



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

## **DISTRIBUCIÓN Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.), EN GUERRERO, MÉXICO**

**SANTO ANGEL ORTEGA ACOSTA**

**TESIS**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

---

La presente tesis titulada; **DISTRIBUCIÓN Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.), EN GUERRERO, MÉXICO**, realizada por el alumno: **Santo Angel Ortega Acosta**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



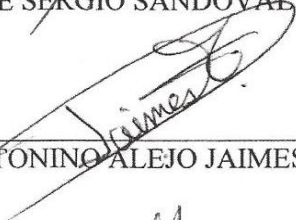
DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR:



DR. JOSÉ SERGIO SANDOVAL ISLAS

ASESOR:



DR. ANTONINO ALEJO JAIMES

ASESORA:



M.C. VICTORIA AYALA ESCOBAR

ASESOR:



M.C. LAURO SOTO ROJAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2012

# **DISTRIBUCIÓN Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.), EN GUERRERO, MÉXICO**

**Ortega-Acosta, Santo Angel**

**Colegio de Postgraduados, 2012**

## **RESUMEN**

La enfermedad “pata prieta” de la jamaica es una de las principales limitantes fitosanitarias del cultivo de ésta especie en la zona productora más importante del estado de Guerrero, con pérdidas que rebasan el 50% de la producción. La presente investigación se realizó con la finalidad de conocer la distribución y frecuencia de organismos asociados a la enfermedad en 12 sitios ubicados en los municipios de Ayutla y Tecoanapa, Guerrero. Se consideraron variables ambientales y edáficas de los sitios seleccionados. La identificación de organismos se realizó mediante claves taxonómicas y fue confirmada con técnicas moleculares. Los organismos asociados con la enfermedad fueron *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Colletotrichum truncatum* y *Glomerella cingulata*. El oomiceto *P. parasitica* fue el de mayor importancia por su alta frecuencia y distribución. En pruebas de patogenicidad *P. parasitica*, *M. phaseolina* y *F. incarnatum* resultaron ser patógenos. *P. parasitica* ha sido reportado en esta zona como el principal agente causal de la enfermedad, por lo que se estableció el estudio de su variabilidad genética a nivel de la región ITS del ADNr, además de realizar un análisis filogenético, a partir de aislamientos provenientes de los municipios en estudio, adicionalmente se consideró un aislamiento del municipio de Juan R. Escudero del mismo estado. Un total de 13 aislamientos de *P. parasitica* fueron analizados, evidenció variaciones a nivel de la región amplificada, el análisis filogenético permitió diferenciar cuatro grupos.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, pudrición basal, patógenos, complejo fungoso, pseudohongo, variación.

**DISTRIBUTION AND GENETIC VARIABILITY OF ORGANISMS ASSOCIATED  
WITH THE ROSELLE'S "BLACKLEG" DISEASE (*Hibiscus Sabdariffa* L.), IN  
GUERRERO, MEXICO**

**Ortega-Acosta, Santo Angel**

**Colegio de Postgraduados, 2012**

**ABSTRACT**

Roselle's "blackleg" disease is one of the main phytosanitary limiting of culture of this specie in the most important producing area in Guerrero, with losses that exceed 50% of production. This research was accomplished with the purpose of determining distribution and frequency of organisms associated to disease at 12 places located in the townships of Ayutla and Tecoanapa, Guerrero. Enviromental and edaphic variables of assigned sites were considered. Identification was made with taxonomic keys and confirmed with molecular techniques. Organisms associated to disease were *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella cingulata*. Oomycete *P. parasitica*, was the most important for its high frequency and distribution. In pathogenicity tests, *P. parasitica*, *M. phaseolina* and *F. incarnatum* were found to be pathogenic. *P. parasitica* has been reported in this area as the main causative agent of disease, for that reason was established the study of its genetic variability at level of ITS region of rDNA, besides of phylogenetic analysis, starting from isolations proceeding of studies townships. Additionally was considered one isolation from Juan R. Escudero township in the same state. A total 13 isolation of *P. parasitica* were analyzed, showing variation at level of amplified region and phylogenetic analysis allowed to distinguish four groups.

**Key word:** *Hibiscus sabdariffa*, basal rot, pathogenic, fungus complex, pseudo-fungus, variation.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Postgraduados y al Instituto de Fitosanidad, por la oportunidad que me ofreció para realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico para realizar mis estudios de Postgrado.

Al Dr. Javier Hernández Morales, por su amistad, fungir como mi consejero, dirigir el desarrollo de la presente investigación y de su invaluable apoyo otorgado en todo momento, con gran aprecio.

Al Dr. José Sergio Sandoval Islas, por su amistad, acertadas sugerencias, invaluable apoyo y consejo que me brindó durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Antonino Alejo Jaimes, por su amistad, gran apoyo, consejos y motivación que siempre me ha brindado.

A la M. en C. Victoria Ayala Escobar, por su amistad, por su valiosa asesoría y apoyo constante en laboratorio para realizar los estudios morfológicos y moleculares.

Al M. en C. Lauro Soto Rojas, por su gran apoyo, sugerencias y sus valiosas aportaciones al presente trabajo, además de su gran amistad.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, por su amistad y por las facilidades que me otorgó en el laboratorio de Virus Fitopatógenos.

Al Ing. Julio Cesar Cen Caamal, por brindarme su apoyo y amistad durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A la Ing. Iobana Alanís Martínez, por su valiosa colaboración en los estudios moleculares.

Al Ing. Pedro V. Hernández Romero, por su gran amistad y gran apoyo otorgado para la realización del presente trabajo.

Al Ing. Cesar Altamirano Rivera, por brindarme su apoyo durante las etapas de muestreo y su apreciable amistad.

Al Ing. Ignacio Mendoza, por su gran apoyo brindado en cada una de las etapas de salidas a campo, su grata compañía y amistad.

## DEDICATORIA

A mis padres y hermanos: *Filogonia Acosta y Agustín Ortega, Concepción, Blanca N., Cira, José L., Candelario, Isaac, Agustín, Francisco.*

A mi novia: *Olga Adilene González Olea.*

**Esta investigación estuvo financiada por los proyectos:**

- **“Desarrollo del paquete tecnológico integral para la producción de jamaica inocua en Guerreo”,** bajo un convenio de colaboración celebrado entre el INIFAP y el Colegio de Postgraduados, como parte del subproyecto **“Diagnóstico y manejo de problemas fitosanitarios en el cultivo de la jamaica y evaluación de contaminantes microbiológicos”,** bajo un convenio de colaboración celebrado entre el INIFAP y el Colegio de Postgraduados.
  
- **“Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”.** Fondo sectorial SAGARPA-CONACYT con clave-163972.

## CONTENIDO

Pág.

<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
Origen y descripción botánica de la jamaica .....	1
Requerimientos agroecológicos. ....	1
Usos y propiedades.....	1
Producción mundial, nacional y estatal.....	1
Problemas fitosanitarios en el cultivo. ....	2
Antecedentes de la “pata prieta”. ....	2
Importancia de la caracterización de poblacional de fitopatógenos.....	3
Variación en el género <i>Phytophthora</i> .....	3
Estudios filogenéticos en el género <i>Phytophthora</i> . ....	4
Objetivos .....	5
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>6</b>
<b>CAPITULO I.</b> .....	10
<b>DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.), EN GUERRERO, MÉXICO</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	10
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1.1. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
1.2.1. Zona de estudio y Muestreo. ....	12
1.3. Distribución de organismos asociados a la “pata prieta”. ....	13
1.3.1. Frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta” .....	14
1.3.2. Algunos factores relacionados a la enfermedad. ....	14
1.4.2. Caracterización molecular de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica. ....	15



1.4.3. Pruebas de patogenicidad.....	16
1.4.2. Incidencia de la enfermedad.....	17
<b>1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
1.5.1. Distribución de organismos asociados a la “pata prieta.....	18
1.5.2. Frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta”.....	19
1.6. Algunos factores relacionados con la enfermedad.....	23
1.7.1. Caracterización molecular de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica.....	24
1.7.2. Pruebas de patogenicidad.....	26
1.7.2.1. Caracterización cultural y morfológica de organismos patógenos de la jamaica, aislados de plantas con síntomas de “pata prieta” en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.....	31
1.7.2.2 Incidencia de la enfermedad.....	34
<b>1.8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>40</b>
<b>VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Phytophthora parasitica</i> Dastur AGENTE CAUSAL DE LA “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) EN GUERRERO, MÉXICO.....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>40</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
2.3. Extracción de ADN.....	42
2.3.1. Amplificación de genes ribosomales.....	43
2.3.2. Análisis filogenético.....	43
<b>2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
2.4.1. Ampliación de genes ribosomales.....	45
2.4.2. Análisis filogenético.....	46
<b>2.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>50</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Altitud y posición geográfica de los sitios de muestreo para el estudio de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica, en Ayutla y Tecoaapa, Gro., México.....	12
Cuadro 2. Frecuencia de hongos y pseudohongos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta” en 12 localidades de los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México. PV-2011. ....	20
Cuadro 3. Características edáficas de 12 parcelas de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) distribuidas en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.....	24
Cuadro 4. Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes ADNr de los organismos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta”.....	25
Cuadro 5. Pruebas de patogenicidad con organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) realizadas en Montecillo, México en 2011, e Iguala, Guerrero en 2012.....	29
Cuadro 6. Incidencia promedio de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en 12 sitios ubicados en cuatro estratos de altitud (msnm), en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Gro. Ciclo PV-2011. ....	34
Cuadro 7. Aislamientos empleados para el estudio de caracterización molecular de <i>Phytophthora parasitica</i> , provenientes de plantas de jamaica del estado de Guerrero.....	42
Cuadro 8. Agrupamiento de 13 aislamientos de <i>Phytophthora parasitica</i> (= <i>P. nicotianae</i> ) obtenidos de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.), con síntomas de “pata prieta” provenientes de tres municipios del estado de Guerrero.....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de muestreo de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en dos municipios del estado de Gro. México. PV-2011. ....	13
Figura 2. Mapa de distribución de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica en el ciclo de producción PV-2011, en Ayutla y Tecoaapa, Gro. ....	19
Figura 3. Síntomas de “pata prieta” causada por diferentes organismos .a) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. b) necrosis de tallo extendiéndose hacia la parte aérea, abarcando parte de las ramas. c) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. d) pudrición en raíces y base del tallo con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance.....	22
Figura 4. Patrones electroforéticos de los productos de PCR (agarosa 2%). Microorganismo/carril: <i>Colletotricum</i> sp./1; <i>Glomerella</i> sp./3 y 4; <i>Macrophomina phaseolina</i> /5, 6, 7, 8 y 9; <i>Phomopsis</i> sp./10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16; <i>Phytophthora parasitica</i> /26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38 ; <i>Fusarium</i> sp./44, 45, 46 y 47; <i>Fusarium solani</i> /48, 49, 50, 51, 52, 53 y 54; <i>Fusarium oxysporum</i> /55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 y 64.....	25
Figura. 5. Hongos y oomiceto patógenos de la jamaica. 1). Cámara de ambiente controlado a) testigo sin inocular b) síntomas causado por <i>Phytophthora parasitica</i> (10 ddi). c) necrosis basal. d) síntomas causados por <i>Macrophomina phaseolina</i> (28 ddi) y e) desarrollo de microesclerocios en la base del tallo (34 ddi). 2). En cielo abierto. <i>Fusarium incarnatum</i> . g) síntomas causados a los 15 ddi. h) necrosis en la base del tallo. f) testigo sin inocular.....	27
Figura 6. <i>Phytophthora parasitica</i> . a) colonia desarrollada en V8- agar con ocho días de crecimiento a 24 °C±2. b) Esporangio ovalado y papilado. c) Clamidospora intercalar. 45X. <i>Macrophomina phaseolina</i> d) colonia desarrollada en PDA a 24 °C ±2. e) microesclerocio 45x. <i>Fusarium incarnatum</i> , ocho días en PDA a 24 °C ±2. f) crecimiento de la colonia con pigmentación naranja en el centro. g) en medio CLA mesoconidios <i>in situ</i> y h) macroconidio septado i) mesoconidios (microconidios) 45x.....	33
Figura 7. Análisis de electroforesis de los productos de PCR para los aislados de <i>Phytophthora parasitica</i> . Aislamiento/carril: PHY1, 7; PHY4, 8; PHY5, 9; PHY6, 10; PHY7, 11; PHY8, 12; PHY9, 13; PHY10, 14; PHY11, 15; PHY12, 16; PHY13, 17; PHY14, 18; PHY15, 19.....	45
Figura 8. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap. El porcentaje de similitud de los aislamientos va de 99 a 100%. Se utilizaron secuencias de referencias de <i>Phytophthora parasitica</i> (GU111666) y <i>Phytophthora nicotianae</i> (JQ070101) y (JF792541), y como organismo fuera de grupo a <i>Pythium aphanidermatum</i> (AY598622).....	46

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### **Origen y descripción botánica de la jamaica.**

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta dicotiledónea y autógama de la familia Malvaceae y es nativa de África (Gomez-Leyva *et al.*, 2008). Esta especie presenta crecimiento arbustivo; con tallo liso o casi liso, cilíndrico, generalmente rojo. Puede llegar a tener una altura de 0.5 a 3 metros; hojas simples, lobulada, con margen aserrado y pedúnculo solitario; flores, solitarias y axilares; cálices mayormente rojos, los cuales son comestibles; el fruto es una cápsula y contiene semillas en forma de riñón (Duke, 1983; Morton, 1987).

### **Requerimientos agroecológicos.**

La jamaica se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios (Morton, 1987), requiere de precipitaciones pluviales de 1500 a 2000 mm/año y, altitudes al nivel del mar hasta los 600 m, se cosecha alrededor de 4-5 meses, periodo en que los cálices han alcanzado la madurez fisiológica (Duke, 1983; Plotto *et al.*, 2004).

### **Usos y propiedades.**

Los cálices son los más explotados de la planta, éstos se obtienen al desprenderlos de su cápsula, posteriormente son usados para la preparación de agua fresca, té, mermeladas, vinos, salsas y jaleas (Rao, 1996; Tsai *et al.*, 2002; Delgado y Paredes, 2003). En la medicina naturista se usa para tratar la hipertensión (Faraji y Tarkhani, 1999), también se le atribuyen propiedades diurética, digestiva y sedativa (Akindahunsi y Olaleye, 2003). Morton (1987) los cálices deshidratados contienen flavonoides, además de antocianinas (Hong y Wroslad, 1990; Tsai y Ou, 1996), por lo que resultan ser buenos colorantes y antioxidantes naturales (Tee *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004). Las hojas y tallos tiernos pueden ser utilizados para preparar ensaladas y las semillas se usan como sustituto del café (Morton, 1987; Domínguez *et al.*, 2007).

### **Producción mundial, nacional y estatal.**

De acuerdo con datos de la FAO, en 2004, China fue el mayor productor de jamaica, seguido por La India, Sudan, Uganda, Indonesia, Malasia y México (FAO, 2004). Los

principales estados productores a nivel nacional son Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Nayarit, Puebla y Campeche (SIAP, 2010).

