

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA ESPECIALIDAD
INDUSTRIAS AGRARIAS Y ALIMENTARIAS



PROYECTO MONOGRÁFICO

**TÍTULO: CONSERVACIÓN DE *PHYTOPHTHORA* EN MUESTRAS DE SUELOS
ALMACENADOS, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD
PARASITARIA EN TOMATE Y PIMIENTO**

Alumna:

María Jesús García Lara

Directores:

Dr. Julio Cesar Tello Marquina

Dña. Amalia Boix Ruiz

Agradecimientos:

...Y como no, empezar con la parte menos técnica del proyecto, el agradecimiento a las personas que en cada momento me han dado empujoncitos para llevarlo a cabo.

En primer lugar a Javier Tello, una persona de mente inquieta y despierta que además de ofrecer proyectos agronómicos que nos da la oportunidad a muchos estudiantes de crecer en la profesión, contribuye enormemente en el desarrollo de una agricultura integrada. Y por su envidiable manera de explicar las materias logrando despertar el interés de los oyentes.

A Amalia Boix, por su perseverancia, atención y humildad. Una persona muy trabajadora, que a pesar de ello, siempre ha encontrado tiempo para ayudarme y guiarme en este trabajo con la paciencia y amabilidad que la define.

A mi familia, Santos, Felicita, Carlos, Santi y Jaime. Por ser el pilar fundamental de lo que soy. Por brindarme oportunidades que ellos no tuvieron. Y por su esfuerzo en que siga un buen camino tanto personal como profesionalmente.

A mi novio Milenco, que por su ímpetu de aprender y su voluntariedad me ha ayudado y acompañado en tareas del proyecto. Y no solo por eso, sino por recibir el gran apoyo día a día, y hacerme sentir la importancia de tener al lado una gran y buenísima persona que te complementa en cada momento de la vida.

Y por último agradecerles a mis compañeros de laboratorio que con su presencia alegraban y amenizaban el trabajo del 1.04 y de la finca de patología.

¡A todos mil gracias!

Índice

1. INTRODUCCION. OBJETO DE ESTUDIO	- 4 -
1.1. CONSERVACIÓN DE <i>PHYTOPHTHORA</i>	- 6 -
1.2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>PHYTOPHTHORA</i>	- 12 -
1.2.1. El género <i>Phytophthora</i>	- 14 -
1.2.2. La especie objeto de estudio: <i>P. nicotianae</i> Brenda de Haan (1896) = <i>P. parasitica</i> Dastur (1913)	- 20 -
1.3. ESPECIFICIDAD PARASITARIA DEL GÉNERO <i>PHYTOPHTHORA</i>	- 27 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS	- 33 -
2.1. CONSERVACIÓN DE <i>PHYTOPHTHORA</i>	- 33 -
2.1.1. Análisis de <i>Phytophthora</i> en muestras de suelos.....	- 33 -
2.1.2. Purificación de aislados de <i>Phytophthora</i>	- 35 -
2.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	- 35 -
2.2.1. Órganos asexuales	- 35 -
2.2.2. Órganos sexuales.....	- 36 -
2.3. ESPECIFICIDAD PARASITARIA Y PODER PATÓGENO.....	- 38 -
2.3.1. Ensayo en cámara de ambiente controlado.....	- 38 -
2.3.2. Ensayo en invernadero	- 42 -
2.3.3. Métodos estadísticos usados para la comparación de datos	- 44 -
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	- 45 -
3.1. CONSERVACIÓN DE <i>PHYTOPHTHORA</i>	- 45 -
3.1.1. Análisis de <i>Phytophthora</i> en muestras de suelo	- 45 -
3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	- 50 -
3.2.1. Órganos asexuales	- 50 -
3.2.2. Órganos sexuales.....	- 53 -
3.3. ESPECIFICIDAD PARASITARIA Y PODER PATÓGENO.....	- 55 -
3.3.1. Ensayo en cámara.....	- 55 -
3.3.2. Ensayo en invernadero	- 60 -
CONCLUSION	- 65 -
4. BIBLIOGRAFÍA.....	- 66 -

1. INTRODUCCION. OBJETO DE ESTUDIO

La podredumbre de las raíces y cuello del tomate y pimiento causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* es un problema poco estudiado en el caso del pimiento en invernaderos, pero lo es mucho menos en el caso del tomate en España (PÉREZ VARGAS, 2011).

El establecimiento de cultivos de tomate tipo “cherry” bajo malla en zonas de secano, en las provincias de Granada y Almería, dedicadas anteriormente a cultivos de vid, olivo y cereal, causó durante el segundo año de su plantación la aparición de marchiteces generalizadas a lo largo del cultivo, y especialmente en el periodo de mayor producción, coincidiendo con la máxima demanda de agua, llegando a ocasionar hasta el 100% de plantas muertas. Los dos periodos de máxima demanda de agua ocurren en el trasplante y durante la producción. Por lo que se planteó si *P. parasitica* fue introducida en los suelos muestreados cuando se inició el cultivo de tomate de manera regular, pudiera haber sido introducida con anterioridad, o incluso, podría ser un habitante habitual de dichos suelos.

Para poder encontrar respuesta a estas cuestiones, se realizó un estudio de 93 muestras de suelo de parcelas afectadas de la provincia de Granada y Almería, recogidas entre 2003 y 2004. Tras diversos análisis en meses posteriores, se observó que *P. parasitica* se conservaba durante 4 años en el 20,58% de las muestras de suelos estudiadas y durante casi 5 años (57 meses) en el 18,18% (PÉREZ VARGAS, 2011). Estos resultados pueden ayudar a explicar la rápida difusión de la enfermedad y su difícil control de la zona, especialmente de cara a futuros cultivos. De ahí la importancia del estudio de su conservación, que nos viene a decir que si el oomiceto se conserva casi 5 años en suelos mantenidos en el laboratorio sin ningún tipo de manipulación y en condiciones de ausencia de humedad (agua libre), y sin hospedador alguno que lo multiplique, en campo podría conservarse durante más tiempo ya que están presentes condiciones más favorables para *Phytophthora* como las lluvias, plantas adventicias u otros cultivos que pueden ser multiplicadores asintomáticos del patógeno.

ERWIN y RIBEIRO (1996), que realizaron una extensa revisión sobre la conservación de diferentes especies de *Phytophthora* en el suelo, pusieron especial énfasis para aclarar qué tipo de propágulos del oomiceto podían ser los responsables de una mayor o menor permanencia. Así, para *P. parasitica*, reportan periodos de conservación de 6 años para las oosporas en suelos estériles y de 4 años para suelos no esterilizados. Las clamidosporas son responsables de los mismos periodos y situación que los descritos para los órganos sexuales,

aunque estudios presentados por FRENCH-MONAR (2006) indican que el periodo de permanencia en el suelo puede ser mucho más largo.

Por otra parte, el hecho de que coexistan los dos tipos de compatibilidad genética A1 y A2 en un mismo suelo determinaría un posible incremento de la variabilidad genética de *Phytophthora*, que podría traducirse en una mayor patogenicidad expresando así un parasitismo inesperado, además de ser un mecanismo de conservación para el oomiceto al producir órganos sexuales.

El estudio de grupos de compatibilidad en las muestras de suelo puso de manifiesto que tanto en el embalse del Negratín como el de los Bermejales, coexistían los tipos A1 y A2, lo que haría posible la conservación del hongo y la variabilidad genética de éste. También en el caso de *P. parasitica* ambos tipos de compatibilidad coexisten en los cultivos de pimiento en el campo de Cartagena y en los cultivos de tomate de tipo “cherry” en el interior de la provincia de Granada (PÉREZ VARGAS, 2011).

En el caso del pimiento, en las plantaciones bajo invernadero en los campos de Murcia, se asoció desde finales de los 70 hasta mediados de los 80 a *P. capsici* con la muerte masiva de plantas de pimiento afectadas por la enfermedad conocida como “seca” o “tristeza” del pimiento (TELLO y LACASA, 2004), enfermedad limitante para el cultivo; sin embargo, desde hace más de cinco años, se ha encontrado con mucha frecuencia a *P. parasitica* asociada a plantas con síntomas de tristeza.

Debido a que la especificidad parasitaria de *Phytophthora* ha sido un tema poco tratado en bibliografía, se ha supuesto de forma genérica que la seca o tristeza del pimiento se asociaba con *P. capsici*, mientras que la podredumbre del cuello y las raíces se asociaba con *P. parasitica*. No obstante BONNET et al. (1978) realizaron un estudio sobre el poder patógeno de *P. parasitica* e introdujeron la noción de especialización parasitaria siendo este un tema necesitado de investigación. Ambas especies del género *Phytophthora* presentan características morfológicas parecidas, sin embargo su habilidad parasitaria se presentan como distinta según la bibliografía de ERWIN Y RIBEIRO (1996).

