*, 2002; Hyeong-Jin *et al.*, 2002; Sharifi y Nazari, 2004; Afshari-Azad *et al.*, 2008; Alipour, 2008; Esmaili-Shirazifard y Banihashemi, 2008; Saadat *et al.*, 2008a; Younesi *et al.*, 2008; Elena *et al.*, 2009; Olson, 2010; Wolcan *et al.*, 2010)

En plantas leñosas también ocasiona *damping-off*, sobretodo en plantas de vivero, así como pudrición de raíz, gomosis y canchros en tallo y ramas de árboles frutales como los cítricos (*Citrus spp.*), ciruelo (*Prunus domestica*), cerezo (*Prunus cerasus*), manzana (*Malus domestica*), pimienta (*Piper nigrum*) y pistache (*Pistacia vera*), así como también es especies forestales de los géneros *Abies*, *Eucalyptus*, *Cedrus* y *Pinus* (Tucker, 1931; Cather y Griffin, 1973; Hayes *et al.*, 1985; Hansen y Hamm, 1988; Erwin y Ribeiro, 1996; Hyeong-Jin *et al.*, 1999; Chastagner y Benson, 2000; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; Shahidi *et al.*, 2006; Sociedad Española de Fitopatología, 2010; Olson, 2010;)

Dada la gran diversidad de hospederos y los diferentes niveles de agresividad que presentan los aislamientos, existen indicios para sospechar de la existencia de razas fisiológicas y formas especiales de este microorganismo, sin embargo en la actualidad solo se reconoce la existencia de *Phytophthora drechsleri f. sp. cajani* como una variante de *Phytophthora drechsleri*, causando pudrición de tallo y tizón de la hoja en un estrecho rango de huéspedes que se limita a especies de *Cajanus*, como el guandú (*Cajanus cajan*), y parientes silvestres del género

*Atylosia*, como, *Atylosia albicans*, *A. cajanifolia*, *A. volubilis*, *A. lineata*, *A. scarabaeoides*, siendo una de las enfermedades de mayor importancia económica en la India (Tucker, 1931; Shohett y Strange, 1989; Kannaiyan *et al.*, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996; Nene *et al.*, 1996; Pande *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Singh y Dubey, 2010).

Así mismo, se ha reconocido que *P. drechsleri* no causa enfermedad en plantas como la achicoria (*Cichorium intybus*), col rizada (*Brassica oleracea var. sabellica*), escarola (*Cichorium endivia*), crisantemo garland (*Chrysanthemum coronarium*), acelga (*Beta vulgaris var. cicla*), albahaca japonesa (*Perilla frutescens*) y mostaza marrón (*Brassica nigra*) (Holliday, 1980; Hyeong-Jin *et al.*, 1999; Hyeong-Jin *et al.*, 2001).

### **Síntomas**

*P. drechsleri* tiene la capacidad de atacar prácticamente todas las partes de la plantas en cualquier etapa de crecimiento, pudiendo causar la muerte tanto de plantas recién emergidas como de aquellas cercanas a floración. Tiene una distribución espacial en manchones, los cuales van incrementando su tamaño hasta cubrir todo el terreno conforme progresa la epidemia (Holliday, 1980; CPC, 2010; Sociedad Española de Fitopatología, 2010).

Por lo general la enfermedad comienza en las raíces más jóvenes, con una coloración marrón rojizo en las puntas. Conforme avanza la infección, las raíces se tornan frágiles y se trozan con facilidad. Rápidamente los síntomas se extienden hacia el resto del sistema radical ocasionando una drástica reducción del volumen de éste. Dada la falta de raíces, en la parte aérea se manifiesta un marchitamiento acelerado, iniciando en las hojas más viejas, las que conservan su color y muchas veces permanecen adheridas al tallo y ramas, resultando finalmente en la muerte de la planta. (Tucker, 1931; Thomas y Hill, 1977; Holliday, 1980; Hayes *et al.*, 1985; Hyeong-Jin *et al.*, 1999; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; Álvarez

*et al.*, 2002; Lamour *et al.*, 2003; Elena *et al.*, 2009; CPC, 2010; Sociedad Española de Fitopatología, 2010).

Cuando la enfermedad inicia su desarrollo en la parte aérea, se forman manchas de color marrón oscuro en las hojas, corona, cerca del nivel del suelo, en el sitio de iniciación de una rama o en la axila de las hojas. Las manchas aumentan de tamaño, convirtiéndose en lesiones ligeramente hundidas de consistencia húmeda, en los bordes de las cuales se desarrollan las estructuras del patógeno, dando una apariencia pulverulenta. En las hojas, las manchas desarrollan en lesiones necróticas de forma circular, de máximo 1 cm. de diámetro, en un plazo máximo de 3 días con condiciones ambientales adecuadas. Mientras que en tallo y ramas las lesiones aumentan hasta formar canchales e hinchazones con secreción de goma, las que van incrementando su tamaño hasta ceñir el tallo, haciendo que la parte de la planta por encima de la lesión se seque por completo (Tucker, 1931; Thomas y Hill, 1977; Holliday, 1980; Strange *et al.*, 1982; Shohett y Strange, 1989; Singh y Chauhan, 1992; Makambila, 1994; Hyeong-Jin *et al.*, 1999; Lamour *et al.*, 2003; Pande *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Elena *et al.*, 2009; CPC, 2010; Wolcan *et al.*, 2010).

Las pudriciones acuosas causadas por este patógeno se explican por la producción de una toxina que causa la disfunción de la membrana citoplasmática de las plantas que parasita, lo que ocasiona la filtración del contenido celular en los espacios intracelulares dando esa consistencia húmeda (Shohett y Strange, 1989; Strange *et al.*, 1982).

## **Control**

### **CONTROL QUÍMICO**

El fungicida sistémico más utilizado para controlar las enfermedades por *Phytophthora* es el metalaxil. Para las enfermedades causadas por *P. drechsleri*, se recomienda en un inicio su aplicación como tratamiento a la semilla, proporcionando una buena protección a las plántulas hasta 15 días después de la

siembra. Aunque este tratamiento es efectivo los primeros días del cultivo, es insuficiente para controlar por completo la enfermedad, por lo que después de esta fecha se recomiendan aplicaciones en las partes vulnerables de las plantas, como yemas y brotes a los 30 y 45 días de edad. Una de las principales desventajas de este fungicida es que puede ser fitotóxico para algunos cultivos, sobre todo en etapa de plántula, por lo que se recomienda utilizar una formulación en la que además del metalaxil se incluya mancozeb, lo que incrementa su eficacia y reduce la actividad fitotóxica. También se ha observado que esta combinación de fungicidas, mezclados con el herbicida pendimetalina mejora sustancialmente el control de la enfermedad (Singh *et al.*, 1992; Saadat *et al.*, 2008b; CPC, 2010; Singh y Dubey, 2010).

El mefenoxam es otro fungicida ampliamente utilizado para el control de las enfermedades por *Phytophthora*, principalmente en aquellas que han mostrado resistencia al metalaxil. Sin embargo se ha demostrado que *P. drechsleri* presenta cierta resistencia a este producto a dosis que varían desde 1 hasta 100  $\mu\text{g}$  de i.a. $\cdot\text{ml}^{-1}$ , y se han encontrado aislamientos con EC50 de alrededor de 700  $\mu\text{g}$  de i.a. $\cdot\text{ml}^{-1}$  (Lamour *et al.*, 2003; Olson, 2010).

Se ha observado que aplicaciones de productos como azoxystrobin, etridiazol, mandipropamid, fluopicolide, dimethomorph, kresoxim-metil, fosetil-aluminio y propamocarb también son eficientes en el control de *P. drechsleri* (Hausbeck y Glaspie, 2008).

Otros productos recomendados para el control de *P. drechsleri* es el acetato de fentina mezclado con maneb aplicado como preventivo. El glicerol también ha mostrado efectos inhibidores en todas las etapas de desarrollo de *P. drechsleri*. Y el fosfonato de potasio en dosis mayores a 50 ppm inhibe fuertemente el crecimiento del micelio y suprime rápidamente las poblaciones del patógeno en soluciones nutritivas (Singh *et al.*, 1992; Hyeong-Jin, *et al.*, 2002; CPC, 2010).

## **CONTROL BIOLÓGICO**

En lo que respecta a organismos antagonistas, se ha observado la eficacia de especies como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma hamatum* contra *P. drechsleri*. Específicamente *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de lisar el micelio, mientras que *Bacillus subtilis* y las especies de *Trichoderma* producen respectivamente subtilina y tricondermina, compuestos que inhiben el crecimiento del patógeno. Una de las grandes ventajas en el uso de estos microorganismos es que pueden emplearse como herramientas auxiliares de control, ya que son compatibles con fungicidas como el metalaxil y mancozeb a dosis de 100 ppm de metalaxil y 100 ppm de la mezcla mancozeb + metalaxil (Sharifi y Nazari, 2004; Saadat *et al.*, 2008b; CPC, 2010; Singh y Dubey, 2010).

El bandunamide, un octapéptido cíclico derivado del cultivo de *Streptomyces griseovariabilis bandungensis* muestra una fuerte actividad antimicrobiana frente a *P. drechsleri*, con un IC<sub>50</sub> de 15 ng•ml<sup>-1</sup> (Tian *et al.*, 2003).

En el área de los extractos biológicos, se ha demostrado la capacidad inhibitoria contra *P. drechsleri* de extractos acuosos de hojas, flores y semillas de ruda silvestre (*Peganum harmala*), extractos etanólicos del tallo, hoja y fruto de zumaque (*Rhus coriaria*) y el ajoene, un compuesto químico derivado del ajo a dosis de 20 ppm. (Singh *et al.*, 1992; Abdolmaleki *et al.*, 2008; Sarpeleh *et al.*, 2008).

## **CONTROL CULTURAL**

Sin duda alguna, el uso de variedades resistentes se considera la mejor manera de controlar las enfermedades, pero existen otras prácticas que permiten prevenir el desarrollo de epidemias previo al uso de métodos más agresivos de control. En el caso de enfermedades causadas por oomicetes como *P. drechsleri* es importante seleccionar terrenos en los que no se hayan tenido reportes previos de problemas con estos patógenos, así como la nivelación del terreno y la realización

de obras para mejorar el drenaje. El uso de métodos de saneamiento, filtración, tratamiento con ultrasonido, ozonización, radiación ultravioleta y tratamientos térmicos a herramientas, equipos, e insumos son actividades que permiten evitar la introducción y dispersión del patógeno en las unidades de producción. La rotación de cultivos es otra alternativa de control, sin embargo su eficacia se ve limitada por el amplio rango de hospederos silvestres y cultivados, los cuales brindan cierta protección al patógeno, dificultando la ruptura del ciclo de vida. Para evitar la dispersión del patógeno a causa de salpicaduras se recomienda el uso de cubiertas vegetales, de plantas de porte bajo, como el frijol mungo (*Vigna radiata*), cacahuate (*Arachis hypogaea*) o cilantro (*Coriandrum sativum*). Se ha observado que prácticas como la adición de 25-50 kg•ha<sup>-1</sup> de nitrógeno en forma de sulfato de amonio incrementa la incidencia de la enfermedad, mientras que la adición de 25-50 kg•ha<sup>-1</sup> de potasio en forma de sulfato de potasio la reduce, independientemente de la presencia o ausencia de nitrógeno o fósforo en el suelo. Y finalmente, en el caso de plantas leñosas infectadas, se recomienda la eliminación de los canchales, aplicando posteriormente un fungicida y una capa de pintura que cubra la herida (Thomas y Hill, 1977; Holycross, 1979; Holliday, 1980; Hyeong-Jin *et al.*, 2001; Hyeong-Jin *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2006 CPC, 2010).

## OBJETIVO GENERAL

Observar el progreso de la enfermedad causada por *Phytophthora drechsleri* en lechugas producidas en sistemas hidropónicos de bandejas flotantes para determinar la relación entre la densidad de inóculo y la incidencia de la enfermedad en función de la temperatura de la solución nutritiva y el tiempo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Aislar e identificar el agente causal de la pudrición de raíz en lechugas cultivadas en sistemas hidropónicos de bandejas flotantes utilizando herramientas morfológico-moleculares.
2. Determinar el método más preciso para la cuantificación de la densidad de inóculo en muestras de agua.
3. Determinar la relación existente entre la densidad de inóculo y la incidencia de la pudrición de raíz de lechugas en sistemas hidropónicos de bandejas flotantes para establecer un umbral de acción.
4. Conocer el efecto de la temperatura de la solución nutritiva sobre la densidad de inóculo y la incidencia de la enfermedad en función del tiempo.

## HIPOTESIS

- I. La pudrición de lechugas en sistemas hidropónicos de bandejas flotantes es causada por *Phytophthora drechsleri*.
- II. El uso de ELISA cuantitativas es un método preciso para la estimación de la densidad de inóculo de *Phytophthora drechsleri* en muestras de agua, más aún que la siembra en medio de cultivo o la cuantificación en hematocitómetro.
- III. Conforme incrementa la densidad de inóculo de *Phytophthora drechsleri*, aumenta la incidencia de plantas con síntomas de pudrición de raíz.
- IV. Al aumentar la temperatura de la solución nutritiva, la densidad de inóculo de *Phytophthora drechsleri* también aumenta, por lo que se incrementa la incidencia de plantas con síntomas de pudrición de raíz.

## METODOS

### MUESTREO

En el mes de enero de 2011, se realizó la colecta de plantas de lechuga con síntomas de pudrición de raíz, marchitez y muerte, en una unidad de producción hidropónica de 5.5 Has., con sistema de bandejas flotantes (Figura 1), ubicada en el municipio de San Francisco del Rincón, Guanajuato.



**Figura 1. Sistema de producción de lechuga hidropónica en bandejas flotantes.**

## **AISLAMIENTO**

Las muestras se procesaron *in situ* tomando fragmentos de raíz con lesiones rojizas o necróticas, los cuales fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos y enjuagados en agua destilada estéril un par de veces, para posteriormente ser colocados en cajas Petri con medio de cultivo V8-agar (300 ml de jugo V8, 4 g de carbonato de calcio, 16 g de agar y 1000 ml de agua destilada) con antibióticos PARPH (Pimarcina, Ampicilina, Rifampicina, PCNB e Himexazol) y 3P (Pimarcina, Ampicilina, Rifampicina), selectivos a *Phytophthora* y *Pythium* respectivamente, e incubados a 25°C.

## **PURIFICACIÓN**

De cada colonia formada a partir de los fragmentos de raíz se transfirieron pequeños fragmentos de medio de cultivo a cajas Petri nuevas con medio V8-agar 3P, para obtener colonias puras de *Phytophthora* y *Pythium* por la técnica de punta de hifa.

## **PRUEBAS DE PATOGENICIDAD**

Con los aislamientos previamente purificados se realizaron las correspondientes pruebas de patogenicidad. Estas consistieron en colocar en cajas Petri 3 discos de 5 mm. de diámetro, de medio de cultivo V8-agar-3P con crecimiento micelial de cada una de las colonias aisladas, sumergidos en 20 ml. de agua estéril durante 7 días a temperatura ambiente (22°C). Transcurrido éste tiempo, a cada caja Petri se le colocaron 50 plántulas sanas de lechuga tipo Boston de 10 días de edad con raíz desnuda, manteniéndolas a temperatura ambiente y evaluando cada 24 hrs. durante 10 días el número de plántulas muertas por pudrición de raíz. Simultáneamente se colocó un testigo bajo las mismas condiciones, a

excepción de que los discos de medio no tenían ningún tipo de crecimiento, ni micelial ni bacteriano. Con los valores de plantas muertas en función del tiempo se realizaron curvas del progreso de la enfermedad para cada aislamiento, incluyendo el testigo, y se calculó el área bajo la curva.

Para fines estadísticos, esta prueba se repitió tres veces en el tiempo. Para la variable “área bajo la curva del progreso de la enfermedad” se realizó una prueba de normalidad con el test de Shapiro-Wilk y una prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett, con el fin de validar los resultados derivados del análisis de varianza y así poder inferir los resultados de la muestra hacia la población. El análisis de varianza se realizó considerando un diseño completamente al azar. Para poder determinar diferencias entre la patogenicidad de los aislamientos se realizó una prueba de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ). El análisis de los datos se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0. (Herrera y García, 2011).