En 2010 se cultivaron alrededor de 19,000 ha., de jamaica; siendo Guerrero el principal productor con más del 70 % (SIAP, 2010). Los principales municipios productores son Ayutla, Tecoaapa, Juan R. Escudero, San Marcos, Acapulco de Juárez, San Luis Acatlán, Xochistlahuaca, Quechultenago, Coyuca de Benítez y Cuahutepec; el 57% de la superficie cultivada se concentra en Ayutla y Tecoaapa (SIAP, 2010). Esta especie se siembra generalmente asociada con maíz y bajo condiciones de temporal.

### **Problemas fitosanitarios en el cultivo.**

Las enfermedades constituyen las principales limitantes en la producción de jamaica, la planta es susceptible al ataque de varios patógenos, los que causan pudrición de tallo y raíz generan los mayores problemas, a nivel mundial se tienen reportes de; *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnivora* (Swart y Langenhoven, 2000; Augstburger, 2000; Horst, 2008) y *Fusarium oxysporum* (Amusa *et al.*, 2005). Ooi y Salleh (1999) señalan a *Fusarium oxysporum* como el principal agente causante de la marchitez vascular en Malasia.

También son de importancia económica las enfermedades foliares, como son el oídio, las manchas y pudrición de hojas causadas por; *Oidium abelmoschii*, *Cercospora hibisci*, *Coniella musaiensis* var. *hibisci*, *Microsphaera euphorbiae*, *Phoma sabdariffa*, *Phoma exigua*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium camptoceras* y *Rhizoctonia solani* (Persad y Fortune, 1989; Horst, 2008; Eslaminejad y Zakaria, 2011).

### **Antecedentes de la “pata prieta”.**

En México la enfermedad de la “pata prieta” causada por *Phytophthora parasitica* fue reportada en el estado de Guerrero por Hernández y Romero (1990), los síntomas se caracterizan por una pudrición del tallo a la altura del cuello de la planta, seguida de una clorosis, marchitez y caída prematura de hojas, lo que ocasiona la muerte de la planta. Esta enfermedad es de las más destructiva en la zona jamaiguera del estado de Guerrero, se tienen registros de pérdidas hasta

del 50% en la producción cuando las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad (Hernández *et al.*, 2004).

En años recientes se ha observado que algunas de las estrategias ya probadas contra *P. parasitica* no dieron resultado en campo cuando se encontraron plantas con síntomas típicos de la enfermedad. González - Santin (2008) y Ramos-Grajales (2011), mencionan que el hongo *F. oxysporum* se asocia también a esta enfermedad, ya que causa síntomas similares a los provocados por *P. parasitica*. Sin embargo los estudios realizados en esta región han indicado que *P. parasitica* es el principal agente causal de la enfermedad (Hernández y Romero, 1990; González - Santin, 2008; Ramos-Grajales, 2011).

Aun cuando la enfermedad “pata prieta” es común en la zona productora de Ayutla y Tecoaapa, no se cuenta con estudios regionales de la enfermedad. Debido a que *Phytophthora parasitica* se ha reportado como el principal agente causal de la “pata prieta”, se propuso analizar el estudio de la variabilidad genética a nivel de región ITS, entre los aislados obtenidos de plantas con síntomas de la enfermedad.

### **Importancia de la caracterización de poblacional de fitopatógenos.**

El estudio de poblaciones de fitopatógenos resulta importante para determinar el desarrollo de métodos eficaces en el control de la enfermedad, entre estos el conocimiento de la variabilidad genética de la población del patógeno resulta de gran importancia (Leung *et al.*, 1993). Anderson y Kohn (1995) indican que a pesar de que se tiene conocimiento de muchas de las enfermedades de las plantas causadas por patógenos con origen en el suelo, su estructura poblacional es poco conocida.

### **Variación en el género *Phytophthora*.**

Existen reportes de mecanismos de variación en los fitopatógenos, entre ellos la parasexualidad, adaptación, resistencia del hospedante a la enfermedad y heterocariosis (Erwin *et al.*, 1963). La mutación también juega un papel importante (Goodwin, 1997). Brasier *et al.* (1992), mencionan que los fenómenos de la formación de heterocarión y parasexualidad son causas en la generación de variación, procesos comparados con la mutación y la recombinación sexual en *Phytophthora*. Se tienen evidencias de la formación del heterocarión en *Phytophthora*,

por ejemplo en *P. megasperma* mediante el emparejamiento forzado de micelio (Long y Kenn, 1977). Estudios similares con *Phytophthora infestans* también han resultado en la formación del heterocarión (Dyakon y Kuzovnikova, 1974).

En *P. parasitica* se ha reportado la ocurrencia del ciclo parasexual en condiciones de laboratorio (Gu y Ko, 1998). Agrios (2005) señala que la parasexualidad es un proceso que puede inducir variabilidad genética, la cual en ocasiones puede igualar o superar a la generada mediante reproducción sexual. El mecanismo de parasexualidad, puede ser una posible explicación de los cambios de virulencia en las poblaciones predominantemente asexual (heterotalicas) de *Phytophthoras* (Malconsom, 1970).

### **Estudios filogenéticos en el género *Phytophthora*.**

En este género se han explorado una gran cantidad de métodos basados en el estudio del ADN (ácido desoxirribonucleico). Por ejemplo mediante el uso de AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos ampliados) fue construido por primera vez un mapa genético-molecular de *Phytophthora infestans* (Van der Lee *et al.*, 1997). El primer estudio amplio realizado en el género *Phytophthora* con la amplificación de la región ITS (espaciador transcrito interno) ITS1 e ITS2 fue realizado por Cooke *et al.* (2000). Dias *et al.* (2006) mediante la ampliación de la región ITS1 e ITS2 del ADNr (ADN ribosómico), realizaron un análisis filogenético en *Phytophthora parasitica* a partir de aislados obtenidos de diversas zonas citrícolas en Brasil, los resultado indicaron la presencia de variabilidad en la población de *P. parasitica*. Las técnicas RAPD (amplificación al azar del ADN polimórfico) y RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) se ha usado ampliamente para detectar diversidad genética para la mayoría de los aislamientos de las especies de *Phytophthoras* heterotáticas tales como *P. cinnamomi* y *P. parasitica* (Chang *et al.*, 1996; Lacourt *et al.*, 1994; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2009).

Por lo anterior, los objetivos fueron los siguientes:

### **Objetivos**

1. Conocer la distribución y frecuencia de los organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.
2. Determinar la existencia de variación genética a nivel de la región ITS del ADNr, de los aislamientos de *Phytophthora parasitica*, obtenidos de plantas de jamaica.

### **Hipótesis**

1. Existe una distribución y frecuencia de organismos asociados a la enfermedad diferencial en función de las condiciones ambientales.
2. Existe variabilidad genética entre los aislamientos de *Phytophthora parasitica* a nivel de la región ITS del ADNr.



## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Akindahunsi, A. A., Olaleye, M. T. 2003. Toxicological investigation of aqueous methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* L. Journal of Ethnopharmacology 89:161-164.
- Amusa, N.A., Adegbite, A. A. and Oladapo, M.O. 2005. Vascular Wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest Region of South-western Nigeria. Journal of Plant Pathology 4:122-125.
- Anderson, B. J. and Kohn, L. M. 1995. Clonality in soilborne plant-pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 33:369-391.
- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J. and Streit, C. 2000. Organic farming in the tropics and subtropics. Roselle. Exemplary description of 20 crops. Editorial Naturland e. V., Bavaria, Germany. 14 p.
- Brasier, C. M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: Genetic System, Sexuality and the Generation of Variation. Annual Review of Phytopathology 30:153-171.
- Chang, T. T., Yang, W.W., Wang, and W.Y. 1996. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica 37:165-171.
- Cooke, D. E. L., Schena, L., Cacciola, S. O. 2007. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. Journal of Plant Pathology 89: 13-28.
- Delgado, V. F. and Paredes, L. O. 2003. Natural Colorants for Food and nutraceutical uses. CRC Press LLC: Boca Raton. Florida. 327 p.
- Dias, R. D., Machado, M. A., Natividade-Targon, M. L. and Furtado, L. E. 2006. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. Summa Phytopathol 32 (2): 188-91.
- Domínguez, D. S., Domínguez, L. A., González, H. A. y Navarro, G. S. 2007. Cinética de imbibición e isothermas de adsorción de humedad de la semilla de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Revista Mexicana de Ingeniería Química 6 (003): 309-316
- Duke, J. A. 1983. Handbook of energy crops. Unpublished. Purdue University, West Lafayette. Center for New Crops & Plant Products. Disponible en: [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Hibiscus\\_sabdariffa.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html). Consultado el 11 de mayo de 2012.

- Dyakon, Y. T. and Kuzovnikova, T. A. 1974. Heterokaryosis in *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. II. Genetical investigations. Mikol. Fitopatol. 8:81-89.
- Erwin, D. C., Zentmyer, G. A., Galindo, J. and Niederhauser, J. S. 1963. Variation in the genus *Phytophthora*. Annual Review of Phytopathology 1: 375-396.
- Eslaminejad, T. and Zakaria, M. 2011. Morphological characteristics and pathogenicity of fungi associated with Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) diseases in Penang, Malaysia. Microbial Pathogenesis 51:325-337.
- FAO. 2004. Food and agriculture Organization of the United Nations. Statistical Databases and Data-sets. Disponible en: <http://www.fao.org>.
- Faraji, M. H. and Tarkhani, A. H. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) on essential hypertension. Journal of Ethnopharmacology 65:231-236.
- Gómez-Leyva J. F., Martínez-Acosta, L. A., López-Muraira, I. G., Espino, S. H., Cervantez, R. J. and González, A. I. 2008. Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. International Journal of Botany 4:326-330.
- Gonzales-Santin, L. L. 2008. Etiología de la enfermedad ‘pata prieta’ de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 66 p.
- Goodwin, S. B. 1997. The Population Genetics of *Phytophthora*. Phytopathology 87: 462-473.
- Gu, Y. H., and Ko, W. H. 1998. Occurrence of a parasexual cycle following the transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Phytophthora parasitica*. Current Genetics 34:120-123.
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Revista Chapingo (67-68): 50-54.
- Hernández, M. J., Alanis, M. I. y Valadez, M. E. 2004. Variabilidad genética de *Phytophthora parasitica* D., agente causal de la pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante RAPD y RAMPnr. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Veracruz. Numero de resumen: L-70.
- Hong, V. and Wroslad, O. 1990. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanin. J. Agric. Food Chem. 38: 708-715.
- Horst, R. K. 2008. Westcott’s Plant Disease Handbook. 7th edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg . NewYork. 1317 p.

- Lacourt, I., Panabieres, A and Marais, P. 1994. Intraespecific polymorphism of *Phytophthora parasitica* revealed by analysis of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. Mycol. Res. 98: 562-568.
- Leung, H., Nelson, J. R. and Leach, E. J. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: Andrews, J. H., I. C. Tommerup (eds), Advances in Plant Pathology. Academic Press, London. pp 157–205.
- Long, M. and Keen, N. T. 1977. Evidence for heterokaryosis in *Phytophthora megasperma* var. *sojiae*. Phytopathology 67: 670-674.
- Malconsom, J. F. 1970. Vegetative hybridity in *Phytophthora infestans*. Nature 225: 971-972.
- Morton, J. F. 1987. Roselle *Hibiscus sabdariffa* L. In: Morton JF (ed) Fruits of warm climates, Miami FL. pp 281-286.
- Ochoa-Fuentes, YM., Cerna, E., Landeros, J., Vazquez, O., Olalde, V y Flores A. 2009. Diversidad genética de *Phytophthora cinnamomi* Rands de aguacate de Michoacán, México, por medio de RAPD. Phytion 78: 25-30.
- Ooi, K. H. and Salleh, B. 1999. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on roselle in Malaysia. Biotropia 12: 31-41.
- Persad, C. and Fortune, M. 1989. A new disease of sorrel (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*) caused by *Coniella musaiaensis* var. *hibisci* from Trinidad and Tobago. Plant Pathology 38: 615-617.
- Plotto, A., Mazaud, F., Röttger, A. and Steffel, K. 2004. Hibiscus: Post-production management for improved market access. Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), AGST. 19 p.
- Ramos-Grajales, Y. K. 2011. Interacción de *Phytophthora parasítica* Dastur y *Fusarium oxysporum* Schlechtend en el cultivo de la Jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. 47 p.
- Rao, P. U. 1996. Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. Plant Foods for Human Nutrition 49:27-34.
- SIAP. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. Dirección electrónica: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351). Consultado el 02 de mayo de 2012.
- Swart L. and P. Langenhoven. 2000. First report of Botrytis blight, caused by *Botrytis cinerea*, on *Hibiscus* in South Africa Plant Disease 84 (4): 487-48.

- Tee, P. L., Yusof, S., Mohamed, S., Umar, N. A. and Mohammed, N. M. 2002. Effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on serum lipids of Sprague Dawley rats. *Nutrition and Food Science* 32: 190–196.
- Tsai, P. J., Hsieh, Y. Y. and Huang, C. T. 2004. Effect of Sugar on Anthocyanin Degradation and Water Mobility in a Roselle Anthocyanin Model System Using <sup>17</sup>O NMR. *Journal Agriculture Food Chem.* 52 (10): 3097–3099.
- Tsai, P. J. and Ou, A. S. 1996. Colour degradation of dried Roselle during storage. *Food Science* 23: 629-640.
- Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearse, J., Camden, B. and Jordan, B. R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.
- Van der Lee, T., De Witte, I., Drenth, A., Alfonso, C. and Govers, F. 1997. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* 21: 278-291.
- Zhang, X. G., Sun, W. X., Guo, L., J. F. Yu, J. F. and Chang, C. J. 2003. Genetic and Pathogenic Variation Among Tobacco Black Shank Strains of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from the Main Tobacco Growing in in China. *Journal of Phytopathology* 151: 259-266.

## CAPITULO I.

### DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.), EN GUERRERO, MÉXICO

#### RESUMEN

En el ciclo de producción primavera-verano de 2011, en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Gro., se realizó un estudio sobre la distribución y frecuencia de organismos asociados a la enfermedad “pata prieta” de la jamaica. En cuatro etapas diferentes, se muestrearon 12 sitios. Las plantas fueron procesadas en el laboratorio. La presencia de cada organismo fue cuantificada, en base a características culturales y claves taxonómicas, la identidad fue confirmada mediante técnicas molecular. Los organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica fueron *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum*. El organismo de mayor frecuencia y distribución fue *Phytophthora parasitica*, al presentarse en 10 de 12 localidades con 72.4% de frecuencia, seguido por *F. oxysporum* de amplia distribución pero de baja frecuencia (10.6%), *M. phaseolina* presente en cuatro sitios con 10.9% de frecuencia. *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longilla*, *G. cingulata* y *C. truncatum* se presentaron con baja frecuencia y distribución (0.4 a 2.4 %). *P. parasitica*, *M. phaseolina* y *F. incarnatum*, resultaron patogénicos. Se observó que *P. parasitica* se presentó en 10 sitios con pH de 4.7 a 5.5, mientras que en dos sitios que presentaron pH entre 6.6 y 6.8 no se aisló, en estos sitios prosperó *M. phaseolina*.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, complejo fungoso, oomiceto, patógenos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en el estado de Guerrero, constituye una de las principales limitantes fitosanitarias para el cultivo de ésta especie, la cual en años recientes a adquirido mayor importancia, debido a que se han registrado pérdidas del orden del 50% en plantaciones comerciales (Hernández *et al.*, 2004). En estudios realizados en la principal zona productora de Guerrero, se concluyó que el oomiceto *Phytophthora parasitica* es el agente causal principal de la enfermedad (Hernández y Romero, 1990), por lo que a raíz de ello, se han venido implementando estrategias enfocadas a combatir este agente patogénico, sin embargo algunas de estas estrategias no han dado los resultados esperados en campo en el combate de la enfermedad. González-Santin, (2008) y Ramos-Grajales, (2011), señalan que además de *P. parasitica*, *Fusarium oxysporum*, es capaz de causar síntomas similares de “pata prieta” en la jamaica.