El conocimiento de los anteriores aspectos mencionados: conservación, coexistencia de dos tipos de compatibilidad genética, y especificidad parasitaria, nos sirve para realizar recomendaciones apropiadas a los agricultores con respecto a la rotación de cultivos o incluso el no uso de un tipo de cultivo en concreto que pueda ser gravemente afectado por *Phytophthora*. Además puede orientar los programas de mejora genética para la búsqueda de resistencia.

- **Objetivos del proyecto:**

Este trabajo es una continuación de otros donde se estudiaron la importancia de las enfermedades de los cultivos de tomate tipo “cherry” realizados en las provincias de Granada y Almería. A raíz de estos estudios se encontró a *Phytophthora* como el factor limitante del cultivo de dichas zonas. El trabajo que conforma este proyecto fin de carrera se centra en la determinación del tiempo de conservación de *Phytophthora* en suelos conservados en laboratorio procedentes de las provincias anteriormente mencionadas. Además de la identificación morfológica y patológica de los distintos aislados. A continuación se presentan los objetivos concretos:

1.- Evaluar la conservación de *Phytophthora* en 93 muestras de suelo conservadas durante 8 y 9 años en laboratorio en las cuales ya se había aislado *Phytophthora* con anterioridad.

2.- Identificar taxonómicamente las cepas aisladas de los suelos conservados en laboratorio.

3.- Evaluar la patogenicidad de dichas cepas, y a su vez, evaluar su especificidad parasitaria en plantas de tomate y pimiento por medio de inoculación en condiciones controladas.

1.1. CONSERVACIÓN DE *PHYTOPHTHORA*

En ausencia de plantas hospedadoras, la mayoría de las especies del género *Phytophthora* no sobreviven tanto tiempo como los hongos con una mayor capacidad saprofítica (por ejemplo, tienen la habilidad de colonizar materia orgánica en descomposición) como *Fusarium oxysporum* o las especies de *Pythium* más estrechamente relacionadas con este género. Existe la evidencia de que ciertas especies de *Phytophthora* pueden persistir durante largos periodos de tiempo en suelos, por lo que la ausencia de una planta hospedadora en un sistema de rotación de cultivos no eliminaría a todas ellas. Otras especies de *Phytophthora* se consideran como especies con un poder saprofitario pobre, ya que crecen poco o se lisan en el suelo (Tsao 1969, Sneh and McIntosh 1974; Reeves 1975). En la Tabla 1 se recogen ejemplos de persistencia de ciertas formas de esporas en suelos en distintos periodos.

Tabla 1. Tiempos representativos de supervivencia para especies de *Phytophthora* en suelos de campo, exceptuando cuando se indique lo contrario^a (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

Especies	Estado sexual	Micelio	Esporangios/ Zoosporas	Clamidosporas	Oosporas	Referencias
<i>P. cactorum</i>	Hom			3,5 meses		Gisi and Meyer (1973)
					9 meses (en frutas)	Grove et al. (1985)
					54 semanas	Jeffers and Aldwinkle (1987, 1988)
				6 años (A); 2 años (B)		Kröber (1980)
					2 años	Madden et al. (1991)
			35 días			McIntosh (1972)
		3 días (29°C)				Sneh and McIntosh (1974)
45 días (4°C)				Sneh and McIntosh (1974)		
<i>P. capsici</i>	Het	<120 días (tejido infectado)	<75 días			Ansani and Matsuoka (1983)
		Verano	4-8 semanas		12 semanas	Bowers et al. (1990)
		Invierno			8 semanas	Bowers et al. (1990)
<i>P. cinamomi</i> ^b	Het	1-60 días	2-8 semanas	1-6 años		Hwang and Ko (1978)
					84-365 días	Kassaby et al. (1977)
			2 años (A); >1 año (B)			Kröber (1980)
			2 meses			Mac Donald and Duniway (1979)
				100 días		MacKay et al. (1985)
		> 15 días				Reeves (1975)
		> 2 años				Shea et al. (1980)
				5 años		Weste (1975)
				30 días		Weste (1983a,b)
				21-42 días 6 años (20°C) (en raíces)		Weste and Vithanage (1979) Zentmyer and Mircetich (1966)

Tabla 1 (continuación)

Especies	Estado sexual	Micelio	Esporangios/ Zoosporas	Clamidosporas	Oosporas	Referencias
<i>P.citricola</i>	Hom				6 años (A); 3 años (B)	Kröber (1980)
<i>P.citrophthora</i>		40 semanas (hojas)				Gerlach et al. (1976)
				4 años (A); 3 años (B)		Kröber (1980)
		5 meses				Sneh and Katz (1988)
<i>P.colocasiae</i>	Het		2 semanas			Gollifer et al. (1980)
<i>P.cryptogea</i>	Het		14 días			Bumbieris (1979)
<i>P.dreschleri</i>	Het	4 años (A); 2 años (B)				Kröber (1980)
		10-12 días; > 30 días				Mehrotra (1972)
<i>P.erythroseptica</i>	Hom					Weste (1983b) (revisión)
<i>P.fragariae</i>	Hom	63 días			> 3 años ^d	Bain and Demaree (1945)
					8 meses ^d	J.M. Duncan (1980)
					3 años ^d	Duncan and Cowan (1980)
					1,5 años ^d	Hickman (1958); Montgomerie (1977) ^c
<i>P.infestans</i>	Het	6-8 meses				Weste (1983b) (revisión)
			63-77 días			Zan (1962)
			15-77 días			Andrivon (1995) (revisión)
					35 semanas (invierno)	Drenth et al. (1995)
					5-8 meses	Pittis and Shattock (1994)
<i>P.meadii</i>	Het	3 semanas	3 semanas	22 semanas		Liyanage and Wheeler (1991)

Tabla 1 (continuación)

Especies	Estado sexual	Micelio	Esporangios/ Zoosporas	Clamidosporas	Oosporas	Referencias
<i>P. medicaginis</i>	Hom		3-4 semanas	7 meses (5-30°C)		Basu (1980)
		7-8 días	7-14 días			MacDonald and Duniway (1979)
					2,5-3,5 años	Pratt and Mitchell (1975)
		9 días (24°C) 15 días (15°C) >35 días (4°C)			4,5 meses	Stack and Millar (1985)
<i>P. palmivora</i>	Het	6 meses-2 años	10-22 días			P. Turner (1965)
		14-28 días				P. Turner (1974)
					6 años (A); 4 años (B)	Kröber (1980)
<i>P. parasitica</i>	Het			180 días		Holdaway and Tsao (1971)
				6 años (A); 4 años (B)		Kröber (1980)
				30 días (A); 60 días (B)		Ramarao and Umabala (1982)
		<7 días; >14 días				Tsao (1969)
		7 meses				Kuske and Benson (1983)
<i>P. phaseoli</i>	Hom				8 meses	Wester et al. (1966)
<i>P. sojae</i>	Hom			> 5 días (A); < 5 días (B)		Ho (1969)
<i>P. syringae</i>	Hom				2,5 años	D.C. Harris (1985)

a Hom: homotático; het: heterotático; (A): suelo estéril; y (B): suelo no estéril. Los informes citados deben ser consultados para más información en efectos de temperatura y humedad del suelo. b Ver también Zentmyer (1980). c Hickman (1958) aunque *P. fragariae* sobrevivió como micelio en discos de agar de haba, pero Montgomerie (1977) sugirió que sobrevivió como oosporas. d Suelos infectados de forma natural donde las oosporas estaban presentes en raíces.

Aunque los datos de la Tabla 1 indican que los periodos de supervivencia son relativamente cortos para muchas especies, la dificultad de detectar *Phytophthora* en suelos puede evitar y ocultar largos periodos de supervivencia (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

La efectividad de las estrategias de control depende de la habilidad de cada especie de *Phytophthora* a sobrevivir en la ausencia de plantas hospedadoras. Entre ellas se diferencian en la forma de conservarse, tanto saprofiticamente como esporas en estado de latencia.

Aunque no se pueden comparar los datos obtenidos con diferentes especies y por diferentes investigadores, en conjunto, las oosporas tienen el mayor record de supervivencia, hasta 13 años (ERWIN y RIBEIRO, 1996), seguidas por las clamidosporas que pueden sobrevivir hasta 6 años, como en el caso de *P. parasitica* y *P. cinnamomi* (Tabla 1). Estas dos especies parecen tener la mejor habilidad para conservarse por un largo periodo de tiempo. Por el contrario, los esporangios, las zoosporas y el micelio, permanecen solo durante unas pocas semanas.