De acuerdo con los postulados de Koch, se tomaron muestras de tejido a partir de las plantas utilizadas en las pruebas de patogenicidad, tanto de aquellas que fueron inoculadas como del testigo, y se colocaron nuevamente en medios de cultivo V8-agar PARPH y V8-agar 3P, para re-aislar los agentes causales y poderlos asociar con la presencia de síntomas. Para ello se cuantificó el número de fragmentos de tejido vegetal que formaron micelio y se calculó la proporción respecto al total de fragmentos colocados en los medios de cultivo para cada aislamiento.

## **IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA-MOLECULAR**

Se siguieron las claves taxonómicas para *Phytophthora spp.* y *Pythium spp.* de Whaterhouse (1963, 1968, 1970) y Erwin y Ribeiro (1996). Para promover la formación de estructuras, se colocaron 3 cajas Petri con 5 discos de medio con

crecimiento micelial de 5 mm. de diámetro de cada uno de los aislamientos y se cubrieron con solución de suelo estéril (10 g. de suelo por cada 90 ml. de agua), incubándolas a 25°C, alternando 1 hora de luz negra y 2 horas de obscuridad. Las estructuras formadas se observaron cada 24 hrs. con ayuda de un microscopio, y fueron documentadas y medidas utilizando una cámara digital Motic® 2300. Las temperaturas de crecimiento y el patrón de las colonias se corroboraron transfiriendo los aislamientos a medio PDA (papa-dextrosa-agar) y V8-agar-3P, e incubándolos a 27 y 35°C respectivamente, durante 7 días.

Para la identificación molecular fue necesario realizar la extracción de ADN de cada una de las colonias representativas, para lo que se utilizó el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit de la empresa Quiagen® (USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se proceso mediante PCR para amplificar la región intergénica ITS (Internal Transcribed Spacer), utilizando los primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GC GG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), con los ciclos de temperatura descritos en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Ciclos de temperatura para la amplificación de ADN.**

<b>PROCESO</b>	<b>TEMPERATURA/TIEMPO</b>	<b>No. DE CICLOS</b>
Pre desnaturalización	95°C por 5 min.	1 ciclos
Desnaturalización	95°C por 45 seg.	30 ciclos
Anillamiento	57°C por 45 seg.	
Elongación	72°C por 1 min.	
Elongación final	72°C por 5 min.	1 ciclo

El producto de PCR se secuenció en la empresa MacroGen® (Corea), y las secuencias fueron comparadas usando la herramienta Blast en NCBI, seleccionando las secuencias con mayor similitud y moda dentro de los primeros 20 resultados.

## **PRUEBA DE SINERGISMO**

Para determinar si el desarrollo de síntomas y la muerte de plántulas se aceleraban al combinar las especies de patógenos aisladas, se seleccionaron los aislamientos más agresivos de cada especie identificada, con base a los resultados de las pruebas de patogenicidad.

La prueba consistió en colocar cajas Petri con discos de 5 mm. de diámetro de medio de cultivo V8-agar-3P con crecimiento micelial de los aislamientos más agresivos, solos y en combinación, de tal manera que la suma de los discos colocados en las mezclas de microorganismos fuera igual al número de discos colocados en la inoculación con una sola especie. A la par se colocó un testigo con discos de 5 mm. de diámetro del mismo medio de cultivo sin ningún tipo de crecimiento, en igual número que los tratamientos. A cada caja Petri se le adicionaron 20 ml de agua estéril y se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente (22°C aprox.). Transcurrido este periodo, se colocaron en cada caja 20 plántulas de lechuga tipo Boston de 10 días de edad con raíz desnuda, manteniéndolas a temperatura ambiente y evaluando cada 24 hrs. el número de plántulas muertas para elaborar las respectivas curvas de progreso de la enfermedad y calcular el área bajo la curva.

Se realizaron 3 repeticiones en el tiempo, y con los datos obtenidos se efectuó una prueba de normalidad con el test de Shapiro-Wilk, una prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett, el respectivo análisis de varianza considerando un diseño completamente al azar y una prueba de medias de Tukey

( $\alpha < 0.05$ ). El análisis de datos se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

## **DETERMINACIÓN DEL UMBRAL DE DAÑO**

### **Métodos de cuantificación**

El umbral de daño se expresa en número de organismos o cantidad de inóculo por unidad de muestreo, por lo que fue necesario establecer diversos ensayos para determinar un método rápido y preciso de cuantificación de zoosporas de *Phytophthora drechsleri* en muestras de agua.

Así, en primer lugar se compararon los métodos de siembra en medio de cultivo para cuantificación de unidades formadoras de colonias, cuantificación de zoosporas con hematocitómetro y mediante una prueba de ELISA.

Ya que las zoosporas son las principales estructuras de infección, estos métodos se evaluaron con suspensiones de zoosporas a diferentes concentraciones. Para ello se preparó una suspensión concentrada de zoosporas, colocando en 3 cajas Petri 10 discos de 5 mm. de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial sumergidos en 20 ml. de agua no destilada estéril durante 96 horas, incubándolas a 25°C, alternando 1 hora de luz negra y 2 horas oscuridad. Transcurrido el tiempo se observaron al microscopio para verificar que la liberación de zoosporas se había realizado, se retiraron los discos de medio y se colectó la suspensión de las 3 cajas en un tubo de ensaye. A partir de esta suspensión de esporas se prepararon 6 diluciones consecutivas al 50% de la dilución anterior con agua estéril, y se estableció un testigo o nivel cero, el cual consistió solo en agua estéril, para tener un total de 7 niveles distintos de concentración de zoosporas.

En el caso de siembra en medio de cultivo, se empleó el medio V8-agar-3P, colocando 1 ml. por caja de cultivo y 7 repeticiones por suspensión. Transcurridas 96 hrs. se cuantificaron las unidades formadoras de colonias.

Los conteos en el hematocitómetro se realizaron inmediatamente después de haber preparado las suspensiones, realizando 10 conteos por cada una de ellas. Con los datos obtenidos se calcularon las zoosporas por mililitro para poderlos comparar con la siembra en medio de cultivo.

De acuerdo con Herrera y García (2011), con el fin de normalizar los datos y estabilizar la varianza de los conteos, previendo que se obtendrían valores cercanos a cero, se empleó la transformación  $\log(Y+1)$ , dónde  $Y$  es igual a las unidades formadoras de colonias por mililitro, o en su caso zoosporas por mililitro.

Se realizó el respectivo análisis de varianza en un diseño de bloques al azar, tomando como bloques cada una de las suspensiones. Para verificar si realmente existió un gradiente de concentración entre las suspensiones, se realizó una prueba de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) para cada método, y ambos métodos se compararon en cada bloque también mediante una prueba de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ). El análisis de datos se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Teniendo como antecedentes los trabajos de Ali-Shtayeh *et al.* (1991) y Bush *et al.* (2003) que mencionan que existen kits de pruebas ELISA con buena capacidad de detectar propagulos de especies de *Phytophthora* en muestras de agua, se propuso el uso de esta técnica como un método alternativo de cuantificación de inóculo, correlacionando las absorbancias obtenidas con cierta cantidad de zoosporas.

Para validarlo se emplearon las suspensiones de zoosporas antes preparadas, las cuales se procesaron con un kit comercial ELISA *Phytophthora* PathoScreen® de

la empresa AGDIA® (USA). Se realizaron 2 repeticiones por muestra, y siguiendo el protocolo se colocaron controles positivos, negativos y blancos. Las absorbancias se midieron con un filtro de 405 nm a los 60, 90 y 120 min. después de haber colocado el PNP, con un equipo Multiskan Ascent V1.24 de la empresa Thermo Electron Corporation (USA) para dar oportunidad a que la reacción de la enzima alcalina fosfatasa y el PNP se llevara a cabo, y poder detectar coloración en las concentraciones más bajas de zoosporas.

A los datos obtenidos se les realizó una prueba de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk. Ya que en cada corrida de ELISA existen factores de variación relacionados con la técnica, los controles negativos, positivos y blancos funcionan como parámetros de comparación, por ello fue necesario realizar un ajuste en las absorbancias determinado por estos controles. Para ello, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las absorbancias de las muestras y sus respectivos controles negativo y blanco para poder determinar cuál de ellos tenía más relación con la variación de las absorbancias y poder sustraer dicho efecto de los valores obtenidos. Con los valores ajustados se realizó el análisis de varianza considerando un diseño de bloques al azar donde la razón de bloqueo fue el tiempo en el que se tomo la absorbancia (60, 90 y 120 min.). Se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett y se determinó si existieron diferencias entre los tiempos de medición mediante una prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ), al igual que la sensibilidad del método para detectar diferencias en las concentraciones en cada momento de medición. El análisis de datos se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Para poder utilizar las pruebas ELISA como métodos de cuantificación, se correlacionaron las absorbancias ajustadas a los diferentes tiempos de medición con los conteos en el hematocitómetro y en medio de cultivo. Ya que para estimar el coeficiente de correlación de Pearson es necesario que las variables tengan una distribución normal, el análisis se realizó aplicando la transformación  $\log(Y+1)$  para las variables que no cumplieron el supuesto de normalidad de acuerdo

con la prueba de Shapiro-Wilk. El coeficiente de correlación se estimó con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Las variables con el mayor coeficiente de correlación se utilizaron para diseñar modelos de estimación de zoosporas en función de los valores ajustados de absorbancia, mediante análisis de regresión, tomando como variable independiente la absorbancia ajustada medida a los diferentes tiempos (x) y como variable dependiente los conteos en el hematocitómetro de cada suspensión (y). Se realizó tanto la regresión lineal, aplicando la transformación  $\log(Y+1)$  para las variables que no cumplieron el supuesto de normalidad, como la regresión exponencial, determinando en ambos casos las bandas de confianza al 95% de los modelos. Los análisis de regresión se hicieron con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0, y la representación gráfica de los modelos con el programa Microsoft Excel 2007.

### **Determinación del umbral**

Para poder determinar la relación entre la cantidad de inóculo presente y la mortandad de plántulas de lechuga en sistemas hidropónicos, se establecieron unidades experimentales que pretendían replicar las condiciones del sistema de producción de bandejas flotantes. Así, se instalaron 15 contenedores de cristal de 30 cm. de alto con capacidad de 60 L., equipados con un termostato de 50 watts, un difusor de aire para acuario y un termómetro de cristal.

En cada unidad experimental se colocaron 62 plántulas de lechuga tipo Boston Var. Rex® de la empresa semillera Rijk Zwaan® (Países Bajos) a una distancia de 5 cm. entre plantas, empleando como medio de soporte cubos de espuma de poliuretano sostenidos en placas de poliestireno expandido de 2 cm. de grosor. Para evitar estrés ambiental, la temperatura del aire se mantuvo en 18°C y la de la solución en un rango de 16 a 24°C.

Dado que en los sistemas hidropónicos se puede emplear un sinnúmero de soluciones nutritivas y con el objetivo de evitar el efecto de los fertilizantes en la relación planta-patógeno, se decidió emplear únicamente agua filtrada y purificada como fase líquida del sistema, colocando 50 L. en cada contenedor.

Doce de las quince unidades experimentales fueron inoculadas introduciendo una caja de medio V8-agar-3P con crecimiento micelial del aislamiento de *Phytophthora drechsleri* identificado como el más agresivo durante las pruebas de patogenicidad. Los tres contenedores restantes se emplearon como testigo, colocando en su interior una caja con medio V8-agar-3P sin crecimiento de ningún tipo, para verificar que los síntomas no fueran causados por el medio de cultivo. La inoculación se realizó a los 15 días de edad de las plántulas y a partir de ese momento se evaluó el número de plantas muertas y la temperatura de la fase líquida cada 12 hrs.

El experimento se repitió dos veces en el tiempo, en la primera repetición al momento de la evaluación del estado de las plántulas, se tomaron muestras de agua de 20 ml. las cuales fueron centrifugadas a 3600 rpm durante 10 min., para desechar posteriormente el sobrenadante, re-suspender el sedimento en 1 ml. de agua estéril y procesarlas con el kit comercial ELISA *Phytophthora* PathoScreen®. En la segunda repetición se tomaron muestras de 1.5 ml. de agua las cuales fueron procesadas con el kit directamente, sin ser centrifugadas. Se obtuvo solo una absorbancia por muestra medida a los 60 min. después de colocado el PNP y según el protocolo del kit se colocaron controles positivos, negativos, y blancos. Los datos de absorbancia se ajustaron sustrayendo el valor del control, negativo o blanco, con el que se obtuvo mayor correlación en el apartado de "Métodos de cuantificación". Sin embargo, para verificar esta relación, nuevamente se corrió un análisis de correlación de Pearson entre las absorbancias de las muestras y sus respectivos controles negativo y blanco. Con las absorbancias ajustadas se estimó el número de zoosporas por mililitro presentes en los contenedores de

cristal empleando los modelos diseñados previamente, y considerando el volumen de muestreo.

La dinámica de producción de zoosporas y el desarrollo de las epidemias, al ser procesos biológicos, son naturalmente multifactoriales. Así, con la matriz de datos de plantas muertas, temperatura de la solución y número de zoosporas presentes cada 12 hrs., y considerando el método de muestreo (centrifugado o sin centrifugar), se realizó un análisis de regresión multivariado, evaluando todos los modelos resultantes de la combinación de estas variables en sus diferentes tiempos de muestreo para la estimación confiable de la cantidad de plantas muertas y la cantidad de zoosporas en un momento determinado. Se seleccionaron aquellos modelos con mayor coeficiente de determinación ( $R^2$ ), menor suma de cuadrados del error y menor coeficiente de variación. El análisis de datos se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MUESTREO

Durante la colecta de material vegetal, se observó la pudrición de raíz de plantas de lechuga en la unidad de producción. La pudrición de raíz se presentó de manera indistinta en todas las etapas de producción y en todas las variedades cultivadas, siendo ligeramente más severos en lechugas tipo Boston, y causando la mayor mortandad de plantas en etapas juveniles, de 8-24 días después de la siembra (Figura 2).



Figura 2. Síntomas de pudrición de raíz en lechugas hidropónicas tipo Boston de 15(a), 25(b), 35(c) y 45(d) días después de la siembra.

## AISLAMIENTO

Del total de los fragmentos de raíz colocados en medio de cultivo selectivo a *Pythium spp.*, el 99% desarrollo micelio después de 48 hrs. de incubación. En el caso de aquellos colocados en medio de cultivo selectivo a *Phytophthora spp.*, el 22% dio origen a colonias de microorganismos a las 48 hrs., mientras que a las 72 hrs. el 50% de los fragmentos de raíz ya presentaban crecimiento de micelio (Figura 3).

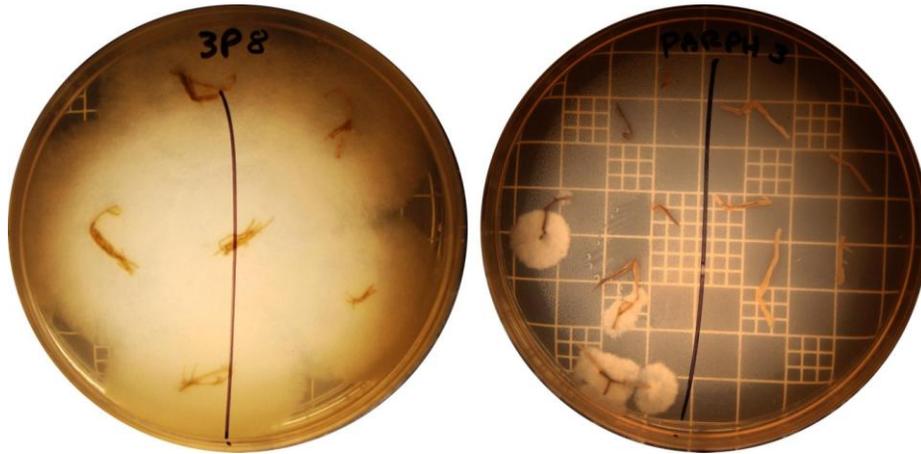


Figura 3. Desarrollo de micelio a partir de fragmentos de raíz de lechuga hidropónica tipo Boston en medio selectivo a *Pythium spp.* (izq.) y *Phytophthora spp.* (der.)