A pesar de que la enfermedad es común en esta zona, no se cuenta con estudios regionales de la enfermedad. En estos municipios, el cultivo se distribuye en rangos de altitudes que van desde los 100 msnm hasta alturas superiores a los 700 msnm, se consideró realizar el presente trabajo de investigación mediante un muestro estratificado regional (Ceja-Torres *et al.*, 2000; Gallardo-Reyes *et al.*, 2006). Este conocimiento podrá permitir plantear el mejor diseño de control contra la enfermedad. Por lo que el objetivo fue conocer la distribución y frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.

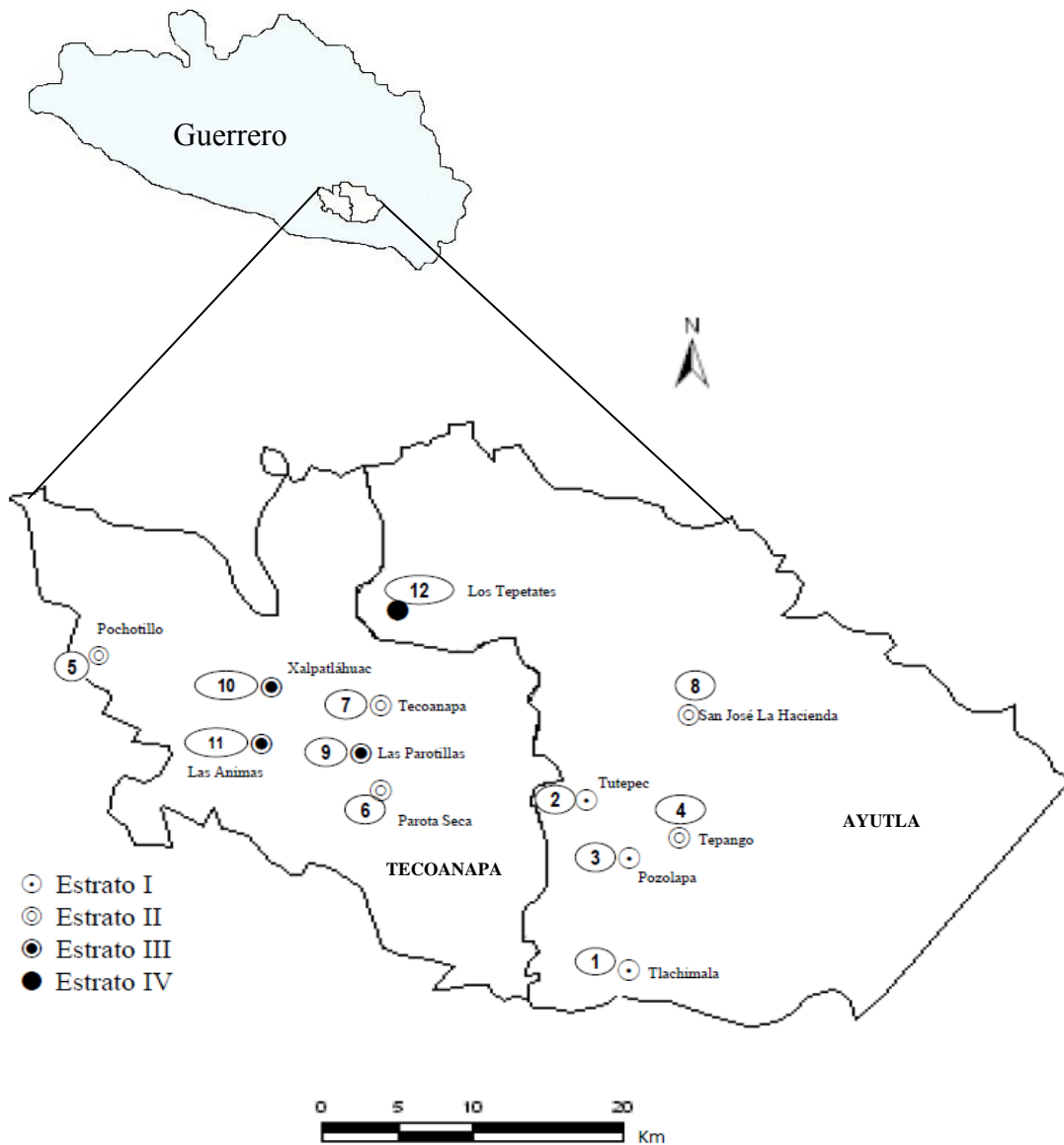
## 1.1.MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Zona de estudio y Muestreo.

Los municipios de Ayutla y Tecoaapa ocupan la mayor superficie cultivada a nivel estatal, y con el antecedente de la presencia de la enfermedad, el área de estudio quedó establecida en estos dos municipios (Figura 1). Para la selección de sitios se utilizó un muestreo estratificado, considerando la altitud, la estratificación quedó definido de la siguiente manera: estrato I) 100 a 300 msnm, estrato II) 301 a 500 msnm, estrato III) 501 a 700 msnm y estrato IV) >701 msnm (Cuadro 1). Se seleccionaron 12 localidades productoras, se evaluó una parcela comercial en cada una de ellas. La altitud y posición geográfica (latitud y longitud) de cada sitio se determinó mediante un geoposicionador global (GPS, Garmin Etrex<sup>®</sup>). (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Altitud y posición geográfica de los sitios de muestreo para el estudio de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica, en Ayutla y Tecoaapa, Gro., México.

Estrato	No	Comunidad	Municipio	Altitud (msnm)	Latitud N	Longitud O
<b>I</b>	1	Tlachimala	Ayutla	103	16° 48' 42.6"	99° 06' 15.6"
<b>I</b>	2	Tutepec	Ayutla	261	16 ° 55' 64. 1"	99° 08' 20.0"
<b>I</b>	3	Pozolapa	Ayutla	279	16° 53' 56.7"	99° 05' 96.3"
<b>II</b>	4	Tepango	Ayutla	365	16° 54' 09.6"	99 ° 04' 56.5"
<b>II</b>	5	Pochotillo	Tecoanapa	388	17° 01' 42.9"	99° 25' 78.9"
<b>II</b>	6	Parota Seca	Tecoanapa	425	16° 56' 19.2"	99° 14' 98.5"
<b>II</b>	7	Tecoanapa	Tecoanapa	427	16° 59' 56.4"	99° 15' 17.4"
<b>II</b>	8	San José la Hacienda	Ayutla	460	16° 59' 00.3"	99° 03' 94.5"
<b>III</b>	9	Las Parotillas	Tecoanapa	637	16° 57' 39.2'	99° 15' 64.2"
<b>III</b>	10	Xalpatláhuac	Tecoanapa	659	17° 00' 14.1"	99° 18' 94.6"
<b>III</b>	11	Las Animas	Tecoanapa	667	16° 57' 98.6"	99° 19' 28.3"
<b>IV</b>	12	Los Tepetates	Ayutla	722	17° 03' 32.8"	99° 14' 69.1"



**Figura 1.** Sitios de muestreo de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en dos municipios del estado de Gro. México. PV-2011.

### 1.3. Distribución de organismos asociados a la “pata prieta”.

Durante el ciclo de producción primavera-verano de 2011, se realizaron cuatro muestreos, estos comprendieron los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre, se colectaron cinco plantas con síntomas por sitio en cada una de las etapas, estas fueron etiquetadas para su



identificación y trasladadas al laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados para ser procesadas. A partir de datos de los organismos aislados por sitio de muestreo, se generó un mapa de distribución de organismos.

### **1.3.1. Frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta”.**

Las plantas colectadas durante las cuatro etapas de muestreo, se lavaron con agua de llave para eliminar el exceso de suelo, posteriormente se hicieron cortes de tallo de la zona de avance de la enfermedad, se obtuvieron cuatro fragmentos de aproximadamente 0.5 cm por planta, los cuales se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel estéril y se procedió a sembrarlos en cajas Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA). Se incubaron a  $24 \pm 2$  °C durante una semana.

Los crecimientos miceliales se transfirieron y purificaron utilizando la técnica de cultivos monospóricos y punta de hifa en medio agua-agar al 2 %. En la identificación preliminar, las colonias con características culturales a *Phytophthora* se transfirieron en medio de cultivo V8-agar por catorce días, y para esporulación se retransfirieron discos de un centímetro de diámetro en cajas Petri con 25 mL de agua destilada estéril y los aislamientos restantes se transfirieron en medio de cultivo PDA. Para todos los casos, los organismos se incubaron nuevamente a  $24 \pm 2$  °C.

La identificación morfológica se efectuó utilizando las claves taxonómicas de Waterhouse (1956), Holliday y Punithalingam (1970), Booth (1971), Sutton (1980), Sutton (1992), Barnett y Hunter (2006), Erwin y Ribeiro (1996), Leslie y Summerell (2006) y Gallegly y Hong (2008).

### **1.3.2. Algunos factores relacionados a la enfermedad.**

En cada sitio muestreado, se determinaron las características físicas y químicas de suelo de cada plantación comercial seleccionada, estas fueron determinadas en el laboratorio de Física de Suelos del Colegio de Postgraduados. La textura del suelo se determinó por el método del hidrómetro de Bouyoucos, el pH (relación 1:2 en H<sub>2</sub>O) y la materia orgánica mediante el método de Walkey y Black. Se estimó la humedad relativa y temperatura, estas fueron registradas en una unidad de almacenamiento de datos (datalogger) Extech TH10 Temperature Data Logger USB®.

#### 1.4.2. Caracterización molecular de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica.

La extracción de ADN se realizó a partir del micelio de las colonias de los diferentes aislados de una semana de desarrollo en medio PDA. La extracción de ADN se realizó con el método de cetab (Murray y Thompson 1980) con algunas modificaciones. El micelio se maceró con 1 mL de buffer STE1x (Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 50 mM pH8, NaCl 100mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3%). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 8 minutos (min). El sobrenadante se decantó y se adicionó 800  $\mu$ L de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 3%, PVP40 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3%). Se incubó durante 40 min a 65°C, posteriormente, se adicionó 700  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó por 8 min a 14 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 800  $\mu$ L de etanol absoluto. El ADN se precipitó por una hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó por 8 min a 13 rpm, el sobrenadante se decantó y el precipitado se secó a 37°C por 20 min para resuspender el ADN obtenido en 100  $\mu$ L de agua ultrapura estéril.

La región genómica más frecuentemente utilizada para detectar ADN fúngico e identificar especies, es la que incluye el complejo ribosomal (genes 18S, 5.8S y 28S). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos y también, dominios variables y regiones espaciadoras internas (ITS), altamente variable. Esta región incluye los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 y el gen de la subunidad 5.8S. Por otro lado, el gen de la subunidad 28S ha sido utilizado para estudios filogenéticos de las especies de *Fusarium* (O'Donnell y Cigelnik, 1997).

Para amplificar la región espaciadora interna (ITS) (ITS1-ITS2), se utilizaron los iniciadores ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), para los aislamientos de *Phytophthora* parasítica, *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis* sp., *Glomerella* sp. y *Colletotrichum* sp. Para las especies de *Fusarium* se utilizaron los iniciadores ITS5 y NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) para amplificar los dominios D1/D2 (O'Donnell, 1993) se utilizaron para amplificar la secuencia parcial del gen 28S. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 $\mu$ L, que contenían 2.5 de buffer 10X, 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.5  $\mu$ L de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L de cada iniciador 10 pmol/ $\mu$ L y 0.2  $\mu$ L de Taq-ADN polimerasa 5U/  $\mu$ L (Invitrogen®, USA). Las reacciones se realizaron en el termociclador Biometra con el

siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos (seg), alineamiento a 55°C por 45 seg, y extensión a 72°C por 45 seg; una extensión final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez constatada la presencia de una sola banda, el ADN amplificado se secuenció con la compañía Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

Las secuencias obtenidas se compararon y alinearon con las disponibles en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), EE.UU. utilizando BLASTN 2.2.26 (Zhang *et al.*, 2000).

### **1.4.3. Pruebas de patogenicidad.**

La primera etapa se realizó en el mes de octubre de 2011, en plantas de jamaica de tres meses de edad. El material vegetativo de jamaica utilizado fue el cultivar “criollo” de Guerrero, se reprodujo por semilla, estas se desinfestaron superficialmente antes de la siembra, se sembraron en macetas que contenían suelo estéril y se pusieron para su germinación y crecimiento en cámara de ambiente controlado con temperatura de 28 °C durante el día y 18 °C en la noche, con periodos de luz/oscuridad de 12 horas.

El inóculo de *Phytophthora parasitica* se incrementó en medio V8-agar durante catorce días, con el propósito de inducir la formación de esporangios. Posteriormente discos de 1 cm de diámetro fueron transferidos a cajas Petri con 25 mL de agua destilada estéril sometidos a 5 °C por 5 minutos, y luego a temperatura ambiente (24-27 °C) por 10-15 minutos para estimular la liberación de zoosporas. Medio PDA fue utilizado para incrementar el inóculo de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, durante catorce días, y de 30 días para *Phomopsis longicolla* y *Glomerella cingulata*.

Las densidades de inóculo se estimaron utilizando una cámara de Neubauer. Para el caso de *P. parasitica* fue de  $2 \times 10^3$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ , se aplicó 10 mL ( $2 \times 10^4$  zoosporas) por planta. Suspensiones conidiales de *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *P. longicolla*, y *C. truncatum*, se inocularon en densidades de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , aplicando 10 mL ( $1 \times 10^7$  conidios) por planta. La inoculación de *Macrophomina phaseolina* se realizó con suspensiones de microesclerocios, agregando 10 mL de la suspensión por cada planta. Finalmente en *Glomerella cingulata* se depositaron discos de PDA (1 cm diámetro), en la base del tallo de cada planta. Se

inocularon cinco plantas por cada especie de organismo (tratamiento), mas un tratamiento testigo sin la aplicación de inóculo. Las pruebas de patogenicidad se realizaron con base en los postulados de Koch.

Una segunda prueba se realizó en el municipio de Iguala, Gro., en el mes de febrero de 2012, en las instalaciones del INIFAP-Campo Experimental Iguala, se usaron plantas de tres meses de edad de la variedad “criolla” de Guerrero. El material vegetativo se reprodujo por semilla, estas fueron desinfestadas superficialmente antes de la siembra, y fueron sembradas en macetas usando como sustrato suelo esterilizado. El método de inoculación para este caso fue mediante micelio de cada especie de microorganismo, mediante el uso de la técnica del palillo. Cinco plantas se inocularon por cada especie de microorganismo (tratamiento), y se agregó un tratamiento testigo sin inocular (solo se lesionó la base del tallo con palillo esterilizado). Las plantas en estudio quedaron a cielo abierto después de ser inoculadas.