Aunque los tiempos de supervivencia dados no son tan largos como se pudiera generalmente esperar de hongos verdaderos como *Fusarium oxysporum* o *Verticilium daliae* (10-15 años), es tiempo suficiente como para asumir que *Phytophthora* pudiera probablemente persistir en suelos o en material vegetal infectado durante al menos 2 años, aunque en la ausencia de oosporas, la tasas de supervivencia pudieran ser bastante bajas.

La longevidad de los propágulos depende de su habilidad para colonizar material vegetal y persistir en grava, arena o suelo sin la presencia de un hospedador (Weste 1983b). Los factores que mejor favorecen la supervivencia de *Phytophthora* en suelos son: temperaturas más bajas que las óptimas para su crecimiento (Tabla 2), humedad del suelo a capacidad de campo (valor de potencial matricial de 300 mb) y una baja actividad microbiana en el suelo, una cualidad que es típica de los sedimentos de grava. El incremento de hongos y bacterias a menudo reprimen el desarrollo de los propágulos de *Phytophthora* (Weste 1983a, b), ya que éstos tienen una capacidad saprofitaria limitada, no desarrollándose adecuadamente en el suelo cuando hay otros microorganismos. La mayoría de las especies de *Phytophthora* parasitan a la planta cuando está sana y con sus tejidos vegetales intactos.

Tabla 2. Temperaturas (°C) de crecimiento para distintas especies de *Phytophthora* (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

	Temperatura mínima de crecimiento	Temperatura óptima	Temperatura máxima de crecimiento
<i>P. citrophthora</i>	< 5°C	24-28°C	32-33°C
<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	5-7°C	27-32°C	35-40°C
<i>P. syringae</i>	< 5°C	15-20°C	23-25°C
<i>P. hibernalis</i>	< 5°C	15°C	< 25°C

Debido a las oosporas de pared gruesa, las clamidosporas o el micelio pueden sobrevivir en tejido de plantas, pueden germinar rápidamente y producir esporangios y zoosporas, el inóculo puede incrementar rápidamente bajo condiciones favorables (Weste 1983b). Las oosporas, clamidosporas o el micelio (llamado inóculo residual por Mitchell and Kannwischer [1983]) dan lugar a esporangios cuando hay agua disponible. A su vez, cada esporangio produce sobre unas 20 y 40 zoosporas nadadoras (inóculo transitorio). Las zoosporas paran de nadar, se reúnen, germinan y penetran en la planta hospedadora. Este proceso requiere menos de 48-96 horas bajo condiciones de temperatura y humedad óptimas. En consecuencia, las especies de *Phytophthora* tienen la única habilidad de “estallar” por una rápida producción de inóculo en suelos y follajes durante la temporada de cosecha (MacKenzie et al., 1983).

En un estudio de la epidemia del tallo negro del tabaco, causado por *P. parasitica* var. *nicotianae*, la densidad del inóculo inicial, como se determinó por el método del tamizado húmedo de Shew et al. (1979a, b), osciló entre el 0,04 y 0,33 ppg en un lugar y entre 0,09 y 0,16 ppg en otro lugar del suelo. A pesar de estos relativos bajos niveles de inóculo, epidemias importantes de tallo negro dieron lugar a la incidencia de enfermedades de más del 90% durante el final de la campaña agrícola (Campbell et al., 1984). Para otras especies de *Phytophthora* que producen enfermedades a partir del suelo (Weste 1983b), la población de *P. parasitica* var. *nicotianae* incrementa rápidamente en la rizosfera (Kannwischer and Mitchell 1978).

Aunque no se considera que *P. infestans* utilice el suelo como medio de propagación, pues es casi un parásito obligado, hay evidencia de que puede moverse de manera indeterminada por medio del suelo (Gregory 1983). Gregory cita los resultados de Zan (1962) en los que la infectividad del suelo persiste hasta las 11 semanas, tiempo no suficiente para explicar la persistencia de *P. infestans* en suelos durante un periodo de 6 meses entre cultivos

de patata. Aunque la plantación de tubérculos infectados a menudo inicia epidemias, solo un 0,7% de los tallos infectados podrían atribuirse al mildiu de la patata (Hirst y Stedman 1960).

La rápida capacidad reproductiva, y el corto tiempo de reproducción de *Phytophthora* bajo condiciones ambientales favorables, es compartida por otros hongos oomicetos con una reproducción a partir de zoosporas.

En la mayoría de los casos de historias que han sido analizadas, tanto las enfermedades transmitidas por el suelo como las transmitidas por hojas causadas por *Phytophthora*, son enfermedades de tipo multicíclico, en el que el inóculo incrementa continuamente si las condiciones ambientales son favorables (Fry 1982; MacKenzie et al., 1983).

Por otra parte, el hecho de no detectar *Phytophthora* en suelos no necesariamente indica su ausencia. Por esta razón, un estado mínimo de inóculo o incluso la ausencia de del inóculo tiene que ser interpretada con precaución porque el inóculo puede cambiar de no ser detectable a elevadas concentraciones en un periodo corto de tiempo. El fallo para aislar propágulos pudiera ser debido a la insuficiencia de las técnicas para detectar un número bajo de propágulos activos o durmientes en tiempos determinados del año (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *PHYTOPHTHORA*

La taxonomía del género *Phytophthora* ha cambiado notablemente en los diez últimos años. La expresión del cambio puede cifrarse de la siguiente manera: a principios de 1990 se habían descrito unas 50 especies desde 1870. En el año 2010 dicha cifra superaba el centenar (KROON et al., 2012). Este espectacular aumento se ha debido a las técnicas basadas en la secuenciación del ADN, que ha motivado y sostenido un concepto de especie filogenética. De esta manera los grupos morfológicos propuestos por WATERHOUSE y mantenidos durante más de 30 años (ERWIN y RIBEIRO, 1996) se han trastocado para formar los denominados clados, donde los caracteres morfológicos que permitieron a dicho autor formar sus 6 grupos, han dejado de tener el valor fundamental que en su día tuvieron.

WATERHOUSE (cf. EDWIN y RIBEIRO, 1996) dividió a *Phytophthora* en grupos atendiendo tanto a la disposición del anteridio: paragino (si está sujeto a cualquier punto del oogonio) o anfigino (si rodea al pedúnculo del oogonio), como a la estructura del ápice de los esporangios: papila muy diferenciada (simple espesamiento apical) o poco diferenciada

En otras clasificaciones más antiguas, en las cuales había sólo dos reinos (vegetal y animal), *Phytophthora* fue introducido en el reino vegetal. En 1970 los organismos vivos se dividieron en eucariotas y procariotas, incluyéndose en el primero, aunque fue separado del reino de los vegetales, y designado como Myceteae. Tradicionalmente el reino Fungi ha sido ordenado en Ascomicetos, Basidiomicetos, Deuteromicetos (hongo imperfectos sin fase sexual conocida) y Ficomicetos. Los Ficomicetos incluyen dos subclases: zigomicetos y oomicetos, de las cuales el género *Phytophthora* fue incluido en la segunda. Sin embargo, la única característica que tienen ambas subclases en común es la carencia de septos en el micelio, lo que ha hecho que los Ficomicetos no sean muy aceptados como clase taxonómica. Posteriormente, se trasladó del reino Myceteae al reino Chromista, siendo propiciado este cambio por autores como SPARROW (1973), PARKER (1982) o MARGULIS et al. (1990) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996).

El reino Chromista incluye las algas pardas y todos los protistas que tienen algún mastigonema ciliar tubular (fibras secundarias), retículo endoplásmico cloroplastidial o ambos. Estas características son consideradas como originadas a partir de un ancestro. Uno de los tres “phyllas” es Heterocontophyta, bajo la cual, está la clase Pseudofungi incluida. Esta clase contiene oomicetos, dentro de la cual está clasificado el género *Phytophthora*.

Estos hongos, contrariamente a lo que ocurre con la familia de las Peronosporáceas, no son parásitos estrictos. Los oomicetos fueron trasladados al reino Protista (DICK, 1990) (cf. EDWIN Y RIBEIRO, 1996).

Dicho autor declaró: “Fisiológicamente y morfológicamente los oomicetos son “hongos”, y estos son heterótrofos, uninucleados o con protoplasmas cenocíticos, los cuales están limitados por paredes celulares en un estado vegetativo, aunque estos no tienen una relación filogenética con los hongos verdaderos (i.e. Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina)”. La diferencia más importante que presentan los oomicetos es la reproducción sexual mediante la producción de oosporas de la unión de dos gametangios (anteridio – masculino- y oogonio –femenino-), los cuales sufren una meiosis anterior a la fecundación (SANSOME, 1965) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). La totalidad del talo es diploide a lo largo de todo su ciclo vital.