## PURIFICACIÓN

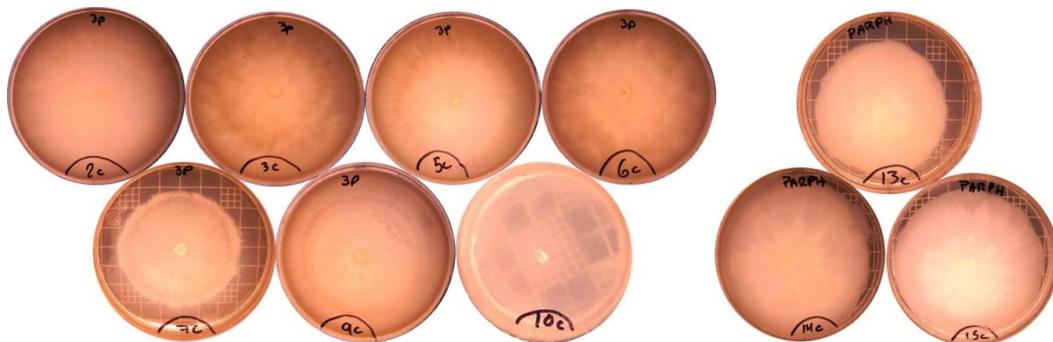
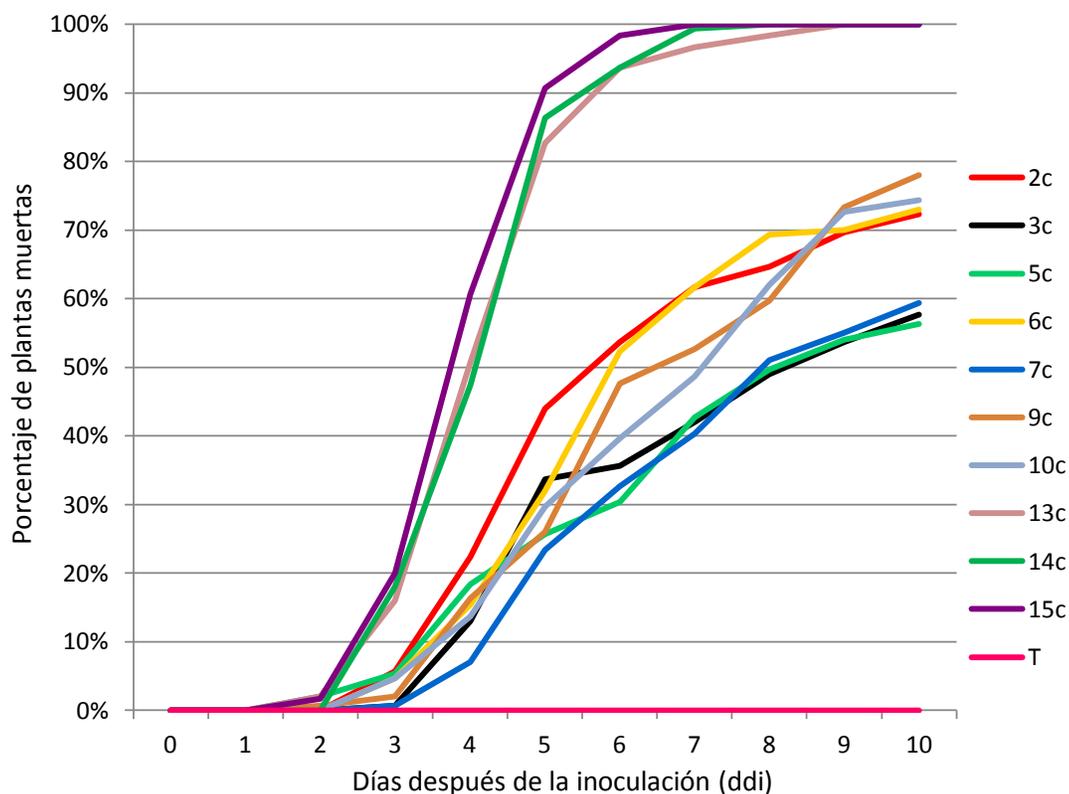


Figura 4. Aislamientos purificados por punta de hifa de colonias formadas a partir de fragmentos de raíz de lechuga hidropónica tipo Boston en medio selectivo a *Pythium spp.* (izq.) y *Phytophthora spp.* (der.)

Basados en la morfología de las colonias obtenidas fue posible obtener 10 cultivos puros: 7 del medio de cultivo selectivo a *Pythium spp.* y 3 del medio de cultivo selectivo a *Phytophthora spp* (Figura 4).

## PRUEBAS DE PATOGENICIDAD



**Figura 5. Curvas promedio del progreso de la enfermedad de los aislamientos al ser inoculados en plántulas de lechuga hidropónica tipo Boston.**

Los síntomas observados en las plantas inoculadas fueron similares a la pudrición de raíces observada en la unidad de producción. El seguimiento del experimento a través del tiempo permitió el cálculo del “área bajo la curva del progreso de la enfermedad” cuyo objetivo fue definir los aislamientos más patogénicos. Esta variable cumple con el supuesto de normalidad (Shapiro-Wilk  $W=0.957248$  y

Pr<W=0.2158) y homogeneidad de varianzas (Barlett  $X^2=8.2186$  y  $Pr>X^2=0.5123$ ) lo que posibilita el análisis de varianza de los datos.

El ANOVA detectó diferencias significativas ( $\alpha < 0.0001$ ) en las diferentes curvas de progreso de la enfermedad, causadas en un 79% por el aislamiento evaluado.

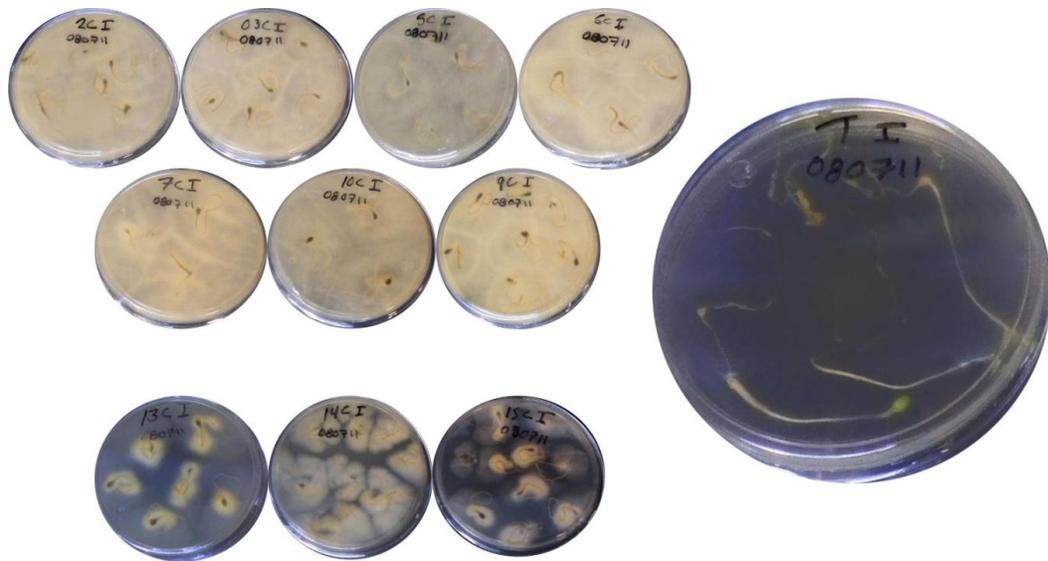
Al realizar la prueba de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ), estas diferencias se hacen más evidentes, arrojando 4 grupos de aislamientos en base a su patogenicidad, y un quinto grupo conformado únicamente por el testigo con una media del área bajo la curva igual a cero (Figura 5). En el caso del grupo A, se observa que los organismos que lo conforman fueron aislados con medio selectivo a *Phytophthora spp.*, mientras que el resto de los organismos inoculados fueron aislados con medio selectivo a *Pythium spp.* Así mismo, las curvas del progreso de la enfermedad muestran que los aislamientos pertenecientes al grupo A, desarrollan más rápidamente la enfermedad, causando la mortandad temprana de las plántulas, a diferencia de los otros aislamientos los cuales causan un incremento en la mortandad de las plántulas casi 24 hrs. después. Estas evidencias dan indicios de la presencia de al menos dos especies de organismos patógenos en la unidad de producción, que aunque poseen diferentes grados de agresividad, ambos son capaces de causar pudrición de raíz y muerte de plántulas de lechuga en un medio acuoso (Cuadro 2).

En las tres repeticiones, al momento de re-aislar los microorganismos a partir de las plantas con síntomas, se observó que el 100% de los fragmentos colocados en los medios de cultivo selectivos, formaron micelio similar a aquel con el que fueron inoculados, mientras que el testigo no desarrollo síntomas ni tampoco tuvo crecimiento micelial en el medio de cultivo, por lo que la muerte de plántulas fue causada por los organismos aislados (Figura 6).

**Cuadro 2. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) del área bajo la curva del progreso de la enfermedad de los aislamientos inoculados en plántulas de lechuga hidropónica tipo Boston.**

Aislamiento	Medio de cultivo con el que se aisló de la unidad de producción	Media del área bajo la curva	Agrupamiento Tukey
15c	Selectivo a <i>Phytophthora spp.</i>	621.33	A
14c	Selectivo a <i>Phytophthora spp.</i>	594.67	A
13c	Selectivo a <i>Phytophthora spp.</i>	590.00	A
2c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	357.83	A B
6c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	341.83	A B
9c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	317.33	A B C
10c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	309.50	A B C
3c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	309.50	B C
5c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	256.50	B C
7c	Selectivo a <i>Pythium spp.</i>	239.67	B C
Testigo	No aplica	0.00	C

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.



**Figura 6. Re-aislamiento de los agentes causales de la pudrición de raíz de plántulas de lechuga tipo Boston en pruebas de patogenicidad.**

## IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA-MOLECULAR

Los aislamientos 13c, 14c y 15c, obtenidos de raíces con síntomas de pudrición sembrados en medio selectivo a *Phytophthora spp.*, fueron morfológicamente similares (Cuadro 3). Las colonias en general se observaban algodonosas, formando roseta en medio PDA y con buen crecimiento micelial a 35°C (Figura 7). En estos aislamientos se observaron de manera consistente la presencia de hinchamientos hifales redondeados; esporangióforos simples con un hinchamiento debajo del esporangio; esporangios ovoides, ligeramente aplanados en el ápice, no papilados, algunos proliferando en el interior de esporangios ya vacíos. Fue posible encontrar conglomerados de zoosporas y no se observaron clamidosporas en ninguno de los aislamientos. Las estructuras sexuales solo se observaron en el aislamiento 15c en poca cantidad y consistieron de oogonios redondos lisos, con paredes gruesas, anteridios anfígenos y oosporas pleróticas (Figura 8).

**Cuadro 3. Características de los aislamientos 13c, 14c y 15c obtenidos con medio selectivo a *Phytophthora spp.* Las medias provienen de 25 observaciones por cada aislamiento y las medidas están en micrómetros.**

<b>Características</b>	<b>13c</b>	<b>14c</b>	<b>15c</b>
Hinchamientos hifales	14.5	12.0	11.5
Esporangios	25.5 x 41.6	24.9 x 36.0	24.0 x 35.1
Oogonios	No se observaron	No se observaron	24.3
Anteridios	No se observaron	No se observaron	14.7x13.3
Oosporas	No se observaron	No se observaron	23.5
Forma de la colonia	Roseta	Roseta	Roseta
Crecimiento a 35°C	Bueno	Bueno	Bueno
NCBI	GU111632.1	GU111632.1	GU111632.1
<b>Especie identificada</b>	<i>Phytophthora drechsleri</i>	<i>Phytophthora drechsleri</i>	<i>Phytophthora drechsleri</i>

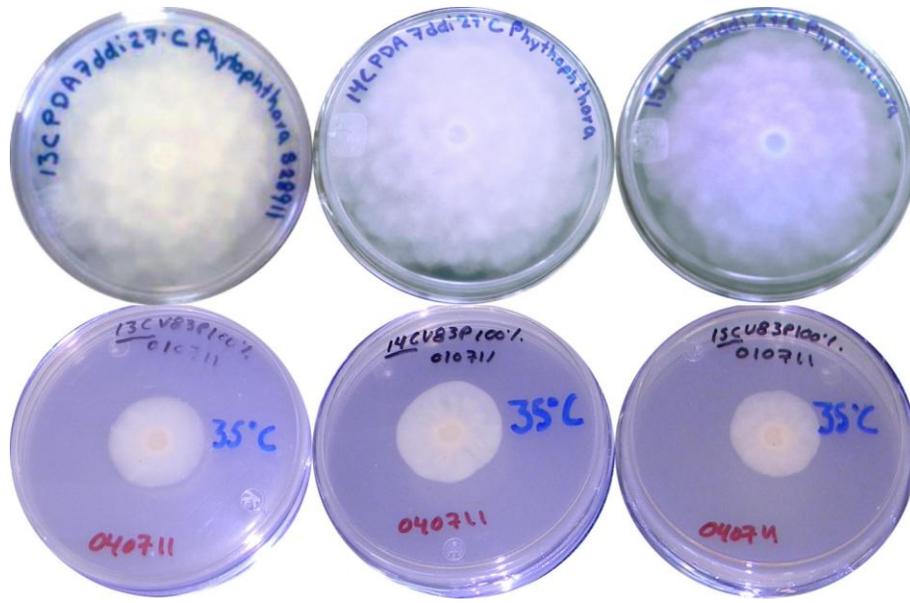


Figura 7. Formación de roseta y crecimiento micelial a 35°C de los aislamientos obtenidos con medio selectivo a *Phytophthora* spp.

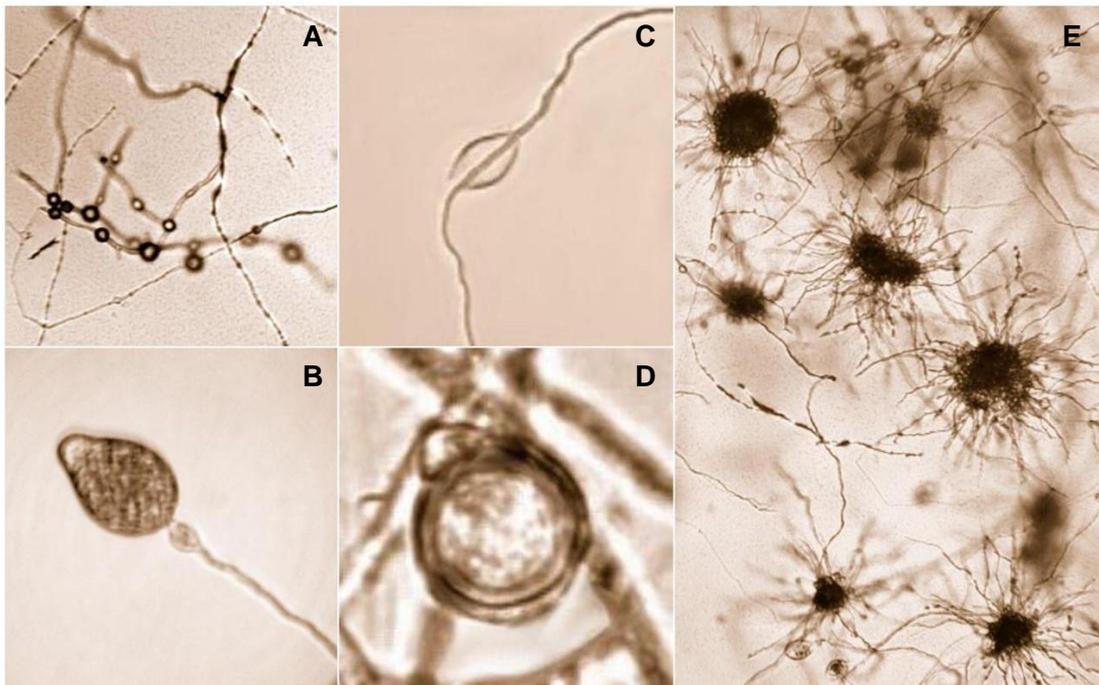


Figura 8. Estructuras observadas de los aislamientos 13c, 14c y 15c obtenidos con medio selectivo a *Phytophthora* spp. A. Hinchamientos hifales. B. Esporangioforo con hinchamiento en la base del esporangio. C. Esporangio vacío con proliferación de esporangioforo en su interior. D. Oospora plerótica con anteridio anfígeno. E. Conglomerados de zoosporas.