#### **1.4.2. Incidencia de la enfermedad.**

En cada sitio de muestreo, se estimó la intensidad de la enfermedad, mediante la incidencia (I) (Campbell y Madden, 1990), para determinar posibles relaciones con los organismos aislados, en cada sitio se delimitó una superficie de 100 m<sup>2</sup>, esta fue registrada en cada fecha de muestreo, se usó la siguiente fórmula (Campbell y Madden, 1990):

$$I = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número total de plantas observadas}} \times 100$$

Con el propósito de representar la intensidad de la enfermedad “pata prieta” en la zona bajo estudio, se generó un sistema de información geográfica (SIG). Se realizó un análisis de interpolación geoestadístico mediante el método de distancia inversa ponderada, generando con esto un mapa de intensidad de la enfermedad, se utilizó el software ArcGis versión 9.3<sup>®</sup>, siguiendo el procedimiento descrito por Mora (2011).

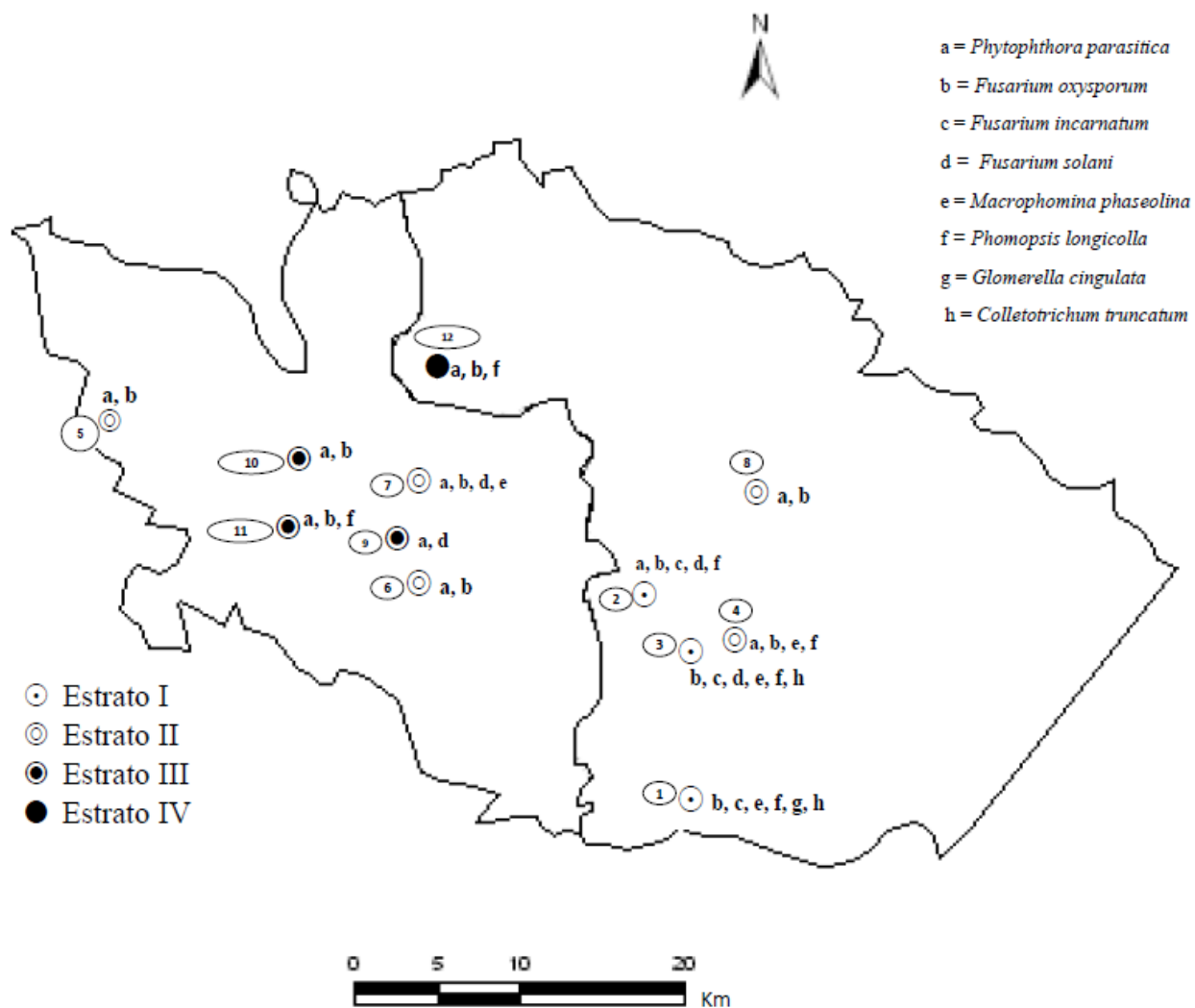
## 1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.5.1. Distribución de organismos asociados a la “pata prieta.

La enfermedad “pata prieta” de la jamaica estuvo presente en las 12 localidades muestreadas. A partir de plantas sintomáticas se aislaron e identificaron cinco géneros de hongos y un oomiceto. El organismo *Phytophthora parasitica* (oomiceto), se presentó en 10 de 12 localidades, *Fusarium oxysporum* se encontró en 11 sitios, *Phomopsis longicolla* estuvo presente en siete sitios de muestreo, *Macrophomina phaseolina* se detectó en cuatro sitios al igual que *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum* se presentó en tres sitios, *Colletotrichum truncatum* se encontró en Tlachimala y Pozolapa, y finalmente *Glomerella cingulata* fue detectado únicamente en Tlachimala (Figura 2, Cuadro 2).

En estudios realizados en esta zona se ha reportado a *Phytophthora parasitica* (Hernández y Romero, 1990), además también fue señalada la presencia de *Fusarium oxysporum* (González-Santín, 2008; Ramos-Grajales, 2011) éste último como causante de síntomas similares de “pata prieta”. González-Santín (2008), también aisló a *Phomopsis* sp. de plantas con síntomas de la enfermedad.

Este es el primer reporte de *M. phaseolina*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *C. truncatum* y *G. cingulata*, como organismos asociados a la enfermedad “pata prieta”, en esta región del estado de Guerrero. En donde se comprobó en base a pruebas de patogenicidad, que no todos fueron patogénicos, como se mencionará posteriormente.



**Figura 2.** Mapa de distribución de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica en el ciclo de producción PV-2011, en Ayutla y Tecoaapa, Gro.

### 1.5.2. Frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta”.

El organismo con la mayor frecuencia fue el oomiceto *Phytophthora parasitica* con 72.4%, seguido de los hongos *Macrophomina phaseolina* (10.9%), *Fusarium oxysporum* (10.6%), *Fusarium incarnatum* (2.4%) y en menor frecuencia *Phomopsis longicolla* (1.7%), *Fusarium solani* con (1.1%), *Colletotrichum truncatum* (0.5%) y *Glomerella cingulata* con la mas baja frecuencia de aislamiento (0.4%) (Cuadro 2).

Si no se consideraran las localidades de Tlachimala y Pozolapa en donde no se aisló a *P. parasitica*, la frecuencia de éste aumenta a un promedio de 86.9%.

**Cuadro 2.** Frecuencia de hongos y pseudohongos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta” en 12 localidades de los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México. PV-2011.

Estrato	No	Localidad	Frecuencia de aislamiento (%)							
			Pp <sup>b¶</sup>	Fox	Fso	Fin <sup>¶</sup>	Map <sup>¶</sup>	Pho	Col	Glo
I	1	Tlachimala	0	10	0	11.7	66.7	3.3	3.3	5
	2	Tutepec	89.3	3.6	1.8	1.8	0	3.6	0	0
	3	Pozolapa	0	18.8	3.8	15	56.3	3.8	2.5	0
II	4	Tepango	87.5	6.3	0	0	4.2	2.1	0	0
	5	Pochotillo	87.5	12.5	0	0	0	0	0	0
	6	Parota seca	85	15	0	0	0	0	0	0
	7	Tecoaapa	90	5	1.3	0	3.8	0	0	
	8	San José Hacienda	90.6	9.4	0	0	0	0	0	0
III	9	Las Parotillas	92.2	0	5.9	0	0	2	0	0
	10	Xalpatlahuac	85	15	0	0	0	0	0	0
	11	Las Animas	76.8	19.6	0	0	0	3.6	0	0
IV	12	Los Tepetates	85	12.5	0	0	0	2.5	0	0
		Medias <sup>©</sup> (%)	72.4*	10.6	1.1	2.4	10.9	1.7	0.5	0.4

<sup>b</sup>Pp= *Phytophthora parasitica*, Fox= *Fusarium oxysporum*, Fso= *Fusarium solani*, Fin= *Fusarium incarnatum*, Map= *Macrophomina phaseolina*, Pho= *Phomopsis longicolla*, Col= *Colletotrichum truncatum*, Glo= *Glomerella cingulata*.

<sup>¶</sup>Pp, Fin, Map = Probada la patogenicidad.

Medias con asterisco (\*), son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Como se observa en el cuadro 2, la frecuencia de *Phytophthora parasitica* fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ), los otros organismos no mostraron diferencias significativas entre grupos (Cuadro 2) (Anexo 3), sin embargo numéricamente le sigue *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*.

En el sitio evaluado en Las Parotillas se registró la mayor frecuencia de aislamiento para *P. parasitica* (92.2 %) y la menor en Las Animas (76.8). La frecuencia más alta con *Fusarium*

*oxysporum* se obtuvo en Las Animas (19.6%), y el menor registro en Tutepec (3.6%). En el caso de *Macrophomina phaseolina* se registró un máximo de 66.7% de aislamiento en Tlachimala, y la menor frecuencia fue en Tecoaapa (3.8%). *Fusarium incarnatum* se aisló con 15% en Pozolapa y el valor mas bajo se obtuvo en Tutepec con solo 1.8%. La frecuencia de *Fusarium solani* fue de 5.9 en las Parotillas y el menor registro se obtuvo en Tecoaapa con 1.3%. *Phomopsis longicolla* tuvo un registro máximo de 3.8% en Pozolapa, el más bajo fue en Las Parotillas (2%). *Colletotrichum truncatum* solo fue aislado de dos localidades con frecuencias de 3.3% y 2.5% en Tlachimala y Pozolapa respectivamente. En la localidad de Tlachimala se aisló a *Glomerella cingulata* con 5% de frecuencia (Cuadro 2).

Las plantas enfermas en donde se encontró con mayor frecuencia al oomiceto *Phytophthora parasitica* mostraron una marchitez generalizada, amarillamiento, flacidez de hojas, necrosis en la parte basal del tallo, la cual en ocasiones se extendió hacia la parte aérea de la planta, abarcando parte de las ramas (Figura 3). También en menor grado fueron observados síntomas de necrosis más agrietamiento justo en la base del tallo con presencia de exudados, lo cual en ocasiones provocó el acamé de la planta, y muerte de la planta, éstos síntomas corresponden a los ya reportado por (Hernández y Romero, 1990, Erwin y Ribeiro, 1996).

Sin embargo, en plantas enfermas provenientes de los sitios de Tlachimala y Pozolapa en donde *P. parasitica* no fue aislado en ninguna etapa del muestreo, se detectaron síntomas similares, aunque en estos lugares la necrosis se limita a la base del tallo de la planta, frecuentemente se encontraron plantas con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance de la enfermedad (Figura 3d), las plantas presentaron marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas (Figura 3c), y muerte de la planta, en estos sitios *Macrophomina phaseolina* fue aislado en alta frecuencia (Cuadro 2). Localmente ambas sintomatologías son conocidas como “pata prieta” de la jamaica.





**Figura 3.** Síntomas de “pata prieta” causada por diferentes organismos .a) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. b) necrosis de tallo extendiéndose hacia la parte aérea, abarcando parte de las ramas. c) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. d) pudrición en raíces y base del tallo con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance.

Existen reportes de la capacidad patogénica de *M. phaseolina* en el cultivo de jamaica, como causante de pudrición basal, y pudrición de tallo y raíz (Augstburger *et al.*, 2000; Eslaminejad y Zakaria, 2011), además éste patógeno se caracteriza por tener un amplio rango de

hospedantes y es responsable de causar pérdidas en más de 500 especies de plantas cultivadas y silvestres (Indera *et al.*, 1986).

### **1.6. Algunos factores relacionados con la enfermedad.**

Temperaturas máximas de 37.1°C y media de 24.3°C fueron registradas en el estrato mas bajo (100 a 200 msnm), en contraste con las obtenidas en los estratos de mayor altitud en los que se registraron temperaturas de 31 y 23 °C máxima y media respectivamente. Las mayores temperaturas registradas fueron en los estratos más bajos, estas zonas mostraron en general una menor intensidad de la enfermedad (Cuadro 6; Anexo 5).

De acuerdo a los resultados obtenidos *Phytophthora parasitica* fue aislado de plantas enfermas en 10 localidades caracterizadas por presentar, suelos con pH de 4.7 a 5.5, además fue el de mayor prevalencia, mientras que en dos localidades no fue aislada en ninguna de las etapas del muestreo (Cuadro 2).

Las dos localidades en donde *P. parasitica* estuvo ausente fueron Tlachimala y Pozolapa (Cuadro 2), pertenecientes al municipio de Ayutla. El análisis de suelo realizado en estos dos sitios indicó que presentaron un pH de 6.6 y 6.8 en Pozolapa y Tlachimala, respectivamente y de textura Franco arenoso (Cuadro 3). Estas localidades se ubican en el estrato más bajo (100-300 msnm).

Lo anterior indica que las condiciones de suelo con pH tendiendo a la neutralidad no favorecieron la presencia de *P. parasitica* en los sitios de Tlachimala y Pozolapa, donde se encontraron plantas enfermas con síntomas de “pata prieta”.

**Cuadro 3.** Características edáficas de 12 parcelas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) distribuidas en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.