Concluyendo, en la actualidad el género *Phytophthora* no está incluido dentro de la clasificación de los hongos verdaderos. Conforman con otros antiguos hongos el reino Protista y pertenece a la familia Pythiaceae, como también lo hace *Pythium*. Estos dos géneros que pueden confundirse pero que se distinguen principalmente por las siguientes características:

- En *Phytophthora* las zoosporas se diferencian en el interior de los esporangios, mientras que en *Pythium* el contenido del esporangio es expulsado al exterior bajo la forma de una vesícula, a partir de la cual se diferencian las zoosporas.
- Las especies del género *Phytophthora* son resistentes al himexazol, producto ante el que se muestra muy sensible *Pythium* (medio a 25-50 mg · L⁻¹).
- Por lo general, el crecimiento de *Phytophthora* es bastante lento en medio selectivo y su micelio adquiere un aspecto coraloide o sinuoso, mientras que el de *Pythium* es muy rápido, frecuentemente de 1 a 3 cm/día⁻¹.
- La presencia de papilas en los esporangios es un factor importante a la hora de diferenciar *Phytophthora* de *Pythium*.

Además, podemos distinguir *Phytophthora* de los demás hongos porque presenta un micelio cenocítico; son hongos diploides, mientras que la mayoría de los hongos son haploides; sus paredes están compuestas de celulosa y β-glucanos; producen esporangios o zoosporangios en el agua, cuyas zoosporas contenidas en el interior son biflageladas; no sintetizan esteroides, requiriendo una fuente externa para poder esporular y porque gran parte de su éxito como patógeno vegetal es debido a su gran capacidad para producir esporangios y zoosporas en un periodo de tiempo corto (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.2.1. El género *Phytophthora*

El nombre del género *Phytophthora* proviene del griego *phyto* (planta) y *phthora* (destructora).

El primer gran desastre descrito debido a *Phytophthora*, fue el mildiu de la patata, acaecido en el norte de Estados Unidos en 1843, y en Europa en 1845. El género *Phytophthora* entonces empezó a ser mundialmente conocido por las grandes epidemias que producía. En la época todavía no se conocía cual era el misterioso hongo, que fue identificado posteriormente como *Phytophthora infestans* (Mont.) por de Bary en 1876. Debido al desconocimiento del agente causal antes de 1876, hubo una gran controversia sobre cuál era la causa del desastre, culpando a las abundantes lluvias y a la contaminación de las industrias. La enfermedad del tizón tardío o cangrena de la patata, como también se conoce al mildiu, causó en Irlanda una hambruna entre los años 1845 y 1846, haciendo emigrar a la cuarta parte de 8 millones de habitantes hacia los Estados Unidos, mientras más de un millón de personas perecieron por la hambruna.

1.2.1.2. Los esporangios

Los esporangios son los órganos asexuales de *Phytophthora*, o con mayor precisión, zoosporangios, los cuales son vesículas que se llenan de zoosporas. Su desarrollo es el medio más rápido de reproducción. Los esporangios se forman en los esporangióforos, los cuales tienen un diámetro similar al de una hifa. Algunos esporangios pueden nacer desde la base de un esporangio ya maduro, produciendo más esporangios sucesivamente (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Son los denominados esporangios proliferantes.

El tamaño de los esporangios es variable, pudiéndose encontrar formas distintivas para cada especie. Las formas pueden variar, habiendo esféricas, subesféricas, ovoides, elipsoides, limoniformes, piriformes, obpiriformes, turbinadas u obturadas entre otras. Los esporangios presentan un color amarillento al microscopio. El esporangio puede tener una yema denominada papila. Esta papila es definida como un tapón, el cual está compuesto por un material hidratado con un índice de refracción diferente al material de la pared celular de la hifa (BLACKWELL, 1949) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). El material de la papila se descompone antes de la emergencia de las zoosporas (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.2.1.3. Las zoosporas

Las zoosporas emergen del esporangio nadando libremente. Este fenómeno tiene lugar debido a la diferencia en el potencial hídrico existente entre el interior y el exterior del esporangio. Dentro del esporangio podemos encontrarnos con potenciales de hasta 6 bares, mientras que normalmente en el exterior, el potencial del agua es de 0,0 ó 0,1 bar (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

Las zoosporas son biflageladas, y el género *Phytophthora* se caracteriza por tener un flagelo más largo que el otro. Las zoosporas son consideradas el propágulo por excelencia para infectar plantas sensibles.

El espectro luminoso más favorable para la esporulación de *Phytophthora* es el comprendido entre los 320-400 μm (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.2.1.4. Las clamidosporas y los hinchamientos hifales (hyphal swellings)

Las clamidosporas son esféricas u ovals. Éstas pueden ser hialinas o de un marrón oscuro, y tienen una pared celular gruesa (sobre 0,5 y 1,5 micras). Esta pared no suele ser tan gruesa como la de una oospora (más de 3 micras) y se pueden formar terminalmente en todos los tipos de hifas o bien puede estar intercalada entre la zona basal y apical de la hifa. Estas estructuras pueden ser diferenciadas de los *hyphal swellings*, ya que estos últimos no están delimitados en el micelio por septación. Los *hyphal swellings* son globosos e irregulares en forma, y usualmente hialinos, terminales o intercalados, y a menudo en agrupaciones (cluster), no estando limitados por septos (salvo en el género *Pythium*, que sí están delimitados por septos). Estas estructuras suelen ser comunes en las especies *P. cinnamomi*, *P. criptogea*, *P. drechsleri*, *P. megasperma* y *P. parasitica*, siendo en alguno de los casos rasgos característicos para diferenciar especies. El grosor de las paredes suelen ser de menos de 5 micras, siendo similar al grosor de las paredes del micelio (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.2.1.5. Las estructuras sexuales

Las estructuras sexuales de *Phytophthora* están compuestas por el anteridio y el oogonio, siendo el anteridio designado como el componente masculino y el oogonio el componente femenino. El oogonio normalmente es globoso o casi globoso, pero en ocasiones puede ser piriforme. Normalmente son hialinos, aunque en algunos casos puede estar pigmentada la pared del oogonio, siendo en este caso de un color amarillento a marrón. El oogonio va a estar separado de la hifa mediante un septo (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

El anteridio empieza delimitado por un septo, y puede unirse a la base del oogonio, abrazándola. Este tipo de anteridio se denomina anfigino, mientras que en otras especies el anteridio se une al oogonio por cualquier parte externa de la pared del oogonio, denominándose en este caso paragino.

La reducción cromosómica para pasar de la dotación cromosómica diploide a haploide tanto en los anteridios como en los oogonios se realiza cuando estos aún son cenocíticos (las células o núcleos no están separados por las paredes celulares), así como por el fallo en la formación de los gametos mononucleados. Estas son unas de las diferencias por las cuales podemos diferenciar al género *Phytophthora* y otros oomicetos de los hongos verdaderos.

El tubo de fertilización del anteridio rompe la pared original del oogonio depositando el núcleo anteridial. Los núcleos se fusionarán y quedarán sólo en el citoplasma del oogonio.

La oospora simple, se forma dentro del oogonio, presentando un aspecto globoso y característico, desarrollando una gruesa pared interna (0,5-6,0 micras).

Anterior a la germinación de la oospora, los núcleos haploides del anteridio y del oogonio se fusionan para formar un núcleo diploide. La oospora diploide germinará bajo condiciones favorables, y formará uno o múltiples tubos de germinación y de los cuales podrían o no formarse esporangios.

GALINDO y GALLEGLY (1960) dieron el primer paso en el conocimiento de la sexualidad de las especies del género, que agruparon como:

- Especies homotálicas: aquellas en las que un mismo micelio forma, a la vez, órganos sexuales masculinos y femeninos autofértiles.

- Especies heterotálicas: aquellas que exigen la confrontación de dos tipos conyugales compatibles (“matting types”), pudiendo pertenecer los micelios enfrentados a diferentes especies. Las especies heterotálicas presentaban 2 clases de compatibilidad, y que todo cruzamiento inter o intraespecífico es posible bajo condiciones en que las 2 cepas, puestas en confrontación, pertenecen a “matting types” o complementarios que, arbitrariamente, los autores denominaron A1 y A2.