La secuencia de la región del ITS amplificada con los primers ITS1 e ITS4 se presenta a continuación para los aislamientos 13c, 14c y 15c. El análisis BLAST realizado en el NCBI mostró que los aislamientos 13c, 14c y 15c tienen un porcentaje de similitud del 100% con la secuencia GU111632.1. Basado en características morfológicas y moleculares se identificó a los aislamientos 13c, 14c y 15c como *Phytophthora drechsleri* (Tucker, 1931; Whaterhouse, 1963; Whaterhouse, 1970; Holliday, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; Bush *et al.*, 2006; CPC, 2010).

• Aislamiento 13c: NNNNNTNNNCCTAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACC  
TTTTTAAATTGGGGGCTTCCGTCTGGCCGGCCGGTTCTCGGCTGGCTGGGT  
GGCGGCTCTATCATGGCGACCGCCTGGGCCTCGGCCTGGGCTAGTAGCGT  
ATTTTTTAAACCATTCCCTAATTACTGAAAAACTGTGGGGACGAAAGTCTCTG  
CTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGA  
TGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGA  
GTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTAT  
GCCTGTATCAGTGTCCGTACACTAACTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTC  
GGTGGATGGGGACGCGCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGGTCTTCGGTC  
CGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTACACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAA  
GCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGTGTGGCATGTCGGCGACCG  
GTTTGTCTGCTGCGGCGTTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGT  
TGGCTTCGGCTGAACAGACGCTTATTGGGTGCTTTTTCTGCTGCGGCGGGA  
TGGACTGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACCGGCGGTAT  
TGTGCGAAGTAGGGTGTCTGTCTCGGCGCAAGCTGGGGTGGGCGAGGGTC  
GATCCATTTGGGAAACGTTGTGTGCGCTTCGGCGTGCATCTCAATTGGACC  
TGATATCAGGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCGAAAANGGGGA  
GAGAAA

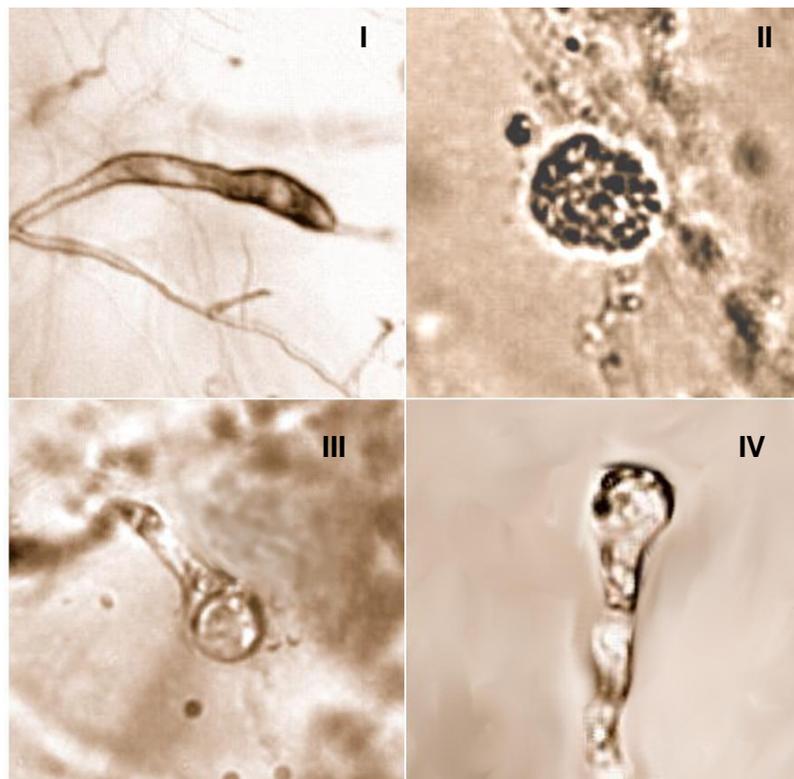
• Aislamiento 14c: NNGTNNTGNNCNTANAACCTTTCCACGTGAACCGTATCAA  
CCTTTTTAAATTGGGGGCTTCCGTCTGGCCGGCCGGTTCTCGGCTGGCTGG  
GTGGCGGCTCTATCATGGCGACCGCCTGGGCCTCGGCCTGGGCTAGTAGC

GTATTTTTTAAACCATTCCCTAATTACTGAAAAAACTGTGGGGACGAAAGTCTC  
TGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATC  
GATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGT  
GAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGT  
ATGCCTGTATCAGTGTCCGTACACTAACTTGGCTCCCTTCCCTTCCGTGTAG  
TCGGTGGATGGGGACGCGCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGGTCTTCGG  
TCCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTACACTGTACTTCTCTTTGCTCGAA  
AAGCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGTGTGGCATGTTCGGCGAC  
CGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATG  
GTTGGCTTCGGCTGAACAGACGCTTATTGGGTGCTTTTTCTGCTGCGGCGG  
GATGGACTGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACCGGCGG  
TATTGTGCGAAGTAGGGTGTCTGTCTCGGCGCAAGCTGGGGTGGGCGAGG  
GTCGATCCATTTGGGAAACGTTGTGTGCGCTTCGGCGTGATCTCAATTGG  
ACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAANCGGG  
AAGGGA

• Aislamiento 15c: GGNANATNNNCNNAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAAC  
CTTTTTTAAATTGGGGGCTTCCCGTCTGGCCGGCCGGTTCCTCGGCTGGCT  
GGGTGGCGGCTCTATCATGGCGACCGCCTGGGCCTCGGCCTGGGCTAGTA  
GCGTATTTTTTAAACCATTCCCTAATTACTGAAAAAACTGTGGGGACGAAAGT  
CTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC  
ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTC  
AGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGG  
AGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACACTAACTTGGCTCCCTTCCCTTCCGTG  
TAGTCGGTGGATGGGGACGCGCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGGTCTT  
CGGTCCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTACACTGTACTTCTCTTTGCTC  
GAAAAGCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGTGTGGCATGTTCGGC  
GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGT  
ATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGACGCTTATTGGGTGCTTTTTCTGCTGCGG  
CGGGATGGACTGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACCGG  
CGGTATTGTGCGAAGTAGGGTGTCTGTCTCGGCGCAAGCTGGGGTGGGCG

AGGGTCGATCCATTTGGGAAACGTTGTGTGCGCTTCGGCGTGCATCTCAAT  
TGGACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGCTGACTTAGATNNNACCGGGGGG  
GGGGGGGGNCTTNTTTCNAA

Los aislamientos 2c, 3c, 5c, 6c, 7c, 9c y 10c, obtenidos de raíces con síntomas de pudrición sembrados en medio selectivo a *Pythium spp.*, se caracterizaron en un inicio por tener un rápido crecimiento, formando abundante micelio aéreo. Con ayuda del microscopio fue posible distinguir en todos los aislamientos esporangios en forma de hinchamientos hifales de diámetros muy variables desde las 4.9  $\mu\text{m}$  hasta las 7.5  $\mu\text{m}$ , y vesículas redondeadas con un gran número de zoosporas en su interior. En el caso del aislamiento 10c se apreció un oogonio terminal con un diámetro de 20.6  $\mu\text{m}$ , y en el aislamiento 5c se pudo observar un apresorio en forma de mazo (Figura 9).



**Figura 9. Estructuras observadas de los aislamientos 2c, 3c, 5c, 6c, 7c, 9c y 10c., obtenidos con medio selectivo a *Pythium spp.* I. Esporangio. II. Vesículas con zoosporas en su interior. III. Oogonio terminal. IV. Apresorio.**

La secuencia de la región del ITS amplificada con los primers ITS1 e ITS4 se presenta a continuación para los aislamientos 2c, 3c, 5c, 6c, 7c, 9c y 10c. El análisis BLAST realizado en el NCBI mostró que los aislamientos 2c, 3c, 5c, 6c, 7c, 9c y 10c tienen un porcentaje de similitud del 90%, 89%, 90%, 98%, 95%, 98% y 97% con la secuencia KC689900.1. Basado en características morfológicas y moleculares se identificó a los aislamientos 2c, 3c, 5c, 6c, 7c, 9c y 10c como *Pythium dissotocum* (Whaterhouse, 1968; Plaats-Niterink, 1981).

• Aislamiento 2c: NNNCGNCNNGGCTATCTTATCCCGTGTACCGTTGTCCTAT  
GTTCTGTGCTCTCTCCTCGGAGAGAGCTGAACCAACGCGGTCTGCTTAATT  
GTAGTCTGCCGATGTACTTTTAAACCCATTAATACTGAACTATACTCC  
GAAAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCTATAACAACCTTTCAGCAGAGGATGTCT  
AGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAAT  
TGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCACATTGCACTTTCGGGT  
TATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCT  
TTTTTTGTGTAGTCAAGAAGAGAGATGGCAGACTGTGAGGTGTCTCGCTGA  
CTCCCTCTTCGGAGGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTCTT  
TCTTGTGTTTTAAAAAAGTGTAACCTTCAAATTCCGGGTTTTGTTTGGTTTCG  
TTTTGTCCGAGGGGGCAATTCCGTTTTGGAATTTAAAGGAATAACCCTTTTTT  
GGGGGAAGGTTGGGTTTCGGCCCAACTTTGCAGCTGACGGGAGTTGTTTTTC  
GGTTCTTTCCTTGAGGGGTACCTGTCTGGTGTAAAGGCAAGGGCCGGGCCAA  
AGGGTTATGGGGTAGAAGGAAGTTGCTGCTCTTAAACGCTCTACCTTCGGT  
TAAAGTAAAGGAGGCAACACCAATTGGGAAAAGTCGTTGATTTATCAAGGGC  
GTTCTTTCTAATTGGACCGGATACCAGGCAAATAACCCGTTGAACTTAAGC  
TTATCATAAAGCGGAAGAATNN

• Aislamiento 3c: GNNCNNNNNAAAACCTTCCACGTGACCGTTGTAACCTATGT  
TCTGTGCTCTTTCCTCGGAGAGAGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAATTGT  
AGTCTGCCGATGTACTTTTAAACCCATTAATACTGAACTATACTCCGA  
AAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCAATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAG  
GCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTG

CAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTTTCGGGTTA  
TGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTT  
TTTTGTGTAGTCAAGAAGAGAGATGGCAGACTGTGAGGTGTCTCGCTGACT  
CCCTCTTCGGAGGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTTTTCC  
TTGGGTAAAAAGGAATGGGACTTTCCAAACGCATGATCCGGTTGGGACCT  
TTTGGCCCTACTGGGGGAACTCGGTTTCAAGATTAAACGGACCAACCCCAT  
TTGGGGGAAGGTAAGGTTTCGCCGACTTTGGAAGTGAACGGAATTTGTTT  
CCGGTCCTTCCTTGAAGGGGTCCTGGCTTTTCGTTAAGGAATGGTCTGGGCC  
AATGGTTATTGTGAATAAGAAGGTGCTGCTCCTTAGAGCTCTAGCTCGGGT  
AGAGTAAAGAGCATCACAATTGGGATAGTCGTGATTATCATGCGCTCTTCTA  
TNGAACTGTATCGANGGACTGACCGACTGNTCTTAGCGTAGCATG

• Aislamiento 5c: GGCNNNNNCAAGAACTTTCCACGTGAACCGTTGTAATA  
TGTTCTGTGCTCTTTCTTCGGAGAGAGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAATT  
GTAGTCTGCCGATGTACTTTTTAAACCCATTAACTAATACTGAACTATACTCC  
GAAAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCAATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCT  
AGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAAT  
TGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTTTCGGGT  
TATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCT  
TTTTTTGTGTAGTCAAGAAGAGAGATGGCAGACTGTGAGGTGTCTCGCTGA  
CTCCCTCTTCGGAGGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTTTT  
CCTGGGGTTAAAAAGAAATGGGACTTTCCAACGCCGTGGTCTGGTTGGAAC  
CCTTTGGTCCAATGGGCGAATTCCGGTAAGAAATTAAGGAAACCACCTCCA  
TTGGGGGTTTTGTAAGGTTCCGGCCCACTTTGCCAGTGAATGGAAGTGGTT  
TCTGGTCCTTCCTTGAAGTGGACCTGGCTTGGGTGAAGCCATGGTCTGGGC  
CAATGGGTATTGGGGTGAAGAAATTGCTGCTCCTTAGCGCTCCAGCCTCC  
GGTAGAAGTAAAGAAGGAACACCCATTTGGGATAAGCCGTGAATTTTCCATG  
GCGCTCCTTCCTATTGGGACTGAAATCAGCCAGACTACCCGNTGAACTAGC  
ATANAANNCANNNGCNGNNTGNNTTCCCTTTTTTTCTCACAAAGGGTGTGAG  
AAAGCTCATAGGCACTGACCTTTACTACAACAANATTGNTNNNN

• Aislamiento 6c: NNNNATNAGCCAGNNCTTTCCCGTGAACCGTTGTA ACTA  
TGTTCTGTGCTCTTCTCGGAGAGAGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAAT  
TG TAGTCTGCCGATGTACTTTTAAACCCATTA AACTAATACTGAACTATACTC  
CGAAAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCAATAACA ACTTTTCAGCAGTGGATGT  
CTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGA  
ATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTTTCGG  
GTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTGCCTTT  
CTTTTTTTGTGTAGTCAAGAAGAGAGATGGCAGACTGTGAGGTGTCTCGCTG  
ACTCCCTCTTCGGAGGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTC  
TTTCTTGGGTTTTAAAATGAAGGGGGACTTTCAAACGCAGGGATCTGTTTGGA  
TCGCTTTGCTCGAGTGGGCGACTTCGGTTAGGACATTAAGGAAGCAACCT  
CTATGGGCGGTATGTTAGGCCTTCGGCCCGACTTTGCAGCTGACTGGAGTT  
GTTTTCTGTTCTTTCCTTGAGGTGTACCTGTCTTGTGTGAGGCAATGGTCTG  
GGCAAATGGTTATTGTGTAGTAGGAAGTTGCTGCTCTTAAACGCTCTAGCTT  
CGGTTAGAGTAAAGGAGGCAACACCAATTTGGGATAGTCGTTGATTTATCAA  
TGCGCTCTTTCTAATTGGACCTGATATCAGGCAAGACTACCCGCTGAACTT  
AAGCATTANAAAGGGGGGGGAGAAAAAACTNGNNTTTTNA AAAAGGGGGG  
AANTTNCAACGCGGTTAAACTATACACACATACATAGTAGTTCT

• Aislamiento 7c: NNAATNANCAAAA ACTTTCCACGTGAACCGTTGTA ACTAT  
GTTCTGTGCTCCTTTCCTCGGAGAGAGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAAT  
TG TAGTCTGCCGATGTACTTTTAAACCCATTA AACTAATACTGAACTATACTC  
CGAAAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCAATAACA ACTTTTCAGCAGTGGATGT  
CTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGA  
ATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTTTCGG  
GTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTGCCTTT  
CTTTTTTTGTGTAGTCAAGAAGAGAGATGGCAGACTGTGAGGTGTCTCGCTG  
ACTCCCTCTTCGGAGGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTC  
TTTCTTGGGTTTTAAAATGAAGGGGGACTTTCAAACGCAGGGACCGGTTTGAA  
CCGCTTTGCTCAAGGGGGCAACTTCGGTTAGGACATTAAGGAACCACCCT  
CTATTGGGCGGTATGTTAGGCCTTCGGCCCGACTTTGCAGTTGACTGAAGTTGT

TTTCGGTTCTTTCCCTTGAGGGGTACCTGTCTTGTGTGAGGCATGGGTCTGG  
GCAAAGGGTAATGGTGTAGAAGAAAGTGGCTGCTCTTAACCGCTCTACCTT  
CGGTTAAAGTAAAGAAGGCAACACCAATTTGGGATAGCCGTTGATTTATCAA  
TGCGCTCTTTCTAATTGAACCTGATATCAGGCAAGACTACCCGCTGAACTT  
AAGCATATCATAAANCGAAGGATT