Estrato	Localidad	pH <sup>¶</sup>	MO <sup>†</sup>	Proporción (%)			Textura
				Arena	Limo	Arcilla	
I	Tlachimala	6.8	1.8	67	18	15	Franco Arenoso
	Tutepec	5	1.9	59	14	27	Franco arcillo arenoso
	Pozolapa	6.6	2.9	69	16	15	Franco Arenoso
II	Tepango	5.5	2.9	63	16	21	Franco arcillo arenoso
	Pochotillo	5.2	1.3	51	32	17	Franco
	Parota Seca	5	2.5	67	14	19	Franco Arenoso
	Tecoanapa	4.8	2.6	51	24	25	Franco arcillo arenoso
	San J. Hacienda	5	1.6	65	20	15	Franco Arenoso
III	Las Parotillas	4.9	2.2	59	18	23	Franco arcillo arenoso
	Xalpatlahuac	4.7	1.8	71	4	25	Franco arcillo arenoso
	Las Animas	5.1	1.2	45	32	23	Franco
IV	Los Tepetates	4.9	1.2	39	42	19	Franco

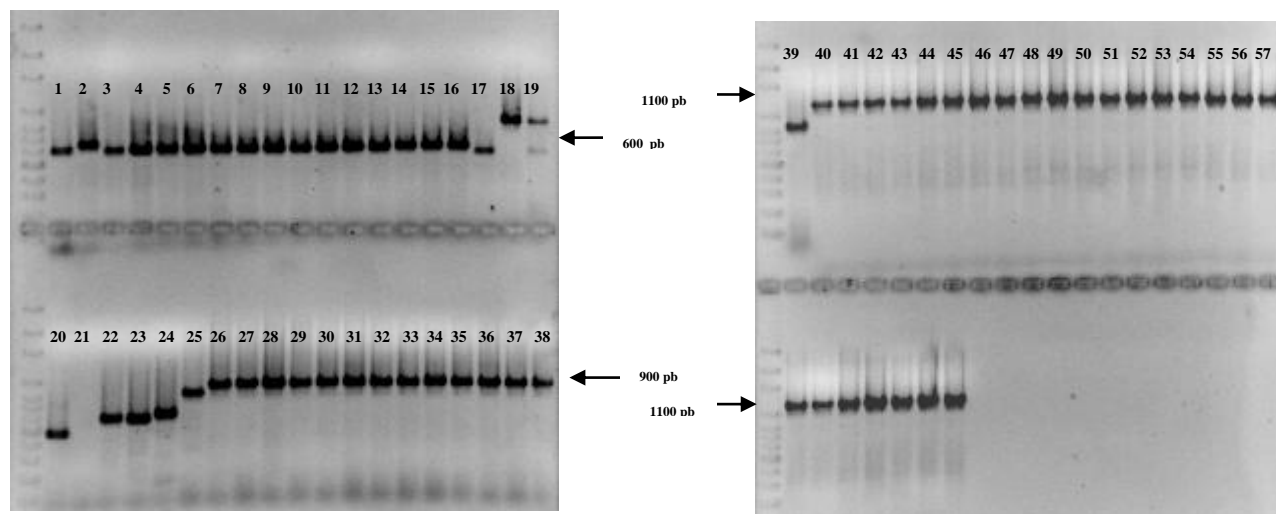
<sup>¶</sup>pH= Potencial de Hidrógeno

<sup>†</sup>MO=Materia orgánica (%)

Se tienen evidencias en otros cultivos de que las propiedades químicas del suelo afectan en gran medida el desarrollo de las enfermedades causadas por *P. parasitica*, así por ejemplo Gallup *et al.*, indican que suelos con pH entre 5.5 y 6.0 no son favorables para la presencia de *P. parasitica* agente causal de la enfermedad del tallo negro en tabaco.

### 1.7.1. Caracterización molecular de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica.

Las amplificaciones realizadas con los iniciadores ITS5/ITS4 amplificaron un fragmento de aproximadamente 900 pb (pares de bases) para los aislados de *Phytophthora parasítica*, y de aproximadamente 600 pb para *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis* sp, *Glomerella* sp., *Colletotricum* sp. Con los iniciadores ITS5/NL4 amplificaron un fragmento de 1100 pb para los aislamientos de *Fusarium* spp (Figura 4).



**Figura 4.** Patrones electroforéticos de los productos de PCR (agarosa 2%). Microorganismo/carril: *Colletotricum* sp./1; *Glomerella* sp./3 y 4; *Macrophomina phaseolina*/5, 6, 7, 8 y 9; *Phomopsis* sp./10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16; *Phytophthora parasitica*/26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38 ; *Fusarium* sp./44, 45, 46 y 47; *Fusarium solani*/48, 49, 50, 51, 52, 53 y 54; *Fusarium oxysporum*/55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 y 64.

**Cuadro 4.** Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes ADNr de los organismos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta”.

Organismo aislado	Especie alineada	BLAST (%) de similitud
<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>	99 a 100
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	98 a 99
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium incarnatum</i>	99
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	97 a 99
<i>Phomopsis</i> sp	<i>Phomopsis longicolla</i>	97 a 99
<i>Colletotricum</i> sp.	<i>Colletotrichum truncatum</i>	99
<i>Glomerella</i> sp.	<i>Glomerella cingulata</i>	99

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas con las depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), los resultados indicaron un alto grado de similitud los cuales variaron de 97 a 100% (Cuadro 4).

En la base de datos del NCBI, se encontró registrado a *Phytophthora parasitica* como hospedante en el cultivo de jamaica en Taiwan con número de acceso GU111666 y a los reportados en México con número de acceso AY773099, AY769953 y AY773100, no se encontraron registros para los otros organismos en estudio como hospedantes en este cultivo.

### **1.7.2. Pruebas de patogenicidad.**

Los ensayos realizados en cámara de ambiente controlado y a cielo abierto, indicaron que *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina* resultaron ser patogénicos. *Fusarium incarnatum* causó síntomas de la enfermedad únicamente en condiciones de cielo abierto.

*P. parasitica* causó la muerte del 100% de las plantas tratadas en los dos ensayos realizados, las plantas inoculadas en cámara de ambiente controlado mostraron síntomas típicos de la enfermedad a los 10 días después de inoculadas (ddi) (Figura 5b, Cuadro 5), en inoculaciones a cielo abierto los síntomas de la enfermedad fueron observados a los 7 ddi.

En cámara de ambiente controlado *M. phaseolina* provocó síntomas en 20% de las plantas tratadas, reprodujo los síntomas de la enfermedad a los 28 días (Figura 5d, Cuadro 5), posteriormente en la etapa avanzada de la enfermedad (34 ddi) se observó la formación de microesclerocios en la base del tallo (Figura 5e), en inoculaciones a campo abierto los síntomas fueron observados después de 13 ddi, con incidencia de 40% (Cuadro 5).

En inoculaciones a cielo abierto *Fusarium incarnatum* ocasionó síntomas típicos de la enfermedad a los 15 ddi, marchitez (Figura 5g) y necrosis basal (Figura 5 h), 40% de incidencia fue registrada en pruebas de patogenicidad con este organismo (Cuadro 5).



**Figura. 5.** Hongos y oomiceto patógenos de la jamaica. 1). Cámara de ambiente controlado a) testigo sin inocular b) síntomas causado por *Phytophthora parasitica* (10 ddi). c) necrosis basal. d) síntomas causados por *Macrophomina phaseolina* (28 ddi) y e) desarrollo de microesclerocios en la base del tallo (34 ddi). 2). En cielo abierto. *Fusarium incarnatum*. g) síntomas causados a los 15 ddi. h) necrosis en la base del tallo. f) testigo sin inocular.

En los reaislamientos de *Phytophthora parasitica* y *Macrophomina phaseolina* que indujeron síntomas, tanto en cámara de ambiente controlado y a cielo abierto, y *Fusarium incarnatum* que reprodujo síntomas en inoculaciones a cielo abierto, se obtuvieron las mismas especies inoculadas, en todas las plantas que fueron infectadas.

Resultados similares han sido reportados en evaluaciones bajo condiciones controladas en inoculaciones con *Phytophthora parasitica* (Hernández y Romero, 1990; González-Santin, 2008; Ramos-Grajales, 2011).

En un estudio similar en plantas de jamaica con pudrición de tallo y raíz en Nigeria, se aisló a *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, en pruebas de patogenicidad *P. parasitica* resultó ser el principal agente causal de la enfermedad, *R. solani* solo causó muerte de plántulas, *F. solani* no fue patogénico (Adeniji, 1970).

En México no existen reportes sobre la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* en el cultivo de jamaica. Sin embargo Wellman en 1977, reportó que *M. phaseolina* es causante de la pudrición del tallo en plantas de jamaica, en Cuba y El Salvador. En la India se reporta a *M. phaseolina* como agente causal de “pudrición del cuello” en hibisco de coral (*Hibiscus schizopetalus*) (Santhakumari, 2002). También está reportado en *Hibiscus cannabinus* L. como causante de podredumbre carbonosa, pudrición de tallo y pudrición de plántulas (Cook, 1992).

Para el caso de *Fusarium incarnatum*, el cual solo fue patogénico en condiciones de campo abierto, este organismo es un patógeno común del suelo, se menciona principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Leslie *et al.*, 1990).

**Cuadro 5.** Pruebas de patogenicidad con organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) realizadas en Montecillo, México en 2011, e Iguala, Guerrero en 2012.

Organismo inoculado	Plantas con síntomas		Días a inicio de síntomas	
	1 <sup>o</sup>	2	1	2
<i>Phytophthora parasitica</i>	5/5 <sup>¶</sup>	5/5	10	7
<i>Fusarium oxysporum</i>	0/5	0/5	-	-
<i>Fusarium solani</i>	0/5	0/5	-	-
<i>Fusarium incarnatum</i>	0/5	2/5	-	15
<i>Macrophomina phaseolina</i>	1/5	2/5	28	13
<i>Glomerella cingulata</i>	0/5	0/5	-	-
<i>Phomopsis longicolla</i>	0/5	0/5	-	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0/5	0/5	-	-
Testigo	0/5	0/5	-	-

<sup>o</sup>1=Ensayo 1. Realizado en cámara de ambiente controlado. 2= Ensayo 2. Realizado bajo condiciones de campo.

<sup>¶</sup>Proporción de plantas que mostraron síntomas en cada ensayo.

Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad para *Phytophthora parasitica* coinciden con los ya reportados para la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en la principal zona productora del estado de Guerrero (Hernández y Romero, 1990).

Por otra parte en los dos sitios donde no se aisló a *P. parasitica*, se considera que *M. phaseolina* es el que causa los síntomas de pata prieta en campo, debido a su asociación constante, alta frecuencia de asilamiento 66.7 y 56.3 % en Tlachimala y Pozolapan respectivamente, y además porque se demostró su capacidad patogénica (Figura 5d y e, Cuadro 5).



En Venezuela en el cultivo de ajonjolí (*Sesamun indicum* L.) señalan a *Phytophthora parasitica* y *Macrophomina phaseolina* como causantes de enfermedades de tallo y raíz (Mazzani *et al.*, 1973; Mazzani *et al.*, 1975), estos autores mencionan a *P. parasitica* como el causante principal de la pérdida de rendimiento en este cultivo. En China se menciona a *M. phaseolina* y *F. oxysporum* en el cultivo de ajonjolí, ocasionando la pudrición carbonosa y marchitez de plantas (Zhang *et al.*, 2001).

Para el caso de *Fusarium incarnatum* debido a que fue aislado en baja frecuencia (2.4%) (Cuadro 2), se considera en este estudio, como patógeno secundario en la sintomatología “pata prieta” de la jamaica. No se encontraron registros de este organismo sobre la patogenicidad en plantas de jamaica. En otros países existen reportes de este hongo como hospedante del género *Hibiscus*. Farr y Rossman (2012), mencionan a *F. incarnatum* en el cultivo de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en Iran y Kenia, y sobre tulipán (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) en la Isla de Barbados.

*Fusarium oxysporum*, fue reportado en esta zona como agente causal de la enfermedad “pata prieta” (Gonzalez-Santin, 2008; Ramos-Grajales, 2011). Existen reportes de su capacidad patogénica en el cultivo de jamaica en otros países (Amusa *et al.*, 2005; Ooi y Salleh, 1999).

En éste estudio los organismo, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum* no manifestaron síntomas en ningún ensayo. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que bajo condiciones favorables, *F. oxysporum* pueda ser patogénico en éste cultivo, para ésta región.

Los hongos *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum*, son reportados como patógenos en diversos cultivos, así por ejemplo *F. solani* causa enfermedades de la raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), soya (*Glycine max* L.), garbanzo (*Cicer* spp.), pudrición de tallo en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) (Agrios, 2005; Guzmán-Plazola, 2004; Horts, 2008), en un estudio realizado en Nigeria se aisló en plantas de jamaica con pudrición de raíz y tallo, sin embargo no lo reportan como patogénico (Adeniji, 1970).

El hongo *P. longicolla* se relaciona con enfermedades de plantas herbáceas, aunque puede atacar arbustos y algunos árboles frutales (Agrios, 2005) en cacahuate (*Arachis hypogaea* L.)

causa tizón del tallo (Sanogo y Etarock 2009) y también ataca a la soya, provoca canchros en tallo, también infecta vainas y semillas (Zhang, 1997; Lu *et al.*, 2010; Li, 2010).

Finalmente *G. cingulata* y *C. truncatum* son agentes patogénicos que generalmente causan canchros, manchas foliares y antracnosis, atacan tallos, hojas y frutos en especies herbáceas tales como chícharo (*Pisum sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris* Medik.), y algunas especies frutales como el mango (*Mangifera indica* L.), guayaba (*Psidium* sp.) y otros cultivos (Horts, 2008; Kaiser *et al.*, 1998). El hongo *Glomerella cingulata* ha sido reportado en Kenia como hospedante en *Hibiscus cannabinus* (Nattrass, 1961).

Sin embargo *F. solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum* en este estudio no se consideran de riesgo para la jamaica en esta zona, debido a que fueron aislados en bajas frecuencias (Cuadro 2), además como ya se mencionó anteriormente en las pruebas de patogenicidad, no causaron síntomas, por lo que en este estudio se consideran como patógenos oportunistas. En todos los casos las plantas testigo no manifestaron síntomas de la enfermedad.