Los mencionados autores lograron la demostración de lo dicho a partir de aislamientos de *P. infestans* procedentes de USA y México. Posteriormente han sido numerosas las especies donde se ha comprobado que en el interior de cada una existen los dos “matting types” A1 y A2. GALINDO y GALLEGLY aclararon que se trataba de tipos de compatibilidad y no tipos de sexo morfológico distinto: cada aislamiento dentro de la especie sería hermafrodita, pero incompatible consigo mismo (autoestéril), al contrario de lo que ocurre con las especies homotálicas.

Se comprobó cómo algunos aislamientos de cada tipo compatible pueden actuar únicamente como “machos” y otros solo como “hembras”, mientras que otras cepas se comportan como machos o como hembras, según si la cepa compatible con la cual se confrontan sea más macho o más hembra que las demás. Existen, entonces, grados de masculinidad o feminidad entre cepas de una misma especie (Figura 2). De forma gráfica vemos que del centro de la línea hacia la izquierda, el carácter “macho” en las cepas se acentúa. Mientras que el comportamiento como hembra va del centro a la derecha (GALINDO y GALLEGLY, 1960).

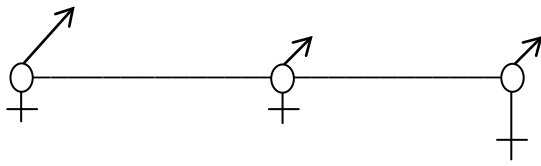


Figura 2: Sexualidad relativa de las cepas de *P. infestans*.

Dichos autores estudiaron el sentido del cruzamiento determinando que en las especies heterotálicas, la hifa gametangial macho provendría de la cepa tipo A1, por ejemplo, mientras que la hifa hembra sería aportada por la cepa tipo A2. Después de la fecundación sería establecida una verdadera hibridación.

Esto no está claramente demostrado, de la misma manera que se desconoce el grado de fecundación inducido en las confrontaciones entre cepas de tipos complementarios.

Fueron SAVAGE et al. (1968) los que trabajando con 30 especies y variedades de *Phytophthora*, estudiaron el fenómeno sexual, poniendo de manifiesto que los enfrentamientos complementarios entre especies (interespecíficos) heterotálicas eran posibles. De esta manera, 29 especies quedaron agrupadas así:

- Homotálicas:

- a) Con anteridio predominantemente paragino:

P. cactorum, *P. citrícola*, *P. lateralis*, *P. megasperma*, *P. porri*, *P. sojae*, *P. syringae*.

- b) Con anteridio predominantemente anfigino:

P. boemerae, *P. erythroseptica*, *P. fragarial*, *P. heveae*, *P. hibernalis*, *P. ilicis*, *P. phaseoli*, *P. richardiae*.

- Heterotálicas:

Con anteridio siempre anfigino:

P. arecae, *P. cambivora*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. colocasiae*, *P. cryptogea*, *P. drechleri*, *P. infestans*, *P. meadii*, *P. mexicana*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. parasitica var. nicotianae*.

Algunas especies de *Phytophthora* son homotálicas mientras otras pueden ser heterotálicas, pudiendo encontrarse cepas tipo A1 y A2. Cuando tenemos tipo A1 y A2 pueden cruzarse, pudiendo aparecer en este caso nuevos biotipos. Por esta razón, cuando coexistan ambas cepas en la naturaleza, la recombinación genética puede dar lugar a nuevos biotipos más virulentos que los existentes.

1.2.1.6. Obtención de aislados

Phytophthora, *Pythium* y otros oomicetos son metabólicamente diferentes del resto de hongos verdaderos, y esta característica se utiliza para crear medios selectivos con antibióticos. Sin embargo, el crecimiento limitado de muchos aislados suele jugar un papel en contra, ya que otros hongos saprofitos y bacterias pueden crecer más rápido.

Antes de utilizarse los medios selectivos, ya se empleaban métodos de trampas naturales con tejidos vegetales, aprovechando la patogeneidad de *Phytophthora*. Estos métodos siguen utilizándose en la actualidad, uno de ellos utiliza como trampa vegetal pétalos de clavel inmaduros (TELLO et al., 1991).

Para la utilización de trampas vegetales, TSAO (1983) propone distintas trampas vegetales para diferentes especies de *Phytophthora*:

- *P. citrophthora*: semillas de melón “cantaloup” mediante la puesta en un suelo muy húmedo y a 20-35°C durante 7 días.
- *P. parasitica*: manzanas, limones o naranjas utilizadas en un medio saturado de agua con una suspensión de suelo.

En el caso del limón, se debe de utilizar cuando pasa de color verde a amarillo, poniéndose en contacto con la zona de la raíz atacada. En el caso de que las zoosporas colonicen el limón, pasará del color amarillo a un color marrón, siendo el momento para analizar el tejido necrosado al microscopio con previo aislamiento en medio agarizado (KLOTZ y FAWCETT, 1939) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.2.2. La especie objeto de estudio: *P. nicotianae* Brenda de Haan (1896) = *P. parasitica* Dastur (1913)

Entre sus sinónimos se incluye *P. melongenae* SAWADA (1915) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. allii* SAWADA (1915) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. terrestris* (*P. terrestris*) SHERBAKOFF (1917) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *Blephaspora terrestris* PEYRONEL (1920) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. parasitica* var. *rhei* GODFREY (1923) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. jatrophae* JENSEN (1923) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. tabaci* SAWADA (1927) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. parasitica* var. *pipereina* DASTUR (1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. formosana* SAWADA (1942) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), *P. lycopersici* SAWADA (1942) (cf. ERWIN y

RIBEIRO, 1996), *P. ricini* SAWADA (1942) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), y *P. parasitica* var. *sesami* KALE Y PRASAD (1957) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). WATERHOUSE (1963, 1974) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) y, WATERHOUSE y WATERSTON (1964) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) describen las variedades *nicotianae* y *parasitica* de *P. nicotianae*; sin embargo, éstas no están ampliamente aceptadas.

Hasta 1963, el nombre *P. parasitica* DASTUR (1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), causante de una podredumbre de las plántulas de ricino (*Ricinus communis* L.), era aceptado mundialmente frente a *P. nicotianae* como nombre propio de estas especies, porque la última fue inadecuadamente descrita por BREDA DE HAAN (1896) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). ASHBY (1928) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) observó que los anteridios paraginos dibujados por BREDA DE HAAN eran erróneos porque los anteridios de los aislados de *Phytophthora* de tabaco y otros hospedadores habían sido descritos como anfiginos. Esto indicó que el cultivo en agua de las raíces de BREDA DE HANN estaba contaminado con alguna especie de *Pythium* y no se trataba de un cultivo puro de *Phytophthora*. ASHBY propuso que el nombre *P. nicotianae* fuera “eliminado” y que el nombre de todos los aislados de este patógeno procedentes de tabaco y otros hospedantes se describieran como *P. parasitica* DASTUR (1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Posteriormente, ROSEMBAU (1917), TUCKER (1931), LEONIAN (1934) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) y MEURS (1934) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) confirmaron esta propuesta. ERWIN y RIBEIRO (1996) consideran *P. parasitica* como el nombre más apropiado pero el código internacional de nomenclatura botánica difieren en esto.

WATERHOUSE (1963) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) sustituyó el nombre *P. parasitica* por *P. nicotianae* propuesto por BREDA DE HAAN (1896) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Este cambio no ha sido aceptado universalmente. La mayoría de las publicaciones en los Estados Unidos continúan empleando el nombre *P. parasitica*. En Francia, se han publicado varios artículos bajo el nombre *P. parasitica*. Incluso, el compuesto elicitanter producido por *P. parasitica* que elicitater la producción de una reacción de resistencia en plantas de tabaco se ha denominado “parasiticina”. Una revisión infográfica de Agrícola Abstracts (1970-1994) (ERWIN y RIBEIRO, 1996), mostró que existían 1907 referencias referidas a *P. parasitica* y 536 a *P. nicotianae*.

A pesar de que HO y JONG (1989) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) también preferían el nombre de *P. parasitica*, concluyen que el mandato del reglamento actual del Código Internacional de Nomenclatura Botánica deberá ser mantenido “a pesar de la ambigüedad de

la configuración del anteridio de *P. nicotianae*". Estos autores discuten que si la nomenclatura de especies de *Phytophthora* está sujeta al Código Internacional de Nomenclatura Botánica, el nombre *P. nicotianae* debería ser válido desde un punto de vista legal.

Probablemente se continúen usando ambos nombres, si nos atenemos a lo sucedido durante los últimos 30 años.

La separación de WATERHOUSE (1963,1974) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) de *P. nicotianae* var. *parasitica* de *P. nicotianae* var. *nicotianae* se basó en pequeñas diferencias morfológicas, no en su patogeneicidad para el tabaco. Luego, *P. nicotianae* var. *nicotianae* no es necesariamente un sinónimo del epíteto tabaco, pues *P. parasitica* var. *nicotianae* sensu TURCKER (1931) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) podía serlo también.