• Aislamiento 9c: NNAANGNANCCAAAACCTTTNCCGTGAACCGTTGTAECTT  
ATGTTCTGGTGCTCCTCTTCTCGGAAGAAGAAGCTGAACGAAGGTGGGCTG  
CTTAATTCGTAGTCTGCCGATGTACTTTTTAAACCCATTAATACTAATACTGAAC  
TATACTCCGAAAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCAATAACAACCTTTCAGCAGT  
GGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTA  
ATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCAC  
TTTCGGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAECTT  
GCCTTTCTTTTTTTGTGTAGTCAAGAAGAGAGATGGCAGACTGTGAGGTGTC  
TCGCTGACTCCCTCTTCGGAGGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGT  
TCGCTCTTTCTTGTGTTTTAAATGAAAGTGTGACTTTTGAACGCAGGGATCTG  
TTTGGATCGCTTTGCTCGAGGGGGCGACTTCGGTTAGGACATTAAGGAAG  
CAACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACTTTGCAGCTGACTG  
GAGTTGTTTTCTGTTCTTTCCTTGAGGTGTACCTGTCTTGTGTGAGGCAATG  
GTCTGGGCAAATGGTTATTGTGTAGTAGAAAGTTGCTGCTCTTAAACGCTCT  
AGCTTCGGTTAGAGTAAAGGAGGCAACACCAATTTGGGGATAGTCGTTGAT  
TTATCAATGGCGCTCTTTCTAATTGGACCTGATATCAGGCGAGGACTACCCG  
ACTGAACTTAAGCATATCACAAAAGCGAAGGAGGGT

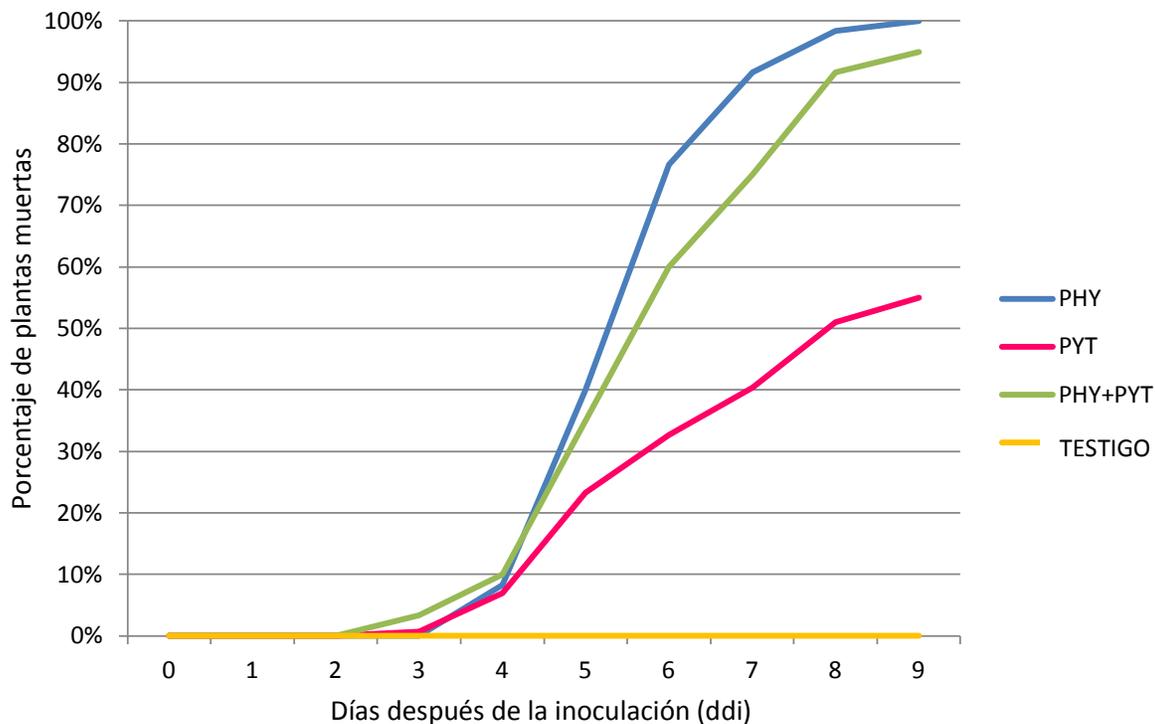
• Aislamiento 10c: NNNNNNGNNCAAACCTTTCCACGTGAACCGTTGTAECTA  
TGTTCTGTGCTCTCTTCTCGGAGAGAGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAAT  
TGTAGTCTGCCGATGTACTTTTTAAACCCATTAATACTAATACTGAACTATACTC  
CGAAAACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCTTTAACAACCTTTCAGCATGGGATGTC  
ACTCTTCGGACATGTATAAAAACTTCGCTCACCGTGAATTTTCTTGCGTTTT  
CCACTCCCTTATGAAACCCTGAACGCCCTGAAGACAACCTTTGGGTAGGGG  
AGATGACTGAAAACTGGAAACCAAACGCTGAATCTTAATTACGTATCTTAA

GCTCCCTACGGTCTTCTCTGCTTTAAAAAATTTACCTCTATTGAACCAAAGAT  
ATTATATTCACCGATCCAAAAAACCTAAGGATAACACCCCCCTCCATTTTTT  
CGATATATCCCCAATTGAGGAAACAACCTTTACGTTGGATTTCCGGAATCCCA  
GTATTGCAACCGCTATTGAACATTCGTTTGTTCAACTCGATAGTCCTCGGAT  
GTTTAATCAAAGGCGATGTTGGGAAAAAATGTGTATGTTCACTTTCTTTTT  
TTTAGAGCCAAGTCACCCGACAAGTTTACATCTTTGGTGCTTTTTTTTTGCGG  
GAAGCTAAAGAAAGAGGCCCCCGACACATATATGGCTATTT

## PRUEBA DE SINERGISMO

En base a los resultados de la prueba patogenicidad se seleccionó la colonia 15c como la más agresiva dentro de los aislamientos de *Phytophthora drechsleri*, y la colonia 2c como la más agresiva dentro de los aislamientos de *Pythium dissotocum* (Cuadro 2). Estos aislamientos fueron inoculados en plantas de lechuga tipo Boston para cuantificar el número de plantas muertas cuando los aislamientos fueron colocados individualmente o combinados respecto a un testigo. Con la mortandad de plantas a través del tiempo se calculó el área bajo la curva que de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk ( $W=0.898978$  y  $Pr < W=0.1539$ ) y Bartlett ( $X^2=0.8002$  y  $Pr > X^2=0.6703$ ) mostró que los datos eran susceptibles de un análisis de la varianza. El ANOVA de esta información detectó diferencias significativas ( $\alpha=0.0007$ ) en las curvas de progreso de la enfermedad causadas en un 86% por las variaciones en la inoculación con los organismos.

Al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) se observa claramente que la muerte de plántulas de lechuga tipo Boston es estadísticamente más rápida al ser inoculadas con *Phytophthora drechsleri* que con *Pythium dissotocum*. Si se inoculan simultáneamente ambos organismos, la tasa de mortandad se acelera respecto a la producida por *Pythium dissotocum*, sin superar la causada por *Phytophthora drechsleri* (Figura 10, Cuadro 4).



**Figura 10. Curvas promedio del progreso de la enfermedad de *Phytophthora drechsleri* (PHY), *Pythium dissotocum* (PYT), y la combinación de ambos (PHY+PYT) al ser inoculados en plántulas de lechuga tipo Boston.**

**Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) del área bajo la curva del progreso de la enfermedad de *Phytophthora drechsleri*, *Pythium dissotocum*, y la combinación de ambos al ser inoculados en plántulas de lechuga tipo Boston.**

Inoculación	Media del área bajo la curva	Agrupamiento Tukey
<i>Phytophthora drechsleri</i>	365.00	A
<i>Phytophthora drechsleri</i> + <i>Pythium dissotocum</i>	322.50	AB
<i>Pythium dissotocum</i>	182.50	B
Testigo	0.00	C

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

## DETERMINACIÓN DEL UMBRAL DE DAÑO

### **Métodos de cuantificación**

El análisis de varianza de los métodos de cuantificación arrojó que la variación en la cantidad de zoosporas se explica en un 73% por el método de empleado y la suspensión evaluada. Así mismo se denota que existen diferencias significativas dentro de los métodos de cuantificación ( $Pr > F < 0.0001$ ), y dentro de las suspensiones ( $Pr > F < 0.0001$ ), lo que indica que si existieron diferencias en la concentración de las suspensiones, y que cada método las detectó de manera diferente.

La prueba de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) para las suspensiones dentro de cada método, muestra que el conteo en el hematocitómetro detectó 6 niveles distintos de concentración de zoosporas, mientras que los conteos en medio de cultivo apenas detectaron 3 niveles, por lo que la cuantificación con hematocitómetro es más sensible que la cuantificación por siembra en medio de cultivo (Cuadro 4).

La prueba de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) para comparar ambos métodos dentro de cada dilución muestra que en la mayoría de las suspensiones evaluadas, los conteos en el hematocitómetro superan a los conteos en cajas Petri, lo que da un indicativo de que la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio de cultivo podría estar subestimando la cantidad real de zoosporas presentes en las suspensiones (Cuadro 5).

Para el caso de la ELISA, la prueba de Shapiro-Wilk confirmó la normalidad de los datos ( $W=0.963057$  y  $Pr < W=0.2252$ ). El análisis de correlación entre las absorbancias de las muestras y las de los controles, determinó que existe mayor asociación entre las absorbancias y el blanco, por lo que para el resto de los análisis se sustrajo este valor de las absorbancias de las muestras (Cuadro 6).

**Cuadro 5. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) de las diferentes concentraciones de zoosporas dentro de cada método de cuantificación.**

<b>Concentración de la suspensión de zoosporas</b>	<b>Media del conteo de zoosporas·ml<sup>-1</sup> con hematocitómetro</b>	<b>Media del conteo de UFC·ml<sup>-1</sup> mediante siembra en medio de cultivo</b>
100%	478000 A	10 a
50%	234000 AB	1.429 ab
25%	89000 ABC	0 b
12.5%	45000 BC	0 b
6.25%	24000 C	0 b
3.13%	2000 D	0 b
0% (Testigo)	0 D	0 b

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

**Cuadro 6. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) de los métodos de cuantificación en cada una de las concentraciones de zoosporas.**

<b>Concentración de la suspensión de zoosporas</b>	<b>Media del conteo de zoosporas·ml<sup>-1</sup> con hematocitómetro</b>	<b>Media del conteo de UFC·ml<sup>-1</sup> mediante siembra en medio de cultivo</b>
100%	478000 A	10 B
50%	234000 A	1.429 B
25%	89000 A	0 B
12.5%	45000 A	0 B
6.25%	24000 A	0 B
3.13%	2000 A	0 A
0% (Testigo)	0 A	0 A

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

**Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre las absorbancias de las muestras y las de los controles negativo y blanco.**

<b>Variables</b>	<b>Coefficiente de correlación Pearson</b>	<b>Prob &gt;  r </b>
Abs. Muestras * Abs. Negativo	0.46084	0.0032
Abs. Muestras * Abs. Blanco	0.51233	0.0009

El ANOVA muestra que la variación en los datos se explica en un 96% por los gradientes de concentración de zoosporas y el tiempo en el que se midió la absorbancia, y que dentro de ambas fuentes de variación existen diferencias significativas ( $Pr > F < 0.0001$ ).

La prueba de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar los tiempos de medición muestra que los tres momentos de medición son diferentes entre sí, ya que de acuerdo a Crowther (1995) conforme transcurre el tiempo, la enzima fosfatasa alcalina reacciona más con el sustrato PNP, por lo que si la reacción no se interrumpe, la coloración de los positivos va incrementando (Cuadro 7).

**Cuadro 8. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) de las absorbancias obtenidas a diferentes tiempos de medición.**

<b>Tiempo de medición</b>	<b>Media de la absorbancia</b>	<b>Agrupamiento Tukey</b>
120 min.	2.47623	A
90 min.	1.91065	B
60 min.	1.40554	C

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Con la prueba de de Bartlett se verificó la homogeneidad de varianzas para los datos obtenidos en cada tiempo de medición, con valores de  $X^2 = 1.5380, 0.8934, 3.4116$  y  $Pr > X^2 = 0.9086, 0.9707, 0.6368$ , a los 60, 90 y 120 min. respectivamente.

En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para detectar la sensibilidad del método en los diferentes tiempos de medición, se observa que desde los 60 min. se detectan diferencias en las concentraciones de las suspensiones de zoosporas, diferenciando 7 niveles de concentración de zoosporas, acordes con las 7 suspensiones evaluadas (Cuadro 8).

Es importante resaltar que incluso en la dilución más alta, en la que con los otros métodos de cuantificación no fue posible determinar la presencia de zoosporas, la medición de la absorbancia nos indica que efectivamente hay presencia de estas, al arrojar valores superiores y estadísticamente diferentes del testigo (agua) en el que efectivamente no había presencia del patógeno. Mac Donald (1990) observó una situación similar, al determinar que plantas con infecciones de bajo grado causadas por *Phytophthora spp.*, se diagnosticaron con mayor eficacia mediante pruebas ELISA que por el método de cultivo en medio.

**Cuadro 9. Comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) de las absorbancias de diferentes concentraciones de zoosporas a diferentes tiempos de medición.**

<b>Concentración de la suspensión de zoosporas</b>	<b>Media de las absorbancias a los 60 min.</b>		<b>Media de las absorbancias a los 90 min.</b>		<b>Media de las absorbancias a los 120 min.</b>	
100%	1.9161	A	2.6215	A	3.3585	A
50%	1.8445	B	2.496	B	3.204	B
25%	1.701	C	2.3115	C	2.9955	C
12.5%	1.5535	D	2.1085	D	2.7525	D
6.25%	1.2485	E	1.725	E	2.261	E
3.13%	0.834	F	1.159	F	1.5375	F
0% (Testigo)	-0.013	G	-0.004	G	-0.027	G

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Al obtener los coeficientes de correlación entre las absorbancias y los métodos de cuantificación, se observa que el mayor grado de asociación lo tienen las

absorbancias con los conteos en el hematocitómetro. Por lo que se descartó el uso de siembras en medio de cultivo como método de cuantificación de zoosporas para la determinación del umbral de daño (Cuadro 9).

**Cuadro 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre las absorbancias tomadas a distintos tiempos y los métodos de cuantificación empleados para estimar las concentraciones de zoosporas en las suspensiones evaluadas.**

<b>Variables</b>	<b>Coefficiente de correlación Pearson</b>	<b>Prob &gt;  r </b>
Hematocitómetro*Absorbancia 60 min.	0.88246	<.0001
Hematocitómetro*Absorbancia 90 min.	0.88773	<.0001
Hematocitómetro*Absorbancia 120 min.	0.88469	<.0001
Medio de cultivo*Absorbancia 60 min.	0.51739	0.0702
Medio de cultivo*Absorbancia 90 min.	0.5006	0.0818
Medio de cultivo*Absorbancia 120 min.	0.48736	0.0912

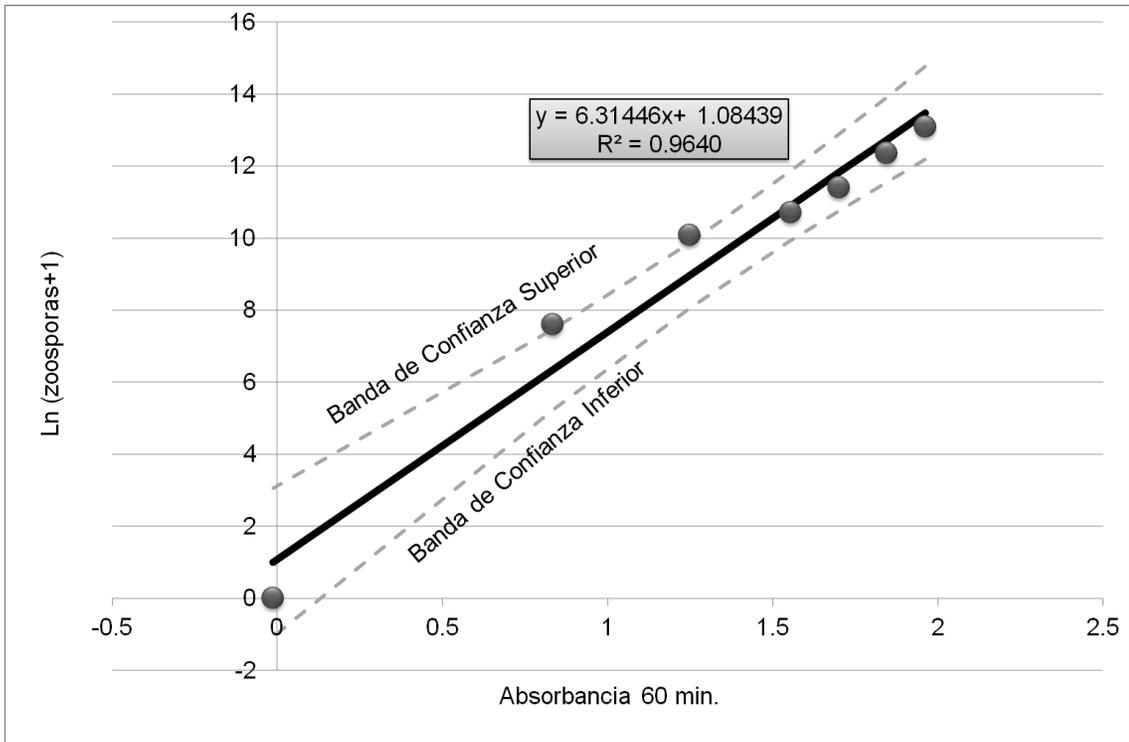
Con los análisis de regresión se obtuvieron 6 modelos de predicción con coeficientes cercanos a 1.0, que permiten estimar de manera confiable el número de zoosporas por mililitro presentes en muestras de agua , después de procesarlas con un kit comercial ELISA *Phytophthora* PathoScreen®, ya sea aplicando los modelos lineales (Figura 11, 13, 15), en cuyo caso además se deberá despejar la variable zoosporas de la ecuación logarítmica  $\log(\text{zoosporas}+1)$ , o aplicando directamente los modelos exponenciales (Figura 12, 14, 16).