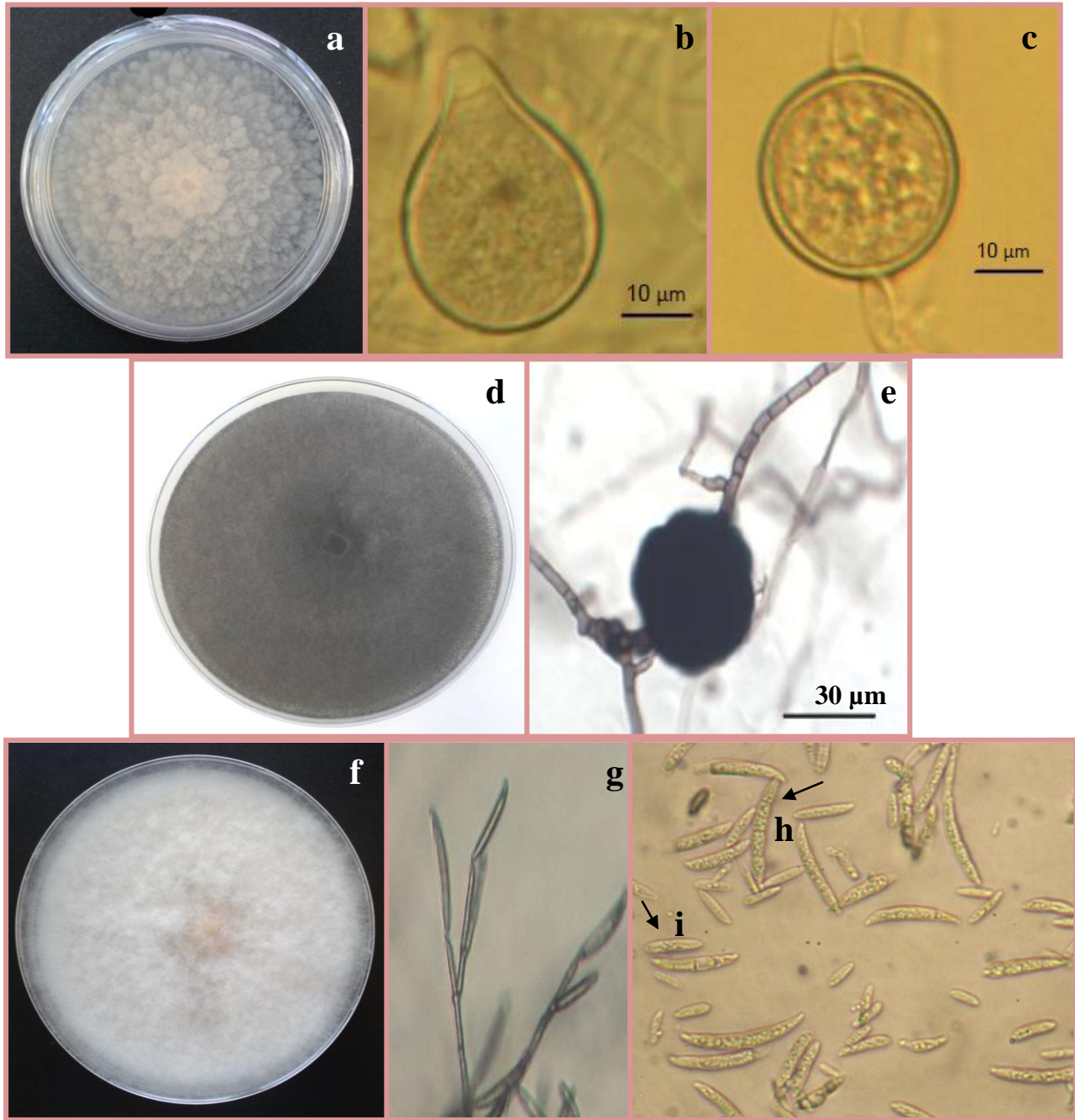
#### **1.7.2.1. Caracterización cultural y morfológica de organismos patógenos de la jamaica, aislados de plantas con síntomas de “pata prieta” en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.**

*Phytophthora pasitica* Dastur (1913) (= *P. nicotianae* Breda de Haan (1896)). En medio V8-agar, desarrolló colonias esponjosas, de crecimiento algodonoso, en forma de roseta (Figura 6a). Micelio, cenocítico aunque en ocasiones con la edad presentaron pseudoseptos, en su mayoría de crecimiento aracnoide, esporangio predominantemente de forma oval y con presencia de papila muy pronunciada (Figura 6b), en promedio midieron 44 a 35  $\mu\text{m}$  (largo por ancho), clamidosporas intercalares (Figura 6c) y terminales (28  $\mu\text{m}$  en promedio), estas características coinciden con las reportadas para la especie *P. parasitica* por (Waterhouse 1956, Erwin y Ribeiro 1996, Gallegly y Hong, 2008).

*Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. (1974). Colonias desarrolladas en medio PDA presentaron coloración gris cuando jóvenes, oscureciéndose con la edad (Figura 6d), desarrollaron abundantes microesclerocios muy variables en tamaño (33 a 54  $\mu\text{m}$ ), de redondos a

irregular, de coloración negra, estos son articulados y duros (Figura 6e) los cuáles se forman a partir de agregados de células hifales y presentó micelio septado. En algunos aislamientos produjo abundante micelio aéreo (Holliday y Punithalingam, 1970; Abawi y Pastor-Corrales, 1990; Kaur *et al.*, 2011); en ningún aislamiento formó la fase picnidial, esto es poco común, aunque pueden ser inducidos usando medios especiales (Kaur *et al.*, 2011). Numerosos sinónimos se han reportado para esta especie, actualmente *M. phaseolina* (Tassi.) Goid., es el nombre oficialmente reconocido como denominación taxonómica correcta (CMI (Commonwealth Mycological Institute) description of pathogenic fungi and bacteria no. 275) (Holliday y Punithalingam, 1970). *M. phaseolina* es un género monotípico, compuesto por una sola especie “*phaseolina*” (Sutton, 1980).

*Fusarium incarnatum* (Robergge) Sacc .(1886) (= *F. semitectum* Berk. y Ravenel (1875)). En medio PDA desarrolló colonias inicialmente blancas, con pigmentos naranjas en el centro de la colonia (Figura 6f), posteriormente se volvieron color marrón. En medio CLA (Carnation Leaf Agar) produjo macroconidios con presencia de septos que variaron de 3 a 5 (28-35  $\mu\text{m}$ ) y con célula basal en forma de pie (Figura 6h), microconidios (mesoconidios) presentes de 0 a 3 septo (Figura 6i) estas características coinciden con las reportadas para esta especie por Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006).



**Figura 6.** *Phytophthora parasitica*. a) colonia desarrollada en V8- agar con ocho días de crecimiento a 24 °C±2. b) Esporangio ovalado y papilado. c) Clamidospora intercalar. 45X. *Macrophomina phaseolina* d) colonia desarrollada en PDA a 24 °C ±2. e) microesclerocio 45x. *Fusarium incarnatum*, ocho días en PDA a 24 °C ±2. f) crecimiento de la colonia con pigmentación naranja en el centro. g) en medio CLA mesoconidios *in situ* .h) macroconidio septado. i) mesoconidios (microconidios) 45x.

### 1.7.2.2 Incidencia de la enfermedad.

Las mayores incidencias se registraron en los rangos de altitud de 301 a >701 msnm (estrato II, III y IV), en estos estratos se registraron incidencias que oscilaron entre 8.5 a 27.5. En el estrato más bajo (100 a 300 msnm), la mayor incidencia registrada fue de 10.3, la enfermedad. (Cuadro 6). La enfermedad presentó una tendencia a presentarse con mayor intensidad al Noreste de la zona productora (Anexo 5). En el Cuadro 6, se puede apreciar que los valores máximos de incidencia fueron registrados en los sitios ubicados en las comunidades en donde prevaleció *Phytophthora parasitica*. (Cuadro 2).

**Cuadro 6.** Incidencia promedio de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en 12 sitios ubicados en cuatro estratos de altitud (msnm), en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Gro. Ciclo PV-2011.

Estrato	Comunidad	Altitud (msnm)	Incidencia (%)
I	Tlachimala	103	7.5
I	Tutepec	261	6.4
I	Pozolapa	279	10.3
II	Tepango	365	8.5
II	Pochotillo	388	10.6
II	Parota Seca	425	11.3
II	Tecoanapa	427	27.5
II	San José Hacienda	460	11.3
III	Las Parotillas	637	15.3
III	Xalpatláhuac	659	20.7
III	Las Animas	667	17.2
IV	Los Tepetates	722	17.9

## 1.8. CONCLUSIONES

Los organismos aislados de síntomas de “pata prieta” de la jamaica fueron *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum*.

*Phytophthora parasitica* fue el organismo de mayor frecuencia y distribución, por lo que se considera el principal agente causal de la enfermedad, con evidencias de patogenicidad.

*Macrophomina phaseolina* presentó baja distribución, sin embargo fue aislado en alta frecuencia en dos sitios, por lo que es el causante de la enfermedad en tales lugares. Además se reporta por primera vez como patógeno de la jamaica en México.

*Fusarium incarnatum* fue patogénico, sin embargo se requiere de más estudios, debido a su baja frecuencia y distribución.

*Fusarium oxysporum* se encontró ampliamente distribuido sin embargo presentó baja frecuencia y no fue patogénico.

Los otros organismos se presentaron en baja frecuencia y distribución, por lo que no se consideran de riesgo para el cultivo.

## LITERATURA CITADA

- Abawi, G. S. and Pastor-Corrales, M. A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 114 p.
- Adeniji, M. O. 1970. Root and stem rot of the fiber crop Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in Nigeria. Plant Disease Reporter 54: 23-25.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Amusa, N.A., Adegbite, A. A. and Oladapo, M. O. 2005. Vascular Wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest Region of South-western Nigeria. J. Plant Pathology Journal 4: 122-125.
- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J., and Streit, C. 2000. Organic farming in the tropics and subtropics. Roselle. Exemplary description of 20 crops. Editorial Naturland e. V. 14 p.
- Barnett, L. H. and Hunter, B. B. 2006. Illustrated genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. Am. Phytopathology. Soc. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p.
- Ceja-Torres, L. F., Téliz, O. D., Osada, K. S. y Morales-García, L. J. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. En cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 18 (002): 79-86.
- Cook, G. C. 1992. Evaluation of ten kenaf cultivars for resistance to field infection by *Macrophomina phaseolina*. Industrial Crops and Products 2: 23-25.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Eslaminejad, T. y Zakaria, M. 2011. Morphological characteristics and pathogenicity of fungi associated with Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) diseases in Penang, Malaysia, Microbial Pathogenesis 51:325-337.
- Farr, D. F. y Rossman, A.Y. 2012. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Dirección electrónica: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Consultado el 02 de enero de 2012.

- Gallardo-Reyes, E. D., Ibarra-Moreno, G. M., Sánchez-Mariñez, R. I., Cuamea, C. G., Molina, G. D., Parra-Vargas, N. V., Rosas-Burgos, E. C. y Cortez-Rocha, M. O. 2006. Micobiota de Maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de Fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. Revista Mexicana de Fitopatología 24 (001): 27-34.
- Gallegly, M. E., and Hong, C. 2008. *Phytophthora*: Identifying Species by Morphology and ADN Fingerprints. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 158 p.
- Gallup, C.A., Sullivan M. J., and Shew. H. D. 2006. Black Shank of Tobacco. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0717-01. APS. Disponible en: <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/blackShank/default.htm>.
- Gonzales-Santin, L. L. 2008. Etiología de la enfermedad pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 66 p.
- Guzmán -Plazola, R. A., Gómez, P. R., García, E. R. y Gavi, R. F. 2004. Distribución espacial de la pudrición radical del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burk) Syd. y Hans. en la vega de Metztlán, Hidalgo, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (002): 246-258.
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Revista Chapingo (67-68): 50-54.
- Hernández, M. J., Alanis, M. I. y Valadez, M. E. 2004. Variabilidad genética de *Phytophthora parasitica* D., agente causal de la pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante RAPD y RAMPnr. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Veracruz. Numero de resumen: L-70.
- Holliday, P. and Punithalingam, E. 1970. *Macrophomina phaseolina*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 275. (Kew, Surrey, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux) 2 p.
- Horst, R. K. 2008. Westcott's Plant Disease Handbook. 7th edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg . NewYork, 1317 p.
- Indera, K, Singh, T., Machado, C. C. and Sinclair, J. B. 1986. Histopathology of soybean seed infection by *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology 76: 532-535.
- Kaiser. J. W., Muehlbauer, J. F. and Hannan, M. R. 1998. First Report of Anthracnose of Lentil Incited by *Colletotrichum truncatum* in Bulgaria. Plant Disease 82 (1): 128.3-128.3.



- Kaur, S., Dhillon, G. S., Brar, S. K., Vallad, G. E. and Chauhan, V. B. 2011. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: Biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38 (2): 136-151.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. *The Laboratory Fusarium. Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Leslie, J. F., Pearson, A. C., Nelson, E. P. and Touson, A. T. 1990. *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80: 343-350.
- Li, S., Hartman, G. L. and Boykin, D. L. 2010. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. *Plant Disease* 94 (8):1035-1040.
- Lu, X., Robertson, E. A., Byamukama, Z. E. and Nutter, W. F. 2010. Evaluating the Importance of Stem Canker of Soybean in Iowa. *Plant Disease* 94 (2): 167-173.
- Mazzani, B., Nava, C., Martínez, B. y Layrisse, A. 1973. 'Maporal', una nueva variedad de ajonjolí para los llanos occidentales. *Agronomía Tropical* 23: 495-500.
- Mazzani, B., Nava, C., Martínez, A., Layrisse, A., Rivas, N. y Malaguti, G. 1975. Incorporación de la resistencia a *Phytophthora* y *Macrophomina* a la variedad de ajonjolí 'aceitera'. *Agronomía Tropical* 25: 11-21.
- Murray, H. G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.
- Mora, A. G. 2011. Aplicación de los sistemas de información geográfica (gis) en estudios de regionalización y análisis multivariados: Protocolo ArcGis versión 9.2. Manual de prácticas del curso Epidemiología Agrícola. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo 7 p.
- O'Donnell, K. and Cigelnik E. 1997. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous Cigelnik molecular phylogenetics and evolution 7: 103–116.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In "The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics" (D. R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.), pp. 225–233, CAB International, Wallingford.
- Ooi, K. H. and Salleh, B. 1999. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on roselle in Malaysia. *Biotropia* 12: 31-41.
- Ramos-Grajales, Y. K. 2011. Interacción de *Phytophthora parasítica* Das. y *Fusarium oxysporum* Schlechtend en el cultivo de la Jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. 47 p.

- Sanogo, S., and Etarock, F. B. 2009. First Report of *Phomopsis longicolla* Causing Stem Blight of Valencia Peanut in New Mexico. *Plant Disease* 93 (9): 965.1-965.1.
- Santhakumari, P., Kavitha, K. and Nisha, M. S. 2002. Occurrence of collar rot in coral hibiscus: a new record. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 32 (2): 258.
- Sutton, B. 1980. The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. *Commonw Mycol Inst Assoc Appl Biol. Kew, England* 696 p.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey, J. A., and M. J.
- Waterhouse, G. M. 1956. The genus *Phytophthora*, diagnosis and figures from the original papers. *Misc. Publ. Commonw. Mycology Institute* 12: 44-88.
- Wellman, L. F. 1977. *Dictionary of Tropical American Crops and Their Diseases*. The Scarecrow Press, Inc. Metuchen, N. J. and London. 666 p.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). Academic Press, San Diego, USA. pp: 315-322.
- Zhang, A. W., Hartman, G. L., Riccioni, L., Chen, W. D., Ma, R. Z., and Pedersen, W. L. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease* 81 (10) :1143-1149.
- Zhang, X. R., Cheng, Y.L., Sheng, Y. and Feng, X. 2001. Evaluation of sesame germplasms resistant to *Macrophomna phaseolina* and *Fusarium oxysporum*. *Chinese Journal of Oil Crops Sciences* 23: (4) 23-27.

## CAPITULO II.

### VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora parasitica* Dastur AGENTE CAUSAL DE LA “PATA PRIETA” DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN GUERRERO, MÉXICO

#### RESUMEN

Trece aislamientos de *Phytophthora parasitica* Dastur, obtenidos de plantas enfermas de jamaica con síntomas de “pata prieta” procedentes de los municipios de Ayutla, Tecoaapa y Juan R. Escudero del estado de Guerrero, México, fueron analizados genéticamente con el uso de técnicas moleculares, en base a las secuencias de la regio ITS del ADNr. Las secuencias de nucleótidos obtenidas, fueron comparadas con otras secuencias obtenidas del GenBank (NCBI). Los resultados indicaron pequeñas variaciones a nivel de la región amplificada. Para determinar las relaciones filogenéticas entre los aislamientos, se construyó un árbol filogenético, el análisis se realizó con el método de máxima parsimonia, utilizando 1000 repeticiones bootstrap, el porcentaje de similitud obtenido entre los aislamientos va de 99 a 100%. Los aislamientos analizados formaron cuatro grupos.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, oomiceto, patógeno, variación ITS, filogenia.