P. nicotianae var. *parasitica* (WATERHOUSE 1963, 1974; WATERHOUSE y WATERSTON, 1964) fue caracterizada por la producción de oogonios esféricos (de 16 a 31 μm , mayormente de 24 a 26, de diámetro) en cultivo monoesporangial o cuando se realizan cruzamientos entre grupos de compatibilidad sexual opuestos; oosporas esféricas con un diámetro medio de 20 μm (máximo 26 μm); anteridios anfiginos ovalados o esféricos; hifas de un diámetro mayor a 9 μm , sin "hyphal swellings"; esporangios papilados de forma ovoide o elipsoide tirando a esférica formados sobre esporangióforos en ramificaciones irregulares en simpodio y esporangios esféricos o elipsoides de forma ocasional con pedicelos cortos caducos; y por la formación de clamidosporas tardíamente (10 a 14 días) inusualmente de diámetro 22 a 30 μm con paredes más gruesas (de 3 a 4 μm) que las de *P. nicotianae* var. *nicotianae*. A pesar del empleo de estos dos epítetos varietales desde 1963, varios estudios muestran que estas diferencias no se pueden confirmar. Los patrones proteínicos de aislados de *P. nicotianae* de tomate, clavel y cítricos resultaron idénticos a los aislados de *P. nicotianae* f. sp. *nicotianae* de tabaco de los Estados Unidos. Algunas otras comparaciones bioquímicas de aislados de tabaco designados *P. parasitica* var. *nicotianae* sensu TUCKER (1931) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) con aislados de otros cultivos denominados *P. parasitica* también mostraron que variedad *nicotianae* y var. *parasitica* eran indistinguibles. Análisis serológicos mostraron que aislados de tabaco y los procedentes de otros cultivos eran similares. Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de ocho aislados de tabaco, dos de clavel y dos de cítricos fueron similares. Patrones de RFLP-DNA de aislado de *P. parasitica* procedentes de tabaco de Estados Unidos, Sudáfrica y un amplio rango de otros hospedadores fue similar.

La denominación de TUCKER (1931) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) *P. parasitica* var. *nicotianae* para aislados de tabaco se basaba solamente en la especificidad patogénica de los aislados. Este autor añadió junto a TISDALE (1922) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) que los aislados de *P. parasitica* procedentes de varios hospedantes eran similares a aquellos asignados como causantes del tallo negro del tabaco. La elección de TUCKER del nombre *P. parasitica* var. *nicotianae* para aislados de tabaco fue desafortunada y errónea pues esto condujo a rebajar el epíteto *nicotianae*, formalmente empleado para denominar especies al rango de variedad; además la especificidad para el hospedante no había sido antes usada como carácter básico de una variedad, porque el estatus de variedad deberá estar basado en criterios morfológicos CINB (Código Internacional de Nomenclatura Botánica). Sería más correcto utilizar la denominación de f. sp. (*forma specialis*), que el término “var.”, para los aislados del tabaco. Tal designación podría ser útil para facilitar la comunicación; sin embargo, HOO y JONES (1989) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) y BRASSIER (1983) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) prefieren ser cautos.

LUCAS (1975) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) mantiene que el tabaco es el único hospedante natural de *P. parasitica* var. *nicotianae* sensu TUCKER (1931) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996), y se apoya en la observación de que el pimiento, tomate, berenjena, ricino y patata todas crecieron sin pérdida alguna en campos de California del Norte en los que la enfermedad del tallo negro se manifestaba en plantas de tabaco. Si bien la inoculación artificial con los aislados de tabaco sobre otros hospedantes diferentes al tabaco indujo la enfermedad en un gran número de hospedantes (manzana, tomate, frutos de berenjena, algodón, tubérculos de patata, tallos de papaya y plántulas de berenjena), y sólo fueron ligeramente patógenos para tallos de ricino (el hospedante en el que fue descrita originalmente *P. parasitica* por DASTUR (1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) pie del cacao y plántulas de tomate.

La Sociedad Micológica Británica (British Mycological Society) redescubre a *P. nicotianae* como sigue (G. HALL, 1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996): Neotipo de *P. nicotianae* van Breda de Haan; procedente de *Simmondsia chinensis*, California, Estados Unidos, 1977, recolector desconocido. IMI 335174. Cultivos vivos preservados en IMI (International Mycological Institute, Egham, Reino Unido) y en la universidad de California en RIVERSIDE (P.1098) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996).

- Micelio.

Colonias densas o con forma de roseta, o sin patrón de crecimiento y micelio aéreo con forma de cúpula o poco voluminoso y extendido. Ratio de crecimiento radial en medio V8 a 25°C (3)-6,0 ± 1,57-(9,5) mm día⁻¹, “hyphal swellings” presentes, con paredes continuas con el micelio somático formadas a los 5-14 días en agua en un 75% de las cepas. Crecimiento o parada del crecimiento a 5°C, buen crecimiento a 35°C, el 50% de las cepas muestran parada del crecimiento a 40°C.

- Esporangios.

Producidos abundantemente bajo la luz o sin ella, muy raramente sobre medio sólido (cuando lo hace es débilmente) tanto con luz como en oscuridad; predominantemente esféricos ovoides, obturados o elipsoides con una prominente papila (14)-43 ± 8,8-(74) x 12-36 ± 7,0-(60) µm (n = 2720), ratio longitud : anchura (1,12:1)-1,20:1 ± 0,50-(1,33:1); esporangios esféricos a menudo con dos papilas, muy ocasionalmente tres. En agua, los esporangios, usualmente nacen solos o en simpodios sueltos de 2 – 4 esporangios; rara vez agrupados, a menudo sujetos lateralmente al esporangioforo (0)-2% ± 2,8-(11%), caducos con un pedicelo corto (5µm).

- Clamidosporas.

Presentes en el 50% de las cepas, esféricas, (22)-33 ± 5,5-(52) µm de diámetro (n=700), formadas entre 5-14 días, pared gruesa de 3-4 µm con inclusiones subcelulares, delimitadas por micelio somático por un septo.

- Oogonios.

Esféricos, (16)-26 ± 3,2-(36) µm de diámetro (n = 1720), pared gruesa de 1-2 µm, de contenido homogéneo, delimitados por un septo de la hifa somática.

- Anteridios.

Siempre anfiginos, cilíndricos 10-12 x 9-10 µm, unicelulares.

- Oosporas.

Esféricas, de color amarillo pálido cuando están maduras, (12)-24 ± 3,2-(34) µm de diámetro (n = 1710); proporción de apleróticas (61)-77% ± 8,0-(95)%; grosor de la pared de dos µm, índice de la pared (35)-42% ± 2,9-(50)%; contienen inclusiones subcelulares de formas irregulares.

1.2.2.1. Características

P. parasitica se clasifica dentro del grupo II (STAMPS et al., 1990) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) y está redescrita por G. Hall (1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996).

- **Esporangios**

La forma de los esporangios varía desde elipsoide, ovoide, piriforme, obpiriforme a esférica, con una prominente papila. Ocasionalmente aparecen dos papilas en un sólo esporangio. Los esporangios no son caducos. Los esporangios papilados aparecen solitarios o en un simpodio aislado con largos esporangióforos de 100 a 595 micras de longitud (valor medio de 375 micras) en algunos aislados (THONSOM y HINE, 1972) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996); los esporangios miden entre 11 y 60 micrómetros de largo x 20 a 45 micras de ancho (valores medios 40,18 x 28,52 micras) con un índice longitud/anchura de 1,1 a 1,7 (valor medio 1,34) (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Los esporangios aparecen ramificados irregularmente o simpodialmente. WATERHOUSE (1974) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) indicó que los esporangios de la variedad *parasitica* eran caducos con cortos esporangióforos (2,0 micras) pero los esporangios de la variedad *nicotianae* no los presentaban; sin embargo, esto no ha sido confirmado por estudios posteriores de otros autores. En éstos los esporangios de ambas variedades permanecían en el esporangióforo (no caducos). G. HALL (1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) observó que algunos esporangios se desprendían del esporangióforo. Pero no existía septo en el punto de ruptura, por lo que concluyó que los esporangios son no caducos.