La tendencia de los datos es que conforme se incrementa el número de zoosporas, la absorbancia también se incrementa. En el trabajo presentado por Ali-Shtayeh *et al.* (1991) donde también utilizaron pruebas ELISA como método de detección de zoosporas de *Phytophthora spp.* y *Pythium spp.*, encontraron que los valores de absorbancia aumentaron conforme el número de zoosporas aumentaba, por lo que este comportamiento ha sido consistente.

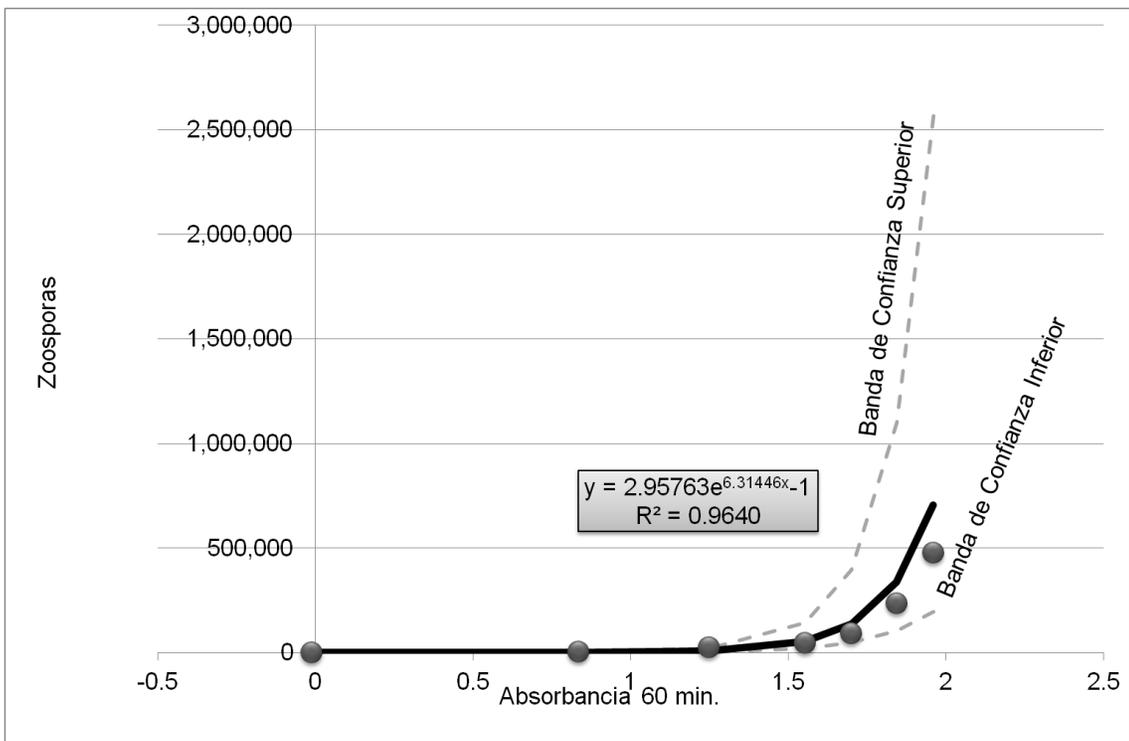
La forma exponencial de las gráficas que asocian directamente el número de zoosporas con una absorbancia se explica en gran medida por la cinética enzimática de la fosfatasa alcalina con el PNP. Las absorbancias son el reflejo de la cantidad de producto generado por el complejo enzima-sustrato, y esa cantidad de producto está determinada en el caso de las pruebas DAS-ELISA, por la cantidad de enzima presente asociada a la muestra, ya que la cantidad de sustrato teóricamente es constante y abundante. Así, conforme se incrementa el número de zoosporas, la cantidad de enzima también va a incrementarse, y la reacción con el sustrato se da cada vez más rápido. Sin embargo se alcanza un punto de equilibrio, en el que la cantidad de enzima se va acercando cada vez más a la cantidad de sustrato presente, reduciendo los puntos de reacción libres, lo que dificulta cada vez más la asociación entre la enzima y el sustrato. Así, la tasa de cambio en la generación de producto se va reduciendo, reduciendo también el incremento en las absorbancias. De esta manera, se observa que a baja cantidad de zoosporas, la variación de las absorbancias entre concentraciones consecutivas es muy amplia, sin embargo conforme la cantidad de zoosporas se incrementa, las diferencias entre las absorbancias de concentraciones consecutivas se van haciendo más pequeñas (Peña, 2004).

Se observa también que los modelos tanto lineales como exponenciales a los diferentes tiempos tienen un comportamiento similar, solo que estos se desplazan hacia valores más elevados de absorbancia conforme transcurre el tiempo, debido a que hay mayor tiempo de reacción de la enzima alcalina fosfatasa con el sustrato PNP.

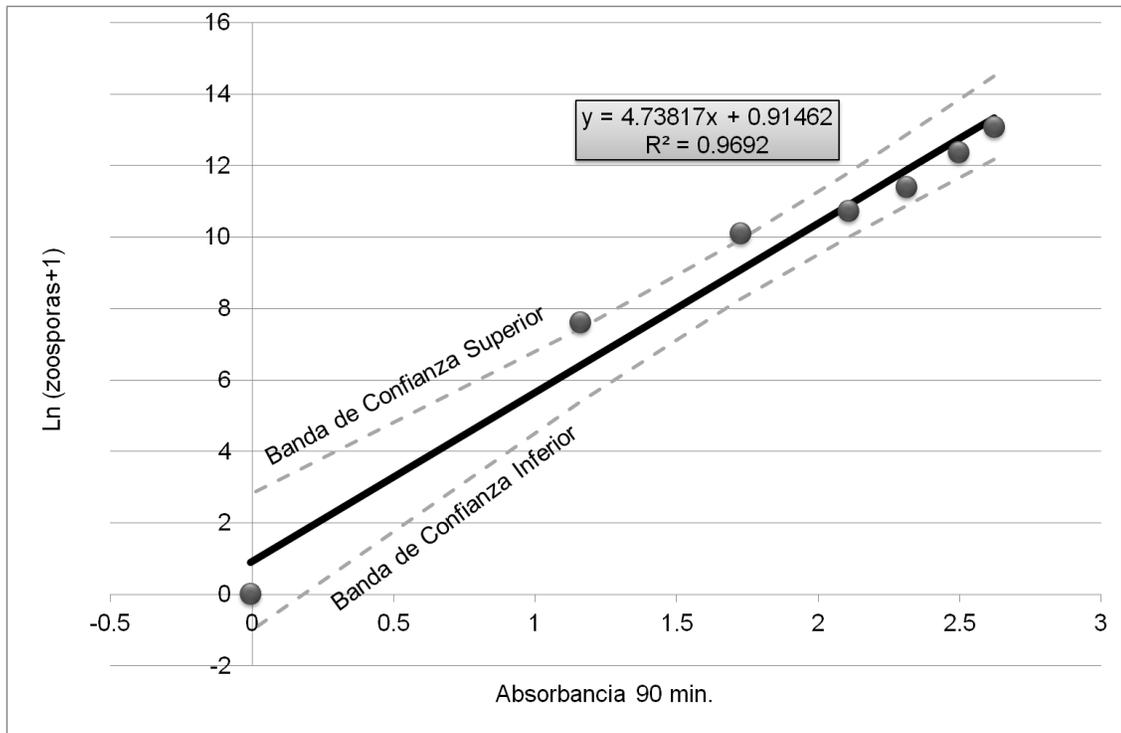
Las bandas de confianza para cada modelo muestran que conforme aumenta la absorbancia, se tiene una mayor variación en la estimación de la cantidad de zoosporas, dada por la amplitud de las bandas de confianza. Por lo que la estimación con valores bajos de absorbancia tienen más precisión.



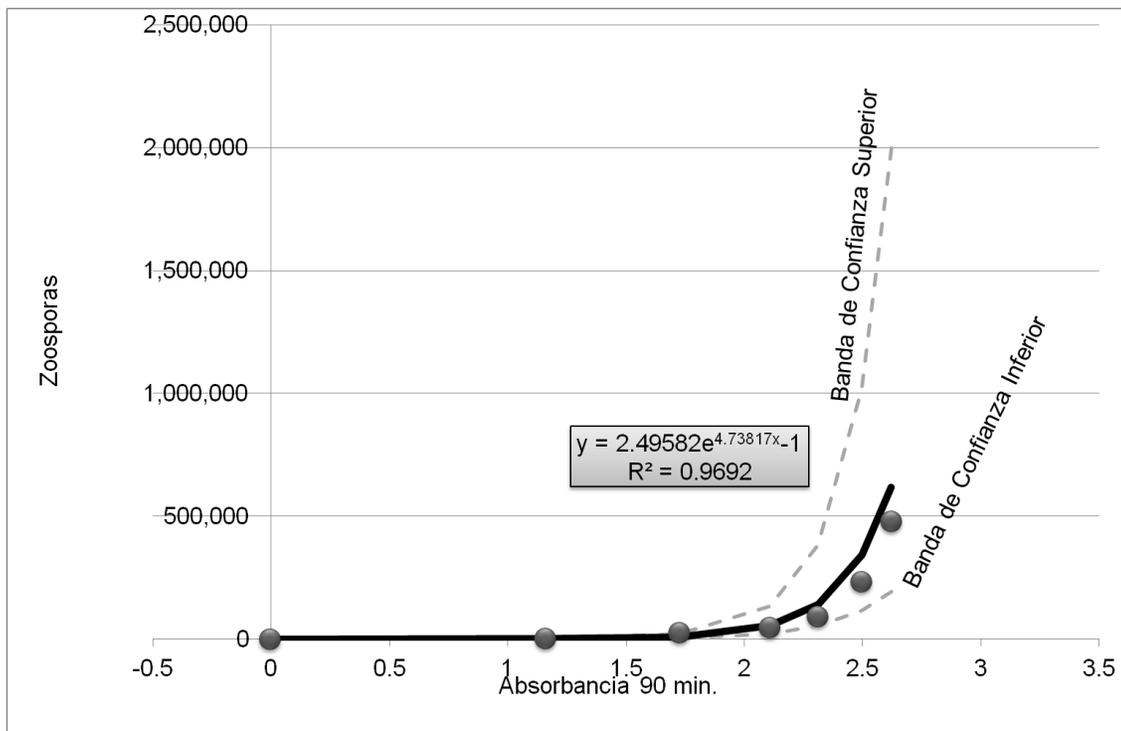
**Figura 11. Modelo de regresión lineal para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 60 min.**



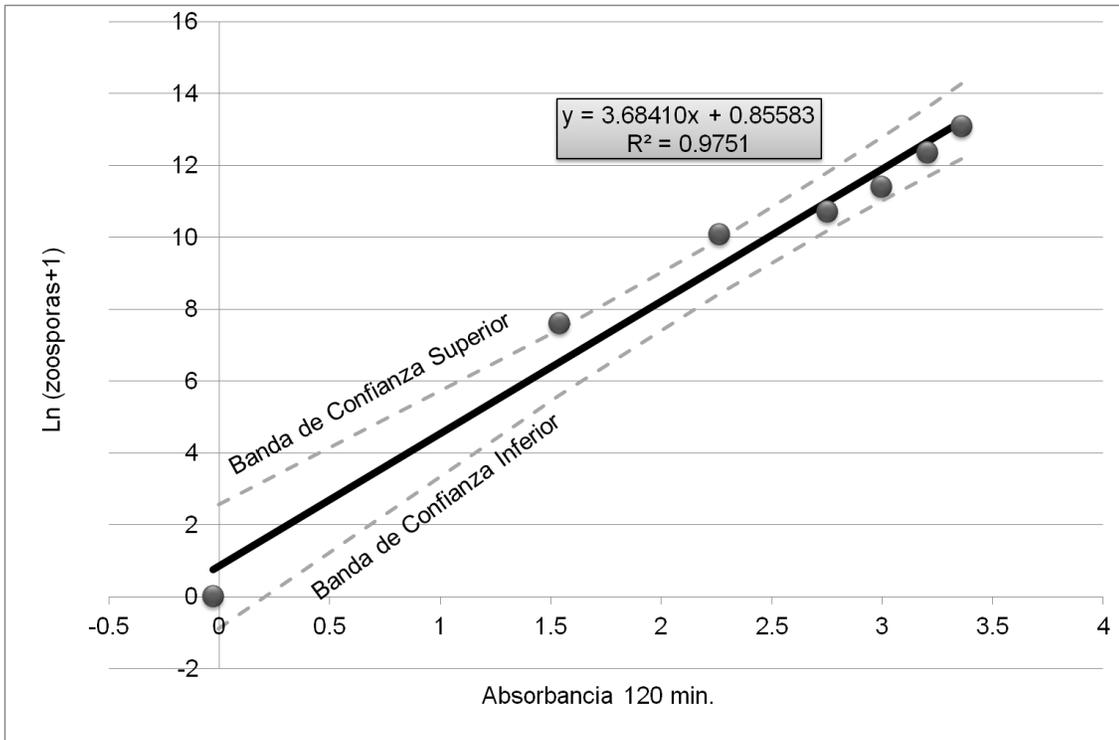
**Figura 12. Modelo de regresión exponencial para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 60 min.**



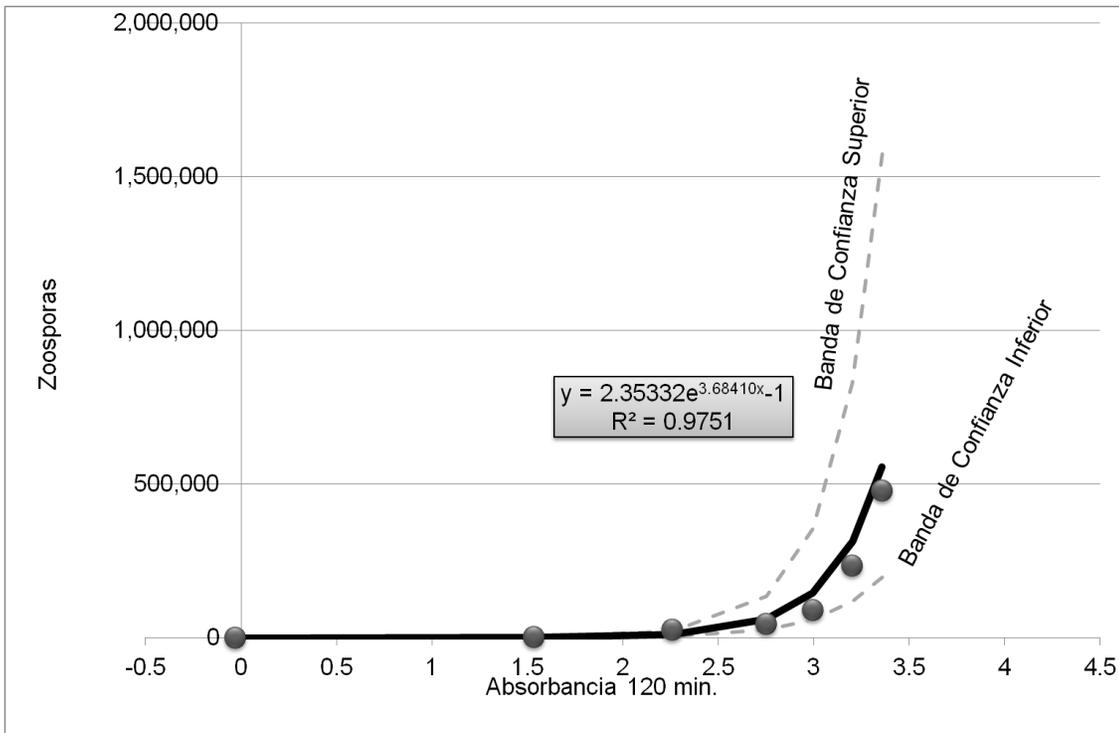
**Figura 13. Modelo de regresión lineal para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 90 min.**



**Figura 14. Modelo de regresión exponencial para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 90 min.**



**Figura 15. Modelo de regresión lineal para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 120 min.**



**Figura 16. Modelo de regresión exponencial para la estimación de zoosporas por mililitro en muestras de agua en función de la absorbancia medida a los 120 min.**

### **Determinación del umbral**

Al realizar el monitoreo del agua en las unidades experimentales se obtuvieron más valores de absorbancia que permitieron validar la relación existente entre la absorbancia de las muestras y la absorbancia de los controles. Con coeficientes de correlación de Pearson más elevados que en los mostrados en el Cuadro 6, se observa que existe más relación entre las absorbancias de las muestras y las absorbancias del blanco, que con las absorbancias del negativo, por lo que el ajuste de los valores por sustracción de la absorbancia del blanco parece válido.