## 2.1.INTRODUCCIÓN

En México *Phytophthora parasitica* Dastur (= *P. nicotianane* Breda de Haan), se reporta en la zona jamaíquera del estado de Guerrero como el principal agente causal de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Hernández y Romero; 1990; González-Santin, 2008; Ramos-Grajales, 2011), y es responsable de provocar grandes pérdidas en el rendimiento del cultivo. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida, aunque es más frecuente en regiones tropicales y templadas (Hall, 1993). *P. parasitica* es una especie heterotálica, por lo que necesita de la presencia de dos grupos de compatibilidad (A1 y A2), para llevar a cabo la fase sexual. Ambos tipos de apareamiento producen oogonios y anteridios, que son estructuras especializadas de reproducción, y pueden dar origen a la formación de oosporas (Ko, 1981; Hall, 1993). El estado sexual es una fuente potencial de variabilidad en las especies heterotálicas, tales como *Phytophthora parasitica* (Boccas y Zentmyer, 1976). En *P. parasitica* se tienen evidencias de la ocurrencia del ciclo parasexual (Gu y Ko, 1998).

Webster (1974), menciona que aunque la mayoría de las características morfológicas, son bastante estables, éstas pueden estar fuertemente influenciadas por el medio ambiente, siendo poco confiables en estudios de variabilidad.

En el género *Phytophthora* se han empleado diferentes técnicas moleculares con resultados importantes sobre taxonomía, estudios filogenéticos, evolución poblacional y estudios de variabilidad (Kamoun, 2003; Suvillan, 2004). Además se tienen registros de varios métodos moleculares para estudiar la variación de las especies de *Phytophthora* tales como la ampliación del DNAr de la región ITS, estos por ser segmentos altamente conservados, ya que al detectar pequeños cambios, pueden ser utilizados para clasificar o diferenciar organismos incluso a nivel de especie (Martín *et al.*, 2000 ), estas regiones son las mas comúnmente secuenciadas para *Phytophthora* y se han utilizado ampliamente para estudios filogenéticos (Cooke *et al*, 2000; Kroon *et al*, 2004).

En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la existencia de variación genética a nivel de la región ITS del ADNr, de los aislamientos de *Phytophthora parasitica*, obtenidos de plantas de jamaica, bajo la hipótesis de que existe variabilidad genética entre los aislamientos de *Phytophthora parasitica* a nivel de la región ITS del ADNr.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la caracterización molecular de trece aislamientos provenientes de los municipios de Ayutla, Tecoaapa y Juan R. Escudero del estado de Guerrero (Cuadro 7). Los aislamientos fueron obtenidas a partir de plantas enfermas con síntomas de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica, en el PV- 2011.

**Cuadro 7.** Aislamientos empleados para el estudio de caracterización molecular de *Phytophthora parasitica*, provenientes de plantas de jamaica del estado de Guerrero.

Número progresivo	Municipio	Localidad	Clave de aislamiento
1	Ayutla	Tutepec	PHY1
2	Ayutla	San José La Hacienda	PHY4
3	Ayutla	Tepango	PHY5
4	Ayutla	Pochotillo	PHY6
5	Tecoanapa	Parota Seca	PHY7
6	Tecoanapa	Tecoanapa	PHY8
7	Tecoanapa	Xalpatlahuac	PHY9
8	Tecoanapa	Las Parotillas	PHY10
9	Tecoanapa	Las Animas	PHY11
10	Ayutla	Los Tepetates	PHY12
11	Tecoanapa	Las Palmitas	PHY13
12	Ayutla	Cotzalzin	PHY14
13	Juan R. Escudero	San Juan del Reparo (Sur)	PHY15

### 2.3.Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir del micelio de las colonias de los diferentes aislados de una semana de desarrollo en medio PDA. Se utilizó el método de cetab (Murray y Thompson, 1980) con algunas modificaciones. El micelio de se maceró con 1 mL de buffer

STE1x (Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 50 mM pH8, NaCl 100mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3%). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 8 minutos (min). El sobrenadante se decantó y se adicionó 800  $\mu$ L de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 3%, PVP40 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3%). Se incubó durante 40 min a 65°C, posteriormente, se adicionó 700  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó por 8 min a 14 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 800  $\mu$ L de etanol absoluto (BioUltra E7023 Sigma). El ADN se precipitó por una hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó por 8 min a 13 rpm, el sobrenadante se decantó y el precipitado se secó a 37°C por 20 min para resuspender el ADN obtenido en 100  $\mu$ L de agua ultrapura estéril.

### **2.3.1. Amplificación de genes ribosomales.**

Se utilizaron los iniciadores ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) para amplificar la región ITS 1 que se encuentran entre la región 18S y 5.8S del ADNr, y la región ITS 2 la cual está en la región 5.8S del ADNr, y una porción de la región 28S del ADNr. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenían 2.5 de buffer 10X, 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.5  $\mu$ L de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L de cada iniciador 10 pmol/ $\mu$ L y 0.2  $\mu$ L de Taq-ADN polimerasa 5U/  $\mu$ L (Invitrogen®, USA). Las reacciones se realizaron en el termociclador Biometra con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 45 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos; una extensión final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez constatada la presencia de una sola banda, el DNA amplificado se secuenció con la compañía Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### **2.3.2. Análisis filogenético.**

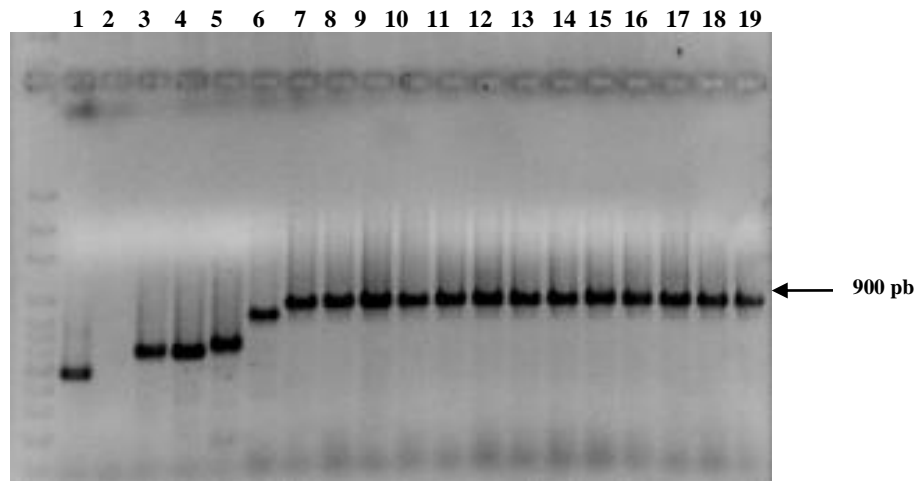
Las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS4-ITS5 (forward-reverse), fueron ensambladas con el software BioEdit versión 7.0.7. (Hall, 1999), para obtener una secuencia consenso de cada aislamiento. La secuencia consenso se comparó con las secuencias depositadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando la herramienta BLAST

(Basic Local Alignment Search Tool) del que permite comparar la secuencia problema con secuencias previamente depositadas en la base de datos y detecta regiones de similitud entre éstas. Las secuencias consenso de los 13 aislamientos de *P. parasitica* se analizaron cada una por separado utilizando la opción BLASTN 2.2.26 (Zhang *et al.*, 2000), para que cada aislamiento correspondiera con la especie de interés. Para determinar las relaciones filogenéticas de los aislamientos de *P. parasitica*, las secuencias consenso obtenidas se compilaron en un archivo (Formato fasta), y fueron alineadas mediante el profile mode de Clustal W, el cual está disponible en el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). El análisis filogenético fue realizado con el método de Máxima Parsimonia, para lo cual se utilizaron las secuencias correspondientes a los genes amplificados mediante la opción Close Neighbor Interchange (CNI) (Level-1). Los valores de confiabilidad para cada agrupamiento dentro del árbol consenso fue determinado mediante un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsesteinin, 1985). Se utilizaron secuencias de referencias para construir el árbol filogenético de *Phytophthora parasitica* (GU111666) y *Phytophthora nicotianae* (JQ070101) y (JF792541), además se incluyó a *Pythium aphanidermatum* (AY598622) como fuera de grupo, todas ellas obtenidas del GenBank.

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1. Amplificación de genes ribosomales.

Las amplificaciones realizadas del ADN ribosomal con los iniciadores ITS5/ITS4 amplificaron un fragmento de aproximadamente 900 pb para los trece aislamientos de *Phytophthora parasítica* (Figura 7).



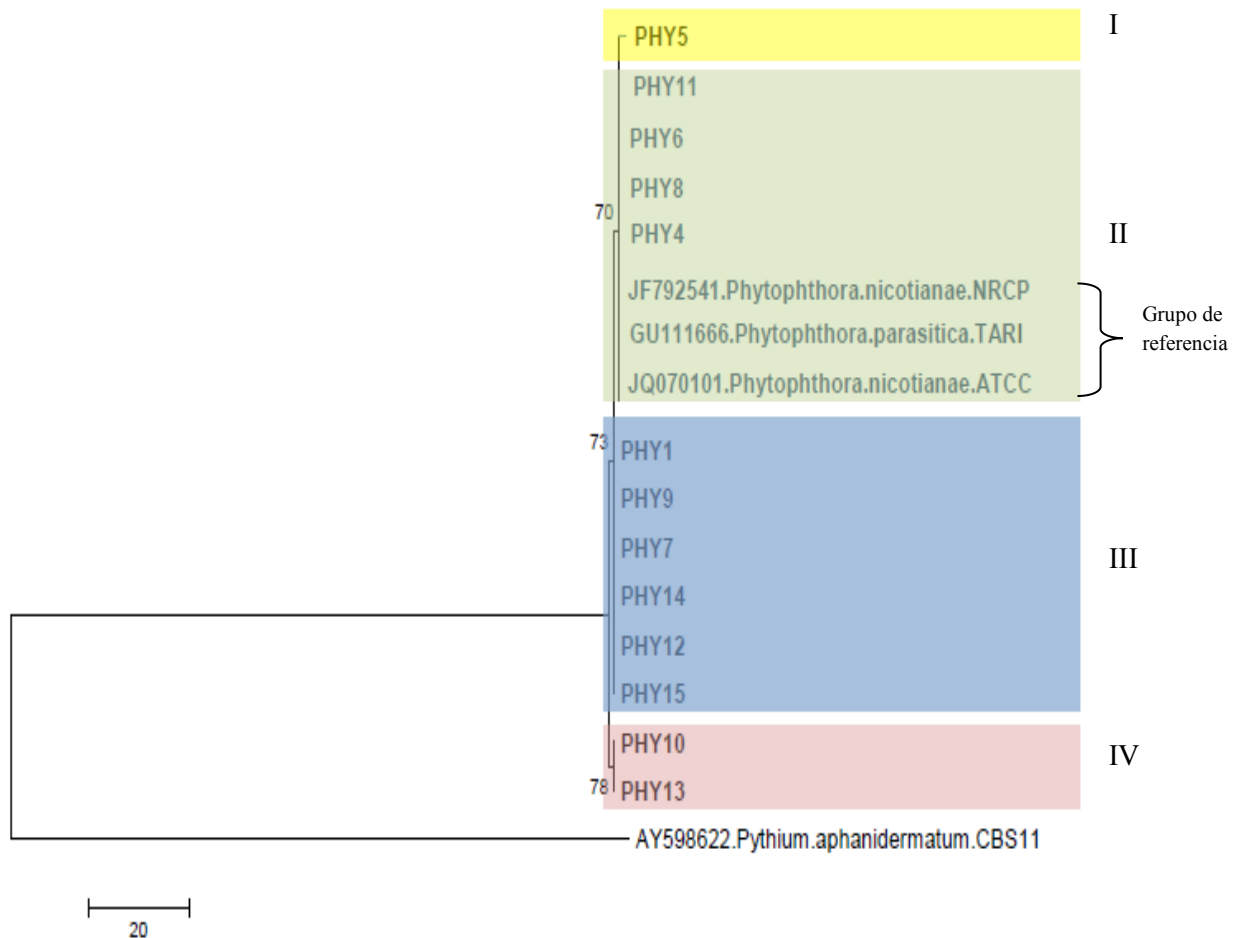
**Figura 7.** Análisis de electroforesis de los productos de PCR para los aislados de *Phytophthora parasítica*. Aislamiento/carril: PHY1, 7; PHY4, 8; PHY5, 9; PHY6, 10; PHY7, 11; PHY8, 12; PHY9, 13; PHY10, 14; PHY11, 15; PHY12, 16; PHY13, 17; PHY14, 18; PHY15, 19.

Al comparar cada una de las secuencias obtenidas de los trece aislamientos con las secuencias de la base de datos del NCBI, el BLAST confirmó la identificación de *P. parasítica* con valores de similitud de 99 a 100%. Las secuencias consenso presentaron pequeñas variaciones en las secuencias de nucleótidos de la región amplificada, lo que permitió conformar cuatro grupos a partir de los 13 aislamientos analizados (Anexo 6, Figura 8).



### 2.4.2. Análisis filogenético.

A partir del análisis de la región ITS del ADNr de los 13 aislamientos de *Phytophthora parasitica*, obtenidos de diversas localidades de la región jamaquera de Guerrero, se construyó el árbol filogenético. El dendograma obtenido a partir de éste análisis (Figura 8), relaciona a los trece aislados en cuatro grupos, los aislamientos presentan un porcentaje de similitud que va de 99 a 100%.



**Figura 8.** Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap. El porcentaje de similitud de los aislamientos va de 99 a 100%. Se utilizaron secuencias de referencias de *Phytophthora parasitica* (GU111666) y *Phytophthora nicotianae* (JQ070101) y (JF792541), y como organismo fuera de grupo a *Pythium aphanidermatum* (AY598622).

El grupo I formado por un solo aislamiento (PHY5), el grupo II PHY11, PHY6, PHY8 y PHY4, en este grupo se alinearon las cepas de referencia obtenidas del GenBank; el grupo III conformado por PHY1, PHY7, PHY9, PHY12, PHY14, y PHY15, finalmente el grupo IV lo integraron los aislamientos PHY10 y PHY13 (Figura 8, Cuadro 8).

En otros hospedantes, por ejemplo en Sao Paulo, Brasil, al estudiar la variabilidad en *P. parasitica* a partir de catorce aislamientos obtenidos de *Citrus* spp. y utilizando las secuencias de nucleótidos de la región ITS (ITS1 e ITS2) del ADNr, encontraron variación de la población evaluada, obteniendo una similitud genética la cual varió de 98.88 a 100 % entre los catorce aislamientos, los aislamientos formaron cinco grupos al ser analizados por el método de Neighbor-Joining y usando 1000 revoluciones bootstrap (Dias *et al.*, 2006).

Mediante el análisis de la región ITS y RFLPs en un estudio de 50 aislamientos de *P. parasitica* provenientes de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Cuba, los resultados evidenciaron una alta variabilidad existente entre los aislamientos, estos aislamiento formaron tres grupos, sin embargo los grupos obtenidos no se correlacionaron con patogenicidad, ni origen geográfico (Peteira *et al.*, 2008).