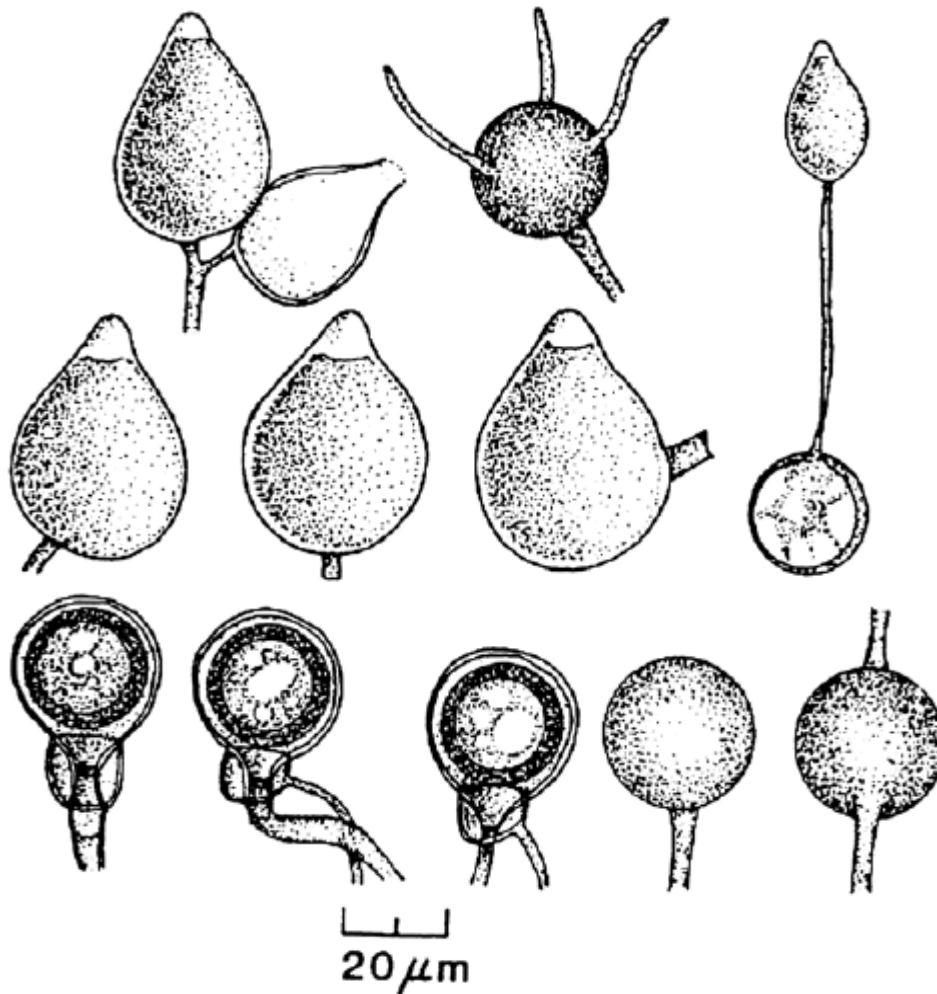


Figura 3. Morfología de *Phytophthora parasitica*. Arriba y en el centro esporangios papilados, y clamidosporas germinando. Abajo ogonios con anteridios anfiginos y conteniendo las oosporas (fotografiado por A. Vaziri). De ERWIN y RIBEIRO, 1996.

- **Hyphal Swellings**

Fueron observados Hyphal Swellings con paredes fina por G. HALL (1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996).

- **Clamidosporas**

Las clamidosporas son usualmente abundantes. Pese a ello, G. HALL (1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) escribió que sólo el 50% de 81 aislados que estudio producían abundantemente. Las clamidosporas son terminales o intercalares y con un diámetro medio de 28 micras, que puede oscilar entre 13 y 60 micras. DASTUR (1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) estudió un rango de 20 a 60 micras.

- **Órganos sexuales**

La mayoría de los aislados son heterotálicos, pero algunos aislados forman oogonios y oosporas en cultivo puro cuando el inóculo se ha tomado de cepas viejas (BRASSIER, 1972; TSAO et al., 1980) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Los aislados de *Catharanthus roseus*, fueron homotálicos (SCHUBERT y LEAHY, 1989) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Se encontraron oosporas en tejidos de la estela de raíces de naranjos del cultivar Washintgon Navel en California (LUTZ y MENGE, 1991) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Los anteridios son anfiginos y esféricos u ovoides; los oogonios son lisos y esféricos, con un diámetro medio de 26,8 micras (de 15 a 64 micras de rango). Las oosporas son apeleróticas DASTUR (1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) describe un diámetro de 13 a 24 micras. Es común encontrar oosporas de 13 a 35 micras de diámetro con un diámetro medio de 22,6 micras.

- **Temperatura de crecimiento**

La temperatura mínima de crecimiento varía de 5 a 7°C dependiendo de los aislados: el óptimo está entre 27 y 32°C; y el máximo es 37°C. G. HALL (1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) afirma que la mayoría de los aislados detienen su crecimiento a 5 y 35°C, además, sobre la mitad de los cultivos murieron a 40°C.

- **Características de crecimiento**

Las colonias de algunos aislados en PDA son típicamente aracnoides, pero en agar V8 las colonias son más mullidas. En PDA, una hifa progresa aproximadamente de 1,0 a 1,5 cm·día⁻¹ y parece proliferar mientras otras hifas progresan radialmente y se repite el progreso. Ya que en PDA el crecimiento de la colonia de *P. parasitica* en forma petaloide no tiene lugar, se puede diferenciar rápidamente de *P. citrophthora*. Sobre agar harina de maíz, las formas de la colonia fueron roseta (72,9%), estelada (11,1%), lanosa (2,4%), e indeterminada (forma intermedia entre roseta y lanosa, 13,5%) (G. HALL, 1993) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996).

1.3. ESPECIFICIDAD PARASITARIA DEL GÉNERO *PHYTOPHTHORA*

La especificidad parasitaria en el género *Phytophthora* ha sido un tema relativamente poco tratado en la bibliografía. De manera genérica se ha supuesto que a la “seca” o “tristeza” del pimiento se asociaba *P. capsici*, mientras que la podredumbre del cuello y raíces de las

plantas se asociaba *P. parasitica*. Sin embargo BONNET et al. (1978) realizaron un estudio sobre el poder patógeno de *P. parasitica* e introdujeron la noción de especialización parasitaria. Este aspecto según los citados autores es un tema necesitado de investigación.

Varios autores investigaron sobre los aspectos de especificidad parasitaria en diferentes especies vegetales. Así, SATOUR y BUTLER (1968) estudiaron la patogeneidad de las progenies (F1) procedentes de la germinación de oosporas de cruzamientos de cepas de *P. capsici* muy patógenas sobre pimiento que se creía entonces una especie específica para pimiento (SATORU y BUTLER, 1967). Las inoculaciones se hicieron con 54 aislados, de los cuales 33 no fueron patógenos en pimiento y 17 no lo fueron sobre tomate. De uno de los cruzamientos, obtuvieron 32 aislados patógenos sobre tomate y 18 sobre pimiento. Este comportamiento fue explicado por BOCCAS (1978) y BOCCAS y ZENTMYER (1976) de la siguiente forma: la autofecundación de un aislado puede dar lugar no solamente a una reducción o a un aumento del poder patógeno de la descendencia frente a sus hospedadores reconocidos o tradicionales de la especie, sino también a una ampliación de su espectro parasitario. Así, en cruzamientos con *P. capsici* (patógena sobre pimiento) y *P. palmivora* (no patógena sobre pimiento), obtuvieron 18 aislados (F1) procedentes de oosporas, que al inocularlos sobre plantas de pimiento se obtuvieron un 16,66% que fueron tan patógenas como el parental *P. capsici*, un 11,11% fueron la mitad de patógenas, un 11,11% fueron la quinta parte de patógenas y un 61,11% no expresaron ninguna patogeneidad. De igual manera, BOCCAS y ZENTMYER (1976), estudiando la patogeneidad de 29 aislados (F1) procedentes de las oosporas de los cruzamientos entre *P. cinnamomi* (patógena sobre aguacate y no sobre cítricos) y *P. parasitica* (no patógena sobre aguacate y si sobre cítricos), obtuvieron un 13,78% que fueron patógenas sobre *Citrus jambhiri* y no sobre *Persea indica*, un 27,56% lo fueron sobre *P. indica* pero no sobre *C. jambhiri* y un 58,66% no fueron patógenas sobre ninguno de los hospedadores. Como sugiere BOCCAS (1978), la inducción recíproca de autofecundaciones entre especies de *Phytophthora* y entre aislados complementarios de la misma especie hacen posible una alta heterocigosis en las cepas salvajes que se aíslan de los cultivos. Así, sugiere BOCCAS (1978) que las cepas de *Phytophthora* aisladas de cultivos anuales agrupan fenotipos variados sexualmente muy fértiles y con un amplio espectro parasitario. En este sentido BONNET et al. (1978) encontraron que al estudiar 16 aislados de *P. parasitica* procedentes de clavel (6 cepas), *Citrus* (5 aislados) y tomate (5 aislados), su patogeneidad sobre plantas de tomate, esquejes de clavel y hojas de cítricos, se muestra una especificidad parasitaria para las cepas de

cítricos, las únicas capaces de producir necrosis sobre hojas de *Citrus*, mientras que las aisladas de clavel son más patógenas sobre esquejes de clavel que las procedentes de tomate o de *Citrus*. Y las aisladas de tomate tienen sobre tomate un mayor poder patógeno sobre tomate que las aisladas de *Citrus* o las procedentes de clavel. Concluyen dichos autores que en las cepas estudiadas no se puede decir que haya una polifagia en *P. parasitica*. En este sentido, BOCCAS (1978) estableció para *P. palmivora* en cacao unas categorías poblacionales que van en el sentido de una especificidad parasitaria marcada con un fenotipo homogéneo.