**Cuadro 11. Coeficientes de correlación de Pearson entre las absorbancias de las muestras y las de los controles negativo y blanco durante la determinación del umbral.**

<b>Variables</b>	<b>Coeficiente de correlación Pearson</b>	<b>Prob &gt;  r </b>
Abs. Muestras * Abs. Negativo	0.66166	<0.0001
Abs. Muestras * Abs. Blanco	0.73640	<0.0001

Con la combinación de las variables evaluadas en sus diferentes momentos de muestreo, se obtuvieron 1295 modelos matemáticos para la estimación del porcentaje de plantas muertas. A continuación se presentan aquellos que fueron seleccionados como los más confiables y en el Cuadro 11 se presentan sus respectivos parámetros estadísticos.

Modelo 1:  $y=0.208928447a+2.389433575b+0.11052133d+0.026731677h-0.696789934$

Modelo 2:  $y=0.070605899a+2.050620609b+0.117001764c+0.025835036h-0.712294639$

Modelo 3:  $y=0.025787351a+2.784209549b+0.025834103c+0.000850382e-0.043492241$

Modelo 4:  $y=0.025850935a+2.788208332b+0.025903699c+0.000216802f-0.031114093$

Modelo 5:  $y=0.025843574a+2.790045226b+0.02590958c-0.026812929$

Modelo 6:  $y=0.029508878a+2.770813902b+0.02758714c+0.001182057g-0.053719073$

Dónde:

- y* Plantas muertas estimadas (%).
- a* Es una variable binaria. Si la muestra se centrifugo adopta un valor de 1, si no se centrifugo es igual a 0.
- b* Es el valor de plantas muertas observadas o estimadas 12 hrs. antes del momento en el que se desea calcular “*y*” (%).
- c* Es el valor de zoosporas por mililitro presentes 12 hrs. antes del momento en el que se desea calcular “*y*”.
- d* Es el valor de zoosporas por mililitro presentes 60 hrs. antes del momento en el que se desea calcular “*y*”.
- e* Es el valor de temperatura (°C) de la solución observada al momento en el que se desea calcular “*y*”.
- f* Es el valor de temperatura (°C) de la solución observada 12 hrs. antes del momento en el que se desea calcular “*y*”.
- g* Es el valor de temperatura (°C) de la solución observada 24 hrs. antes del momento en el que se desea calcular “*y*”.
- h* Es el valor de temperatura (°C) de la solución observada 84 hrs. antes del momento en el que se desea calcular “*y*”.

Cuadro 12. Parámetros estadísticos de los modelos diseñados para la estimación de plantas muertas de lechuga tipo Boston por *Phytophthora drechsleri* en sistemas hidropónicos.

Modelo	R <sup>2</sup>	Suma de Cuadrados del Error	Coeficiente de Variación	H0: $\beta_1=\beta_2=\beta_3$		SC TIPO III							
				F	Pr > F	<i>a</i>		<i>b</i>		<i>c, d</i>		<i>e, f, g, h</i>	
						F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F
Modelo 1	0.73	0.132	56.141	15.36	<0.0001	0.05	0.0077	0.19	<0.0001	0.04	0.017	0.03	0.0236
Modelo 2	0.72	0.143	59.241	15.07	<0.0001	0.03	0.0436	0.11	0.0002	0.03	0.033	0.03	0.0288
Modelo 3	0.71	0.278	154.903	117.30	<0.0001	0.02	0.0002	0.46	<0.0001	0.05	<0.0001	0.00	0.4845
Modelo 4	0.71	0.278	155.085	116.91	<0.0001	0.02	0.0002	0.46	<0.0001	0.05	<0.0001	0.00	0.8597
Modelo 5	0.71	0.278	154.702	156.65	<0.0001	0.02	0.0002	0.46	<0.0001	0.05	<0.0001	N/A	N/A
Modelo 6	0.70	0.275	141.555	96.20	<0.0001	0.02	0.0004	0.45	<0.0001	0.05	<0.0001	0.00	0.3999

Al observar el valor de F para todos los modelos, se rechaza la H0, lo que significa que las plantas muertas están relacionadas con las variables incluidas en los modelos. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), indica que la variabilidad en las plantas muertas evaluadas durante los experimentos está determinada en más del 70% por los modelos seleccionados. En todos los casos, las variables “centrifugación de la muestra”, “plantas muertas” y “zoosporas” a sus diferentes tiempos, son significativas, lo que nos indica que la mortandad de las plantas está determinada por estas variables. Sin embargo también se observa que la variable “temperatura de la solución” no siempre es significativa.

En el trabajo de Stanghellini y Rassmusen (1994) se menciona que la prevalencia de enfermedades de la raíz causadas por oomycetes en campo depende principalmente de la densidad de inóculo del patógeno por unidad de volumen de suelo, y en base a los modelos seleccionados se observa que este fenómeno también es consistente en los sistemas hidropónicos.

Se obtuvieron 143 modelos para la estimación del número de zoosporas por mililitro en función de la temperatura, la centrifugación de la muestra y el número previo de zoosporas observadas o estimadas. De ellos, 50 presentaron un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor a 0.90, y 4 modelos tuvieron valores por encima del 0.95. A continuación se presentan los modelos seleccionados como los más confiables y en el Cuadro 12 se presentan sus respectivos parámetros estadísticos.

Modelo A  $y_i=0.7590733j+0.01070697h-0.5002894a+0.32884271$

Modelo B  $y_i=0.54452665i+0.02414636h-1.6371523a+0.43617124$

Modelo C  $y_i=1.02110104j+0.00720795h-0.12813473$

Modelo D  $y_i=-0.32946666k+0.02925661h-2.3124406a+1.93650401$

Dónde:

- $y_1$  Zoosporas estimadas por mililitro.
- $a$  Es una variable binaria. Si la muestra se centrifugo adopta un valor de 1, si no se centrifugo es igual a 0.
- $h$  Es el valor de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) de la solución observada 84 hrs. antes del momento en el que se desea calcular " $y_1$ ".
- $i$  Es el valor de zoosporas por mililitro presentes 12 hrs. antes del momento en el que se desea calcular " $y_1$ ".
- $j$  Es el valor de zoosporas por mililitro presentes 36 hrs. antes del momento en el que se desea calcular " $y_1$ ".
- $k$  Es el valor de zoosporas por mililitro presentes 48 hrs. antes del momento en el que se desea calcular " $y_1$ ".

El valor de F muestra que el número de zoosporas está determinado por la centrifugación de la muestra, la temperatura y el número previo de zoosporas presentes, y que estas variables en sus diferentes tiempos de medición explican más del 95% de la variación en el número de zoosporas.

La temperatura sigue sin ser una variable significativa en la estimación del número de zoosporas, a diferencia de lo expuesto por Stanghellini y Rassmusen (1994), quienes afirman que condiciones de hidroponia, dado que la humedad en la zona radical es relativamente constante, la temperatura de la solución parece ser el factor ambiental más importante que rige tanto en el inicio y como la prevalencia de enfermedades de la raíz causadas por oomycetes.

**Cuadro 13. Parámetros estadísticos de los modelos diseñados para la estimación de zoosporas de *Phytophthora drechsleri* presentes en la fase líquida de sistemas hidropónicos.**

Modelo	R <sup>2</sup>	Suma de Cuadrados del Error	Coeficiente de Variación	H0: $\beta_1=\beta_2=\beta_3$		SC TIPO III					
				F	Pr > F	a		i, j, k		h	
						F	Pr > F	F	Pr > F	F	Pr > F
Modelo A	0.97	0.754	15.765	244.11	<0.0001	3.52	0.0734	27.51	<0.0001	0.91	0.6673
Modelo B	0.97	0.858	16.994	231.84	<0.0001	373.30	<0.0001	22.32	<0.0001	0.90	0.3524
Modelo C	0.96	0.869	16.571	329.80	<0.0001	N/A	N/A	659.26	<0.0001	0.08	0.7821
Modelo D	0.96	1.076	19.617	175.06	<0.0001	42.02	<0.0001	1.38	0.2529	0.93	0.3437

Considerando las temperaturas en las cuales *Phytophthora drechsleri* puede sobrevivir, probablemente el rango de temperaturas evaluadas podría considerarse como reducido, por lo cual el microorganismo no muestra cambios considerables en su capacidad para generar zoosporas y para producir enfermedad, por lo que futuros estudios requerirían el uso de rangos más amplios de temperatura.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados y después del análisis de los mismos se concluye que:

- *Phytophthora drechsleri* y *Pythium dissotocum* son los causantes de la pudrición de raíz de lechugas tipo Boston cultivadas en bandejas flotantes, en el municipio de San Francisco del Rincón, Guanajuato.
- *Phytophthora drechsleri* causa más rápidamente la muerte de lechugas tipo Boston en un medio acuático comparado con *Pythium dissotocum*.
- La cuantificación con hematocitómetro es más sensible a la detección de zoosporas de *Phytophthora drechsleri* en muestras de agua que la cuantificación por siembra en medio de cultivo.
- Es posible detectar cantidades más pequeñas de zoosporas de *Phytophthora drechsleri* en muestras de agua mediante la realización de pruebas ELISA que con hematocitómetro o mediante la siembra en medio de cultivo.
- Es posible estimar de manera confiable el número de zoosporas de *Phytophthora drechsleri* por mililitro presentes en muestras de agua mediante la aplicación de modelos matemáticos, después de procesarlas con un kit comercial ELISA *Phytophthora* PathoScreen®.
- Es posible realizar una estimación confiable del porcentaje de plantas muertas causado por *Phytophthora drechsleri* mediante la aplicación de modelos matemáticos.
- Las variaciones en temperatura dentro del rango entre los 16 y los 24°C no son determinantes para la formación de zoosporas ni para el desarrollo de epidemias causadas por *Phytophthora drechsleri*.

## LITERATURA CONSULTADA

- Abad B., M.; Noguera M., P. y Carrión B., C. 2005. Sustratos para el cultivo sin suelo y fertirrigación. En: Cadahía L., C. 2005. Fertirrigación. Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 299-354.
- Abdolmaleki, M.; Salari, M.; Bahraminejad, S.; Panjeke, N. y Abbasi, S. 2008. Biological activity of the crude extract of Sumac (*Rhus coriaria* L.) on some plant-pathogenic fungi. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 372 p.
- Afshari-Azad, H.; Mirabolfathi, M.; Shafiezadeh, Sh.; Younesi, H.; Alipoor, S. y Ravanlou, A. 2008. Etiology, distribution and their importance of safflower seed decay and *damping-off* in main cultivation areas. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 15 p.
- Alatorre R., R.; Bravo M., H.; Leyva V., J. L.; Huerta de la P., A. 2012. Manejo Integrado de Plagas. Fichas técnicas sobre actividades agrícolas pecuarias y de traspatio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Subsecretaría de Desarrollo Rural. Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. México. 12 p.
- Ali-Shtayeh, M. S.; Mac Donald, J. D.; Kabashima, J. 1991. A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water. Plant disease. 75:305-311.
- Alipoor, S. 2008. Important safflower diseases in Kermanshah province. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 230 p.

- Álvarez, E.; Bellotti, A.; Calvert, L.; Arias, B.; Cadavid, L. F.; Pineda, B.; Llano, G.; Cuervo, M. 2002. Guía práctica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 120 p.
- Arauz C., L. F. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 40 p.
- Arneson, P.A. 2001 Epidemiología de las Enfermedades de las Plantas: Los Aspectos Temporales. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2001-0524-01.
- Bates, M. L., y Stanghelleni, M. E. 1984. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. dissotocum*. Plant Disease 68:989-991.
- Botero C., J. F. 2009. Formulación de alternativas técnicas para la reutilización de soluciones fertilizadas en cultivo de flores, aminorando impactos ambientales. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química. Especialización en ingeniería ambiental. Colombia. 66 p.
- Brasier, C. M. 2008. *Phytophthora* biodiversity: How many *Phytophthora* species are there? En: Goheen, E.M. y Frankel, S.J.2009.Proceedings of the 4th IUFRO Workshop on *Phytophthora* in Forests and Natural Ecosystems. USDA Forest Service. 101-115.
- Brechelt, A. 2004. Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL). Chile. 36 p.

- Bruin, G. C. A. y Edgington, L. V. 1983. The Chemical control of diseases caused by zoosporic fungi. En: Buczacki, S. 1983. Zoosporic plant pathogens. a modern perspective. Ed. Academic Press. E.U.A. 193-230.
- Bush, E. A.; Hong, C.; Stromberg, E. L. 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in Components of a Recycling Irrigation System. Plant Disease Vol 87, No. 12. 1500-1506.
- Bush, E. A.; Stromberg, E. L.; Hong, C.; Richardson, P. A. y Kong, P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. Plant Health Progress. DOI:10.1094/PHP-2006-0621-01-RS.
- Caldeyro S., M. 2003. Social uses of simplified hydroponics by different populations. Practical Hydroponics and Greenhouses. 73:1-6.
- Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola. Editorial Universidad de Salta. Argentina. 151 p.
- Cather, E. J. y Griffin, D. M. 1973. Formation of chlamydospores by *Phytophthora drechsleri*. Transactions of the British Mycological Society 61 (2): 379-402.
- Chastagner, G. A. y Benson, D. M. 2000. The christmas tree: traditions, production, and diseases. Plant Health Progress. DOI: 10.1094/PHP-2000-1013-01-RV.
- Chul, P. H.; Sorenson, W. G. y Davis, R. J. 1978. Aquatic oomycetes in farm ponds in Bryan County, Oklahoma. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science. 58: 48-53 p.

- Cisneros, F. 1992. El manejo integrado de plagas. Guía de investigación CIP 7. Centro Internacional de la Papa. Perú. 38 p.
- Crop Protection Compendium (CPC). 2010. Selected sections for: *Phytophthora drechsleri* f.sp. *cajani* (*Phytophthora* blight). (<http://www.cabi.org/cpc/default.aspx?LoadModule=loginpage&dsID=40963&site=161&page=868>).
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2010. Actividades. (<http://www.senasica.gob.mx/?id=665>).
- Duniway, J. M. 1975. Formation of sporangia by *Phytophthora drechsleri* in soil at high matric potentials. Canadian Journal of Botany 53(13):1270–1275. DOI:10.1139/b75-153
- Elena, K.; Paplomatas, E.; Tzima, A. y Grigoriou, A. 2009. Fitopatología Mediterránea. Abstracts of invited lectures, oral and poster presentations given at the 14th Hellenic Phytopathological Congress, Dalamanara Argolidas, Greece, 7–10 October 2008. Vol. 48, No. 2. 309 p.
- Erwin, D. y Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. EUA. 562 p.
- Esmaili-Shirazifard, E. y Banihashemi, Z. 2008. Host range of *Phytophthora melonis* and *P. drechsleri*. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 74 p.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2006. Fichas técnicas: Lechuga. (<http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ae620s/Pfrescos/LECHUGA.HTM>).