Hernández, *et al.* (2004), a partir de 16 aislamientos de *Phytophthora parasitica* en jamaica, provenientes de los estados de Guerrero, Colima y Puebla, y usando las técnicas RAPD y RAMPnr permitió diferenciar cuatro grupos a una distancia genética de 0.83.

Zhang *et al.* (2003), al estudiar la variabilidad patogénica y genética de *P. parasitica* en tabaco a partir de aislamientos provenientes de siete regiones tabaqueras de China, con el uso de la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA), un total de 63 aislamientos fueron obtenidos y evaluados en cinco cultivares de tabaco con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad tallo negro, y analizados molecularmente, demostró la existencia de variabilidad patogénica y genética, atribuyéndole a esto uno de los principales problemas para obtener cultivares resistente. La misma técnica se aplicó para diferenciar cepas que causan la enfermedad tallo negro en tabaco causada por *P. parasitica* (Zhang *et al.*, 2001).

Los grupos establecidos en el análisis filogenético no presentaron relación con el sitio de muestreo, ya que se distribuyeron de forma independiente del origen del aislamiento. El grupo III asocia a 6 de los 13 aislamientos procedentes de los tres municipios evaluados (Cuadro 8).

En el Cuadro 8, se muestra que el grupo I, conformado por un solo aislamiento, procedente del municipio de Ayutla representando el 8 % del total de aislamientos, el grupo II estuvo presente en el municipio de Tecoaapa y Ayutla con un 31%, el grupo III abarcó los tres municipios en estudio (Ayutla, Tecoaapa y Juan R. Escudero) con el 46 % de presencia en la población evaluada, finalmente el grupo IV se presentó en el municipio de Tecoaapa con el 15%.

**Cuadro 8.** Agrupamiento de 13 aislamientos de *Phytophthora parasitica* (= *P. nicotianae*) obtenidos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), con síntomas de “pata prieta” provenientes de tres municipios del estado de Guerrero.

Grupo	Clave de aislamiento	Localidad	Municipio
I	PHY5	Tepango	Ayutla
II	PHY4	San José La Hacienda	Ayutla
II	PHY6	Pochotillo	Ayutla
II	PHY8	Tecoanapa	Tecoanapa
II	PHY11	Las Animas	Tecoanapa
III	PHY1	Tutepec	Ayutla
III	PHY-7	Parota Seca	Tecoanapa
III	PHY-9	Xalpatláhuac	Tecoanapa
III	PHY-12	Los Tepetates	Ayutla
III	PHY-14	Cotzalzin	Ayutla
III	PHY-15	San Juan del Reparo (Sur)	Juan R. Escudero
IV	PHY-10	Las Parotillas	Tecoanapa
IV	PHY-13	Las Palmitas	Tecoanapa

Los grupos con mayor presencia en este estudio fueron el II y III. En pruebas de patogenicidad realizadas a nivel de invernadero, los trece aislamientos resultaron ser patogénicos, por lo que en trabajos posteriores resultaría importante, correlacionar los grupos obtenidos con la agresividad en plantas de jamaica, con el propósito de detectar posibles variaciones en grados de infección.

## **2.5. CONCLUSIONES**

El análisis realizado a partir de las secuencias de nucleótidos, evidenció la existencia de variación a nivel de región ITS del ADNr, el análisis filogenético relacionó a los trece aislamientos en cuatro grupos con una similitud entre éstos de 99 a 100%, estos grupos no se relacionan con el origen de procedencia.

## LITERATURA CITADA

- Boccas, B. y Zentmyer, G. A. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 66: 477-484.
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G., Brasier C.M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17-32.
- Dias, R. D., Machado, M. A., Natividade-Targon, M. L. and Furtado, L. E. 2006. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. *Summa Phytopathol* 32 (2): 188-91.
- Felsestein, J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Forster, H., Cummings, M. and Coffey, M. 2000. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. *Mycol Res.* 104:1055-1061.
- Gonzales-Santin, L. L. 2008. Etiología de la enfermedad pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 66 p.
- Gu, Y. H. and Ko, W. H. 1998. Occurrence of a parasexual cycle following the transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Phytophthora parasitica*. *Current Genetic* 34 (2): 120-123.
- Hall, G. 1993. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. *Mycol. Res.* 97:559-574.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* (67-68): 50-54.
- Hernández, M. J., Alanis, M. I. y Valadez, M. E. 2004. Variabilidad genética de *Phytophthora parasitica* D., agente causal de la pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

- mediante RAPD y RAMPnr. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Veracruz. Numero de resumen: L-70.
- Kamoun, S. 2003. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell*. 2(2):191-9.
- Ko, W. H. 1981. Reversible change of mating type of *Phytophthora parasitica*. *J. Gen. Microbiol.* 125: 451-454.
- Kroon L.P.N.M., Bakker F.T., van den Bosch G.B.M., Bonants P.J.M., Flier W.G., 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41: 766-782.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1992. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 2: 636-653.
- Martín, R.R., James D. y Lévesque C.A. 2000 Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Ann. Rev. Phytopathology* 38: 207-239.
- Murray, H. G and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.
- Natrass, R.M. 1961. Host lists of Kenya fungi and bacteria. *Mycological Papers* 81: 1-4
- Peteira, B., Toledo, V., Martínez, B. 2008. Variabilidad molecular en aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Van Breda De Haan. *Revista de Protección Vegetal* 23 (3) 183-190 .
- Ramos-Grajales, Y. K. 2011. Interacción de *Phytophthora parasítica* Das. y *Fusarium oxysporum* Schlechtend en el cultivo de la Jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. 47 p.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, L. C. and Parra, G. 1998. PCR amplification of ribosomal dna for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(3): 948-954.

- Suvillan, M. J. 2004. Characterization and management of the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Thesis Ph. D. Phytopathology Department Plant Pathology, North Carolina State University. 148 p.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Webster, R. K. 1974. Recent Advances in the Genetics of Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 12: 331-353.
- White, T. Bruns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). Academic Press, San Diego, USA. pp: 315-322.
- Zhang, G. X., Sun, W. X., Guo, L., Yu, J. F. and C. J. Chang. 2003. Genetic and Pathogenic Variation Among Tobacco Black Shank Strains of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from the Main Tobacco Growing in China. *Journal of Phytopathology* 151: 259–266.
- Zhang, G. X., Zheng, S. G., Han, Y. H., Han, W., Shi, K. C. and Chang, J. C. 2001. RAPD PCR for Diagnosis of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* Isolates which Cause Black Shank on Tobacco. *Journal of Phytopathology* 149(10): 569–574.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214

# ANEXOS

**Anexo 1.** Frecuencia relativa de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica, por fecha de muestreo.

Código SAS ver. 9.0:

```
DATA PATAPRIETA;
INPUT MUESTREO $ ORGANISMO $ FREC;
DATALINES;
M1Pp0.1160
M2Pp0.1525
M3Pp0.2177
M4Pp0.2308
M1Fox0.0209
M2Fox0.0222
M3Fox0.0287
M4Fox0.0326
M1Map0.0169
M2Map0.0300
M3Map0.0365
M4Map0.0339
M1Fin0.0052
M2Fin0.0065
M3Fin0.0078
M4Fin0.0065
M1Fso0.001303781
M2Fso0.002607562
M3Fso0.003911343
M4Fso0.002607562
M1Pho0.002607562
M2Pho0
M3Pho0.007822686
M4Pho0.005215124
M1Col0.001303781
M2Col0.002607562
M3Col0.001303781
M4Col0
M1Glo0
M2Glo0.001303781
M3Glo0.001303781
M4Glo0.001303781
;
PROC GLM;
CLASS MUESTREO ORGANISMO;
MODEL FREC=ORGANISMO;
MEANS ORGANISMO/TUKEY;
RUN;
```



**Anexo 2.** Resultados del análisis de varianza con el procedimiento (GLM) para frecuencia relativa de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica por fecha de muestreo.

Procedimiento GLM

Variable dependiente: FREC

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	0.10371105	0.01481586	38.58	<.0001
Error	24	0.00921589	0.00038400		
Total correcto	31	0.11292694			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	FREC Media
0.918391	62.71270	0.019596	0.031247

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ORGANISMO	7	0.10371105	0.01481586	38.58	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ORGANISMO	7	0.10371105	0.01481586	38.58	<.0001

### Anexo 3. Prueba de medias, para frecuencia de organismos.

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para FREC

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	0.000384
Valor crítico del rango estudentizado	4.68376
Diferencia significativa mínima	0.0459

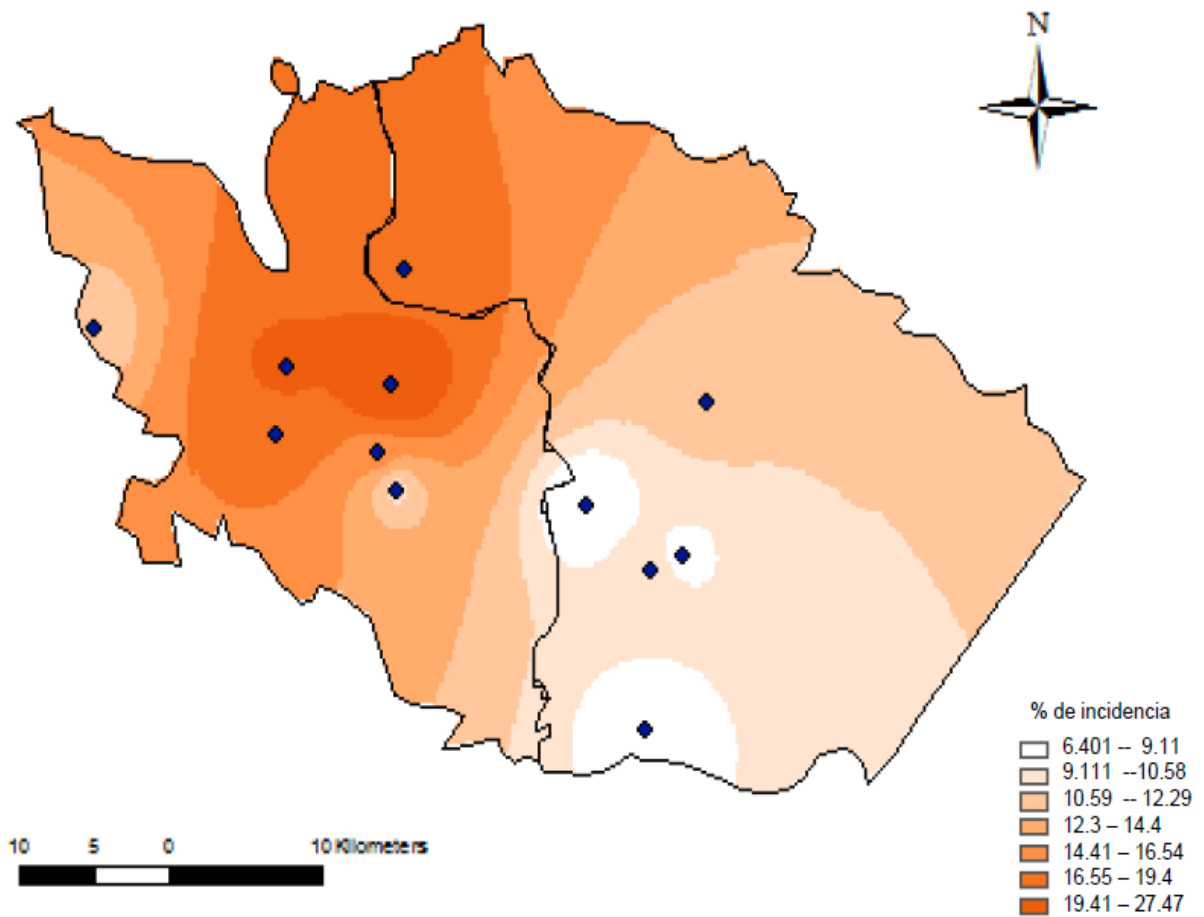
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	ORGANISMO
<b>A</b>	<b>0.17925</b>	4	Pp
B	0.02933	4	Map
B	0.02610	4	Fox
B	0.00650	4	Fin
B	0.00391	4	Pho
B	0.00261	4	Fso
B	0.00130	4	Col
B	0.00098	4	Glo

### Anexo 4. Temperatura y humedad relativa promedio registrada en 12 sitios de muestreo, en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Gro.

Comunidad	Temperatura	Humedad relativa (HR)
Tlachimala	24.3	78.9
Tutepec	24.0	77.5
Pozolapa	23.9	77.4
Tepango	23.9	77.2
Pochotillo	23.7	76.4
Parota Seca	23.6	76.1
Tecoaapa	23.6	76.1
San José la Hacienda	23.5	75.8
Las Parotillas	23.1	74.3
Xalpatláhuac	23.1	74.1
Las Animas	23.1	74.0
Los Tepetates	22.9	73.5

**Anexo 5.** Mapa de incidencia de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) a partir de doce localidades muestreadas en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México. Ciclo de producción primavera-verano 2011.



**Anexo. 6.** Variaciones detectadas en las secuencias de nucleótidos en trece aislamientos de *Phytophthora parasitica* obtenidas de plantas con síntomas de “pata prieta” de la jamaica.

Domai:Data	T	A	T	T	G	G	C	G	G	C	G	G	C	T	G	C	T	G	G	C	T		
PHY1																							
PHY4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY5	.	.	.	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.
PHY11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.
PHY14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JF792541.Phytophthora.nicotianae.NRCP...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GU111666.Phytophthora.parasitica.TARI...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JQ070101.Phytophthora.nicotianae.ATCC...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY598622.Pythium.aphanidermatum.CBS11...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Domai: data	A	A	T	T	G	T	T	G	G	C	G	G	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	
PHY1																							
PHY4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY10	.	.	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PHY11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY13	.	.	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PHY14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JF792541.Phytophthora.nicotianae.NRCP...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GU111666.Phytophthora.parasitica.TARI...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JQ070101.Phytophthora.nicotianae.ATCC...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY598622.Pythium.aphanidermatum.CBS11...	.	.	<b>C</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Domai: data

PHY1	A	G	C	C	C	T	A	T	C	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	C	G	A	
PHY4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY5	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JF792541.Phytophthora.nicotianae.NRCP...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GU111666.Phytophthora.parasitica.TARI...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JQ070101.Phytophthora.nicotianae.ATCC...	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY598622.Pythium.aphanidermatum.CBS11...	C	T	.	T	.	.	T	.	.	G	G	G	.	G	G	G	C	T	.	A	A	C	

Domai: data

PHY1	-	G	C	T	G	C	G	G	C	A	T	T	A	A	T	G	G	A	A	G	A	
PHY4	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY5	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY6	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY7	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY8	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY9	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY10	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY11	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY12	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY13	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY14	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PHY15	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JF792541.Phytophthora.nicotianae.NRCP...	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GU111666.Phytophthora.parasitica.TARI...	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JQ070101.Phytophthora.nicotianae.ATCC...	-	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY598622.Pythium.aphanidermatum.CBS11...	G	.	T	.	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C