- Fry, W. E. y Niklaus, J. G. 2010. Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2010-1207-01
- García E., R. 2010. Ecología de enfermedades de la raíz. Editorial del Colegio de Postgraduados. México. 130 p.
- Gilsanz, J. 2007. Hidroponia. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Uruguay. 31 p.
- Glass, E. H. 1976. Pest Management: Principles and Philosophy. En: Apple, J. L. y Smith, R. F. 1976. Integrated Pest Management. Plenum Press. E.U.A. 39-50 p.
- Gómez R., O. y Zavaleta M., E. 2001. La asociación de cultivos: una estrategia más para el manejo de enfermedades, en particular con *Tagetes spp.* Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 19, No. 001. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México. 94- 99.
- Gómez, D.; Vásquez, M.; Rodríguez, I.; Posas, F.; Matute, D. 2011. Manejo de plagas. Serie: Producción orgánica de hortalizas de clima templado. PYMERURAL. Honduras. 35 p.
- Gómez, J. 2005. Enfermedades causadas por hongos del suelo en los cultivos hidropónicos. Revista Vida Rural. 30-36.
- Graves, J. B., Leonard B. R., y Ottea J. A. 1999. Chemical approaches to managing Arthropod pests. En: Ruberson, J. R. 1999. Handbook of Pest Management. Marcel Dekker, Inc. E.U.A. 449-486.
- Guzmán D., G. 2004. Hidroponía en casa: Una actividad familiar. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica. 25 p.

- Hansen, E. M. y Hamm, P. B. 1988. *Phytophthora drechsleri* in remote areas Of southeast Alaska. Transactions of the British Mycological Society 91 (3), 379-384.
- Hausbeck, M. K. y Glaspie, S. L. 2008. Control of *Phytophthora* root rot of gerbera daisy with fungicide drenches. Plant Disease Management Reports. 3:OT007.
- Hayes, J. E.; Aldwinckle, H. S. y Jeffers, S. N. 1985. Root and crown rot of cherry in New York caused by *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora cryptogea*. Acta Horticulturae 169, 187-188.
- Heffer, L. V.; Powelson, M. L. y Johnson, K. B. 2012. Oomycetes. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0225-01.
- Hendrix, F.F. y Campbell, W.A. 1983. Some pythiaceous fungi-new roles for old organisms. En: Buczacki, S. T. 1983. Zoosporic plant pathogens, a modern perspective. Ed. Academic Press. E.U.A. 123-160.
- Herrera H., J. G. y García A. C. 2011. Bioestadística en ciencias veterinarias. Procedimientos de análisis de datos con SAS. Universidad Complutense de Madrid. España. 251 p.
- Holliday, P. 1980. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 607 p.
- Holycross, C. C. 1979. The effects of nitrogen fertilization on *Phytophthora* rot of soybeans and on its causal pathogen- *Phytophthora megasperma* var *sojae*. The Ohio State University. 94 p.

- Hyeong-Jin, J., Weon-Dae, C. y Choong-Hoe, K. 2002. Effect of Potassium Phosphonate on the Control of *Phytophthora* Root Rot of Lettuce in Hydroponics. *Plant Pathology Journal* 18(3):142-146.
- Hyeong-Jin, J.; Ki-Woong, N. y Weon-Dae, C. 2001. Severe Root Rot on Hydroponically-Grown Lettuce Caused by *Phytophthora drechsleri*. *Plant Pathology Journal* 17(5):311-314.
- Hyeong-Jin, J.; Wan-Gyu, K. y Weon-Dae, C. 1999. *Phytophthora* Root Rot of Chinese Cabbage and Spinach Caused by *P. drechsleri* in Korea. *Plant Pathology Journal*. 15(1) : 28-33.
- Jenkins, S. F. y Averre, C. W. 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. *Plant Disease* 67:968-970.
- Jones, J. 1997. *Hydroponics: A Practical Guide for the Soilless Grower*. CRC Press. E.U.A. 248 p.
- Kannaiyan, J.; Sheila, V. K. y Nene, Y. L. 1994. A technique for *Phytophthora drechsleri* f. sp. *cajani* sporangia and zoospores production. *International Chickpea Newsletter*, 1:36-37.
- Lamour, K. H.; Daughtrey, M. L.; Benson, D. M.; Hwang, J. y Hausbeck, M. K. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Disease* 87:854-858.
- Lange, L. y Olson, L. 1983. The biological significance of the fungal zoospore. En: Buczacki, S. T. 1983. *Zoosporic plant pathogens, a modern perspective*. Ed. Academic Press. E.U.A. 28-42.

- López A., G. F. 1985a. Oportunidad en la aplicación de plaguicidas. En: López A., G. F. 1985. Curso de orientación para el buen uso y manejo de plaguicidas. Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes A. C. México. 309-317 p.
- López A., G. F. 1985b. Manejo Integrado de Plagas. En: López A., G. F. 1985. Curso de orientación para el buen uso y manejo de plaguicidas. Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes A. C. México. 27-37.
- Mac Donald, J. D.; Stites, J.; Kabashima, J. 1990. Comparison of serological and culture plate methods for detecting species of *Phytophthora*, *Pythium*, and *Rhizoctonia* in ornamental plants. Plant disease 74: 655-659.
- Makambila, C. 1994. The fungal diseases of cassava in the Republic of Congo, Central Africa. African Crop Science Journal Vol. 2. No. 4. 511-517.
- Mansilla, J. P.; Pastoriza, M. I.; Pérez, R. 2001. Estudio sobre la biología de *Bradysia paupera* Tuominoski. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 27:411-417.
- Martin Mortimer, A. M.; Shaw, D. S. y Sansome, E. R. 1977. Genetical Studies of Secondary Homothallism in *Phytophthora drechsleri*. Archives of Microbiology 111:255-259.
- Melgarejo, P.; De Cal, A.; Larena, I.; Sabuquillo, P. y Guijarro, B. 2005. Estrategias para el control biológico de hongos fitopatógenos. En: Jacas, J.; Caballero, P. y Ávila, J. 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea. Universitat Jaume I. Castelló de la Plana, España. 222 p.
- Meneses, R. 2011. Nivel de Daño y Umbral Económico, aspectos decisivos en el Manejo Integrado de Plagas. Revista Infociencia 15(1):1-12.

- Nechwatal, J.; Wielgoss, A.; Mendgen, K. 2008. Diversity, host, and habitat specificity of oomycete communities in declining reed stands (*Phragmites australis*) of a large freshwater lake. *Mycological Research*.112: 689-696.
- Nene, Y. L.; Sheila, V. K.; Sharma, S. B. 1996. A World List of Chickpea and Pigeonpea Pathogens. Quinta Edición. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). India. 27 p.
- Nicholls E., C. I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 282 p.
- Nichols M. A. y Savidov N. A. 2011. Aquaponics: a nutrient and water efficient production system. *Acta Hort.* (ISHS) 947:129-132.
- Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Asociación Española de Ecología Terrestre. *Revista Electrónica "Ecosistemas"* 14 (2): 41-51.
- Norgaard, R. B. 1976. Integrating Economics and Pest Management. En: Apple, J. L. y Smith, R. F. 1976. *Integrated Pest Management*. Plenum Press. USA. 17-28.
- Olson, H. A. 2010. Identification and Characterization of Species of *Phytophthora* on Ornamental Crops in North Carolina Commercial Greenhouses. North Carolina State University. E.U.A. 124 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2001. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Parte III: Los efectos económicos de las plagas y enfermedades transfronterizas de los animales y las plantas. Grupo Editorial Dirección de Información de la FAO. Italia. 199 p.

- Oriz, A.; Rotatori, H.; Schreiber, E.; von Roth, G. 2009. Hydroponic Farming in Mahasarakham. Worcester Polytechnic Institute. Thailand. 137 p.
- Osorio, G. 2008. Agricultura sustentable. Una alternativa de alto rendimiento. Ciencia UANL. Vol. XI, No. 1:77-81.
- Peña, A. 2004. Bioquímica. Segunda edición. Editorial Limusa. México. 427 p.
- Plaats-Niterink, A. J. Van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Stud. Mycol. 21: 1-244.
- Porcuna C., J. L.; Gaude S., M. I.; Castejón de R., P.; Roselló O., J.; Oliver O., A. 2010. Guía de agricultura ecológica de cultivos hortícolas invernadero (E-4). Guías de Agricultura Ecológica del Proyecto Mayas. Federación de Cooperativas Agrarias de la Comunidad Valenciana (FECOAV). España. 112 p.
- Resh, H. 1995. Hydroponic Food Production. 5a Edición. Woodbridge Press Publishing Company. E.U.A. 527 p.
- Resh, H. M. 2001. Cultivos hidropónicos. 5ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 558 p.
- Rodríguez-Delfín, A. 2012. Advances of hydroponics in Latin America. En: Gómez-Merino, F. C.; Trejo-Téllez, L. I. y Rodríguez-Mendoza, M. N. 2012. Proceedings of the second international symposium on soilless culture and hydroponics. Acta horticultrae number 947. International Society for Horticultural Science (ISHS). México. 23-32.

- Roustaei, A.; Sadat, N.; Etebarian H. R. 2004. Study on interaction of salinity and cucurbit wilt disease (*Phytophthora drechsleri* Tucker) in some cucumber cultivars. Seed and plant 20(1):101-115.
- Saadat, Z.; Shafizadeh, Sh. y Rezaee, S. 2008a. Identification of root and crown rot causal agent of cucumber in Isfahan greenhouses. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 145 p.
- Saadat, Z.; Shafizadeh, Sh. y Rezaee, S. 2008b. Chemical and biological control of *Phytophthora drechsleri* (damping-off) on cucumber. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 359 p.
- Santos H., M.; Blanco P., R.; Diánez M., F.; Tello M., J. C. 2004. Aspectos fitosanitarios generales de los cultivos sin suelo. En: Urrestarazu G., M. 2004. Tratado de cultivo sin suelo. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 489-537.
- Sanz de G., J.; Uribarri, A.; Sádaba, S.; Aguado, G.; Del Castillo, J.; Biurrun, R. 2003. Hidroponia en Navarra. Navarra agraria. No. 136. 37-48.
- Sarpeleh, A.; Sharifi, K.; Alavi, A. y Sonbolkar, A. 2008. Antifungal activity of wild rue (*Peganum harmala* L.) on some phytopathogenic fungi. En: 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Agosto, Hamedan, Iran. 356 p.
- Schmitthenner, A. F. 1970. Significance of populations of *Pythium* and *Phytophthora* in soil. En: Toussoun, T. A.; Bega, R. V. y Nelson, P. E. 1970. Root diseases and soil-borne pathogens. University of California. E.U.A. 25-26.
- Serrano, M. S. 2006. Control biológico de insectos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.

(<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006631/lecciones/cap03/lec03c.html>)

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2010. Cultivos de Interés: Lechuga. ([http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=190&Itemid=82](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=190&Itemid=82)).

Shahidi B., G. H.; Barkhordar, B.; Pakgohat, N.; Aghighi, S.; Biglary, S.; Rashid F., P.; Aminaii, M.; Mahdavi, M. J. y Aghelizadeh, A. 2006. Biological control of *Phytophthora drechsleri* Tucker, the causal agent of Pistachio Gummosis under greenhouse conditions by use of actinomycetes. *Plant Pathology Journal* 5(1): 20-23.

Sharifi, T. A. y Nazari, S. 2004. Antagonistic Effects of *Trichoderma harzianum* on *Phytophthora drechsleri*, the Causal Agent of Cucumber *Damping-off*. XXVI International Horticultural Congress: Managing Soil-Borne Pathogens: A Sound Rhizosphere to Improve Productivity in Intensive Horticultural Systems. *ISHS Acta Horticulturae* 635, 137-139.

Sharma, M.; Pande, S.; Pathak, M.; Narayana, J.; Kumar, A.; Madhusudan, D.; Reddy; Benagi, V. I.; Mahalinga, D. M.; Zhote, K. K.; Karanjkar, P. N. y Eksinghe, B. S. 2006. Prevalence of *Phytophthora* Blight of Pigeonpea in the Deccan Plateau of India. *Plant Pathology Journal*. 22(4): 309-313.

Shohett, S. y Strange, R. N. 1989. Use of isolated cells and protoplasts to detect phytotoxic activity in cultures of *Phytophthora drechsleri f.sp. cajani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34, 345-359.

- Singh, B. y Dubey, S. C. 2010. Bioagent based integrated management of *Phytophthora* blight of pigeonpea. Archives of Phytopathology and Plant Protection. Vol. 43, No. 9: 922–929.
- Singh, U. P. y Chauhan, V. B. 1992. *Phytophthora* blight of pigeon pea. In: Plant diseases of international importance. Volume I. Diseases of cereals and pulses, Singh US, Mukhopadhyay AN, Kumar J, Chaube HS, eds. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall, Inc., 375-387.
- Singh, U. P.; Chauhan, V. B.; Wagner, K. G.; Kumar, A. 1992. Effect of Ajoene, a Compound Derived from Garlic (*Allium sativum*), on *Phytophthora drechsleri* f. sp. *cajani*. Mycologia, Vol. 84, No. 1:105-108.
- Sociedad Española de Fitopatología. 2010. Patógenos de plantas descritos en España. 2ª Edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. 854 p.
- Stanghellini, M. E. y Miller, R. M. 1997. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Plant Disease Vol. 81 No.1:4-12.
- Stanghellini, M.; Rasmussen, S. 1994. Hydroponics. A solution for zoosporic pathogens. Plant Disease. Vol. 78. No. 12:1129-1138.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosch, K. y Ragen, K. S. 1959. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: the integrated control concept. Hilgardia 29:81-101.
- Strange, R. N.; Pippard, D.J.; Strobel, G. A. 1982. A Protoplast assay for phytotoxic metabolites produced by *Phytophthora drechsleri* in culture. Physiological Plant Pathology 20, 359-364.

- Thomas, C. A. y Hill, R. F. 1977. Reaction of cotyledons of safflower cultivars to *Phytophthora drechsleri*: effect of temperature and inheritance. *Phytopathology* 67: 698-699.
- Tian, X. S.; Xie, S. D.; Jiang, X. B.; Zhou, X. M.; Yang, L. M.; Xiao, D. J. 2003. Bandunamide, a Novel Cyclopeptide from the *Streptomyces griseovariabilis bandungensis*. *Chinese Chemical Letters* Vol. 14, No. 12, 1255-1258.
- Toro C., D. R. 2004. La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir. Universidad de Caldas. Revista Electrónica "Luna Azul". No. 19.
- Tucker, C.M. 1931. Taxonomy of the Genus *Phytophthora* de Bary. *Research Bulletin of the Missouri Agricultural Experiment Station*. 153:1-208.
- Urrestarazu G., M. 2004. Bases y sistemas de los cultivos sin suelo. En: Urrestarazu G., M. 2004. *Tratado de cultivo sin suelo*. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 3-47.
- Viñuela, E. 2005. La lucha biológica, pieza clave de la Agricultura Sostenible. En: Jacas, J.; Caballero, P. y Ávila, J. 2005. *El control biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea*. Universitat Jaume I. Castelló de la Plana. España. 222 p.
- Whaterhouse, G. 1963. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. *Mycological Papers*. No. 92. Commonwealth Mycological Society. England. 22 p.
- Whaterhouse, G. 1968. The Genus *Pythium* Pringsheim. *Mycological Papers*. No. 110. Commonwealth Mycological Society. England. 71 p.

- Whaterhouse, G. 1970. The Genus *Phytophthora* De Bary. Segunda Edición. Mycological Papers. No. 122. Commonwealth Mycological Society. England. 59 p.
- Webster, H. S. 1982. Plant Protection: an integrated interdisciplinary approach. The Iowa State University Press. Iowa, E.U.A. 297 p.
- Wolcan, S.; Grego, P.; Ronco, L. 2010. Enfermedades de *Coleus* spp. En: Nome, S.F.; Docampo, D.M. y Conci, L.R. 2010. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Atlas fitopatológico argentino. Vol. 3, No. 4. (<http://www.fitopatoatlas.org.ar>).
- Younesi, H.; Afshari-Azad, H.; Sheikholeslami, M. y Safaee, D. 2008. Etiology, distribution and importance of fungal root rot diseases of safflower in Kermanshah Province. 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 Aug. 242 p.
- Zinnen, T. 1988. Assessment of Plant Diseases in Hydroponic Culture. Plant Disease Vol. 72 No. 2. The American Phytopathological Society. 96-99.