Por otra parte, la relación entre *P. nicotianae* y el tabaco parece ser altamente especializada según BONNET et al. (1978). Ya en 1953 se observó la ausencia de enfermedad en una plantación de tabaco en rotación con un cultivo de tomate que se había visto muy afectado por *P. nicotianae* (FÉLIX, 1953). IVANTCHEVA-GABROSKA (1958), observó que los aislados de *Phytophthora* provenientes de tabaco y tomate, aunque eran similares morfológicamente eran diferentes biológicamente, ya que mostraban una preferencia parasitaria por el hospedador de origen.

A lo largo de los años, han sido varios los autores que han diferenciado razas o variedades dentro de la especie *P. nicotianae*. Entre aislados que afectan a plantas de tabaco se han llegado a identificar 4 razas diferentes, las razas 0 y 1 (APPLE, 1957; BONNET, 1994), la raza 2 en Sudáfrica (PRINSLOO y PAUER, 1973) y la raza 3 (MCINTYRE y TAYLOR, 1978), aunque no se dispone de información acerca de cómo estas razas afectan a otros hospedadores. Del mismo modo también se ha sugerido la existencia de razas de *P. nicotianae* en el tomate (BOUKEMA, 1983). En 1931, TUCKER distinguió *P. parasitica* var *nicotianae* (Ppn), patógeno en tabaco de *P. parasitica* var. *parasitica* (Ppp) no patógena en tabaco, aunque según ROBIN y GUEST (1994) el término de forma especializada hubiera sido una clasificación más adecuada. Según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (MCNEIL et al., 2006), se aconseja el término de forma especializada en el caso de hongos patógenos caracterizados por su adaptación a distintos hospedadores. La especificidad parasitaria de los aislados Ppn y Ppp tampoco ha sido suficientemente explicada aún. RICCI et al. (1992) sugirieron que el péptido parasiticina podría ser un factor de avirulencia. De hecho este péptido pertenece a la familia de las elicitinas, las cuales inducen una reacción de hipersensibilidad y necrosis en las hojas y protegen al tabaco de la infección por los aislados Ppp. La parasiticina fue purificada en un primer momento sólo de aislados de Ppp, pero

posteriormente también se encontró presente en algunos aislados de Ppn patógenos en tabaco (RICCI et al., 1993; BONNET et al., 1994).

El género *Phytophthora* agrupa a un gran número de especies patógenas para un enorme número de plantas. En cuanto a la especificidad del hospedador, las situaciones son diversas y bastante complejas. Algunas plantas son atacadas por una sola especie, mientras que otras pueden ser hospedadores de varias especies de *Phytophthora*.

Por otra parte, pocas especies de *Phytophthora* son específicas de un sólo hospedador y la mayoría de ellas tienen una amplia variedad de hospedadores. Dentro de tales especies, determinados aislados pueden ser más especializados que otros.

Los aislados identificados morfológicamente como *P. parasitica* (sensu DASTUR 1913) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) o *P. nicotianae* (sensu WATERHOUSE, 1963) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996) son patógenos para un amplio rango de géneros y familias vegetales. Ya que hay evidencias considerables que apoyan la preferencia de algunos aislados por determinados hospedadores, cualquier aislado no puede ser considerado patógeno para todas las plantas descritas como hospedantes. En la lista de hospedadores que fueron citados para *P. parasitica* (sensu DASTUR, 1913) o para cada variedad de *P. nicotianae* (sensu WATERHOUSE, 1963), se encontraban 264 especies distintas de hospedadores naturales, número que se ampliaba a 301 cuando se añadían los hospedadores inoculados artificialmente.

En este sentido, CRISTINZIO y NOVIELLO (1980) comunicaron que al inocular 22 aislados de *P. capsici* sobre pimiento, berenjena, tomate, calabaza y sandía, expresaron una clara especificidad parasitaria sobre pimiento. Un aislado de *P. parasitica* procedente de hibisco (*Hibiscus esculentus* L.) no resultó ser patogénico para cítricos y viceversa (ERWIN 1964) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Aislados de sésamo eran específicos para sésamo (KALE y PRASAD 1957; GEMAWAT y PRASAD, 1964 (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Aislados e identificados como *P. nicotianae* var. *nicotianae* (no procedentes de tabaco) de *Peperomia obtusifolia*, *Saintpaulina ionantha* y *Sinningia* híbrida tenían diferentes rangos de hospedantes pero ninguno fue específico (RATTINK 1981) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Aislados de *Phytophthora* procedentes de cítricos en Francia reprodujeron necrosis en hojas de cítricos, pero los aislados de clavel y tomate no los reprodujeron. Los aislados de clavel fueron más patógenos en las raíces de clavel que otros aislados, y los aislados de tomate fueron más patógenos en tomate que en otros hospedantes. El grado de susceptibilidad entre hospedantes no quedaba claro, pero el mayor grado de patogeneicidad fue manifiesto para los

aislados sobre sus propios hospedadores (BONNET et al. 1978). Aislados de cítricos fueron más virulentos en raíces de limón que aislados procedentes de petunia, tomate, nogal, morera, jobo, hibisco y melocotón. El tomate sin embargo, fue mucho más susceptible para más aislados, incluidos los de cítricos (MATHERON y MATEJKA, 1990) (cf. ERWIN y RIBEIRO, 1996). Por todo esto, no se puede pensar que cualquier aislado pueda enfermar a todos los hospedadores.

En consecuencia, KUAN y ERWIN (1980) introducen el término forma especializada para designar aislados de *P. megaesperma* patogénicos específicamente en soja o en alfalfa. Desde entonces este concepto ha sido cuestionado, los aislados que infectaban las leguminosas resultaron constituir un grupo subespecífico en base a las características taxonómicas, y las inoculaciones cruzadas demostraron que la especificidad en el hospedador no era tan estricta como se pensaba anteriormente (HANSEN, 1991). La especificidad parasitaria ha sido empleada para clasificar aislados como forma especializada dentro de una misma especie, como *P. drechsleri* f. sp. *cajani* en el frijol (KANNAIYAN et al., 1980), *P. sojae* f. sp. *medicaginis* en la alfalfa y *P. sojae* f. sp. *glycinae* en la soja (FARIS et al., 1989).

Igualmente, ALLAGUI y LEPOIVRE (2000) mostraron como los aislados de *P. nicotianae* procedentes de plantas de pimiento no eran patogénicos en plantas de tabaco, mientras que tras la inoculación en plantas de tomate y de berenjena se producían síntomas diferentes a los observados en las plantas de pimiento. Además, los aislados de *P. nicotianae* obtenidos de tomate, clavel y pistacho no producían ningún síntoma o sólo causaban una leve necrosis radicular en las plantas de pimiento.

ANDRÉS et al. (2006) inocularon 10 aislados de *P. nicotianae* procedentes de plantas de pimiento, observando que los aislados resultaron ser patógenos en plantas de pimiento cultivar Yolo Wonder, pero no causaron daño en plantas de tomate cultivar San Pedro.

La falta de patogeneidad de los aislados de *P. nicotianae* provenientes de plantas de pimiento cuando se inoculan en tomate también ha sido descrita en Túnez por ALLAGUI y LEPOIVRE (2000), lo que condujo a estos autores a proponer la existencia de una forma especializada bien definida entre estas especies. Las elicinas producidas por *P. nicotianae* han sido señaladas como moléculas involucradas en la especificidad parasitaria en la interacción *P. nicotianae* - tomate (COLAS et al., 1998; CAPASSO et al., 1999).

Ensayos muy recientes realizados en Extremadura (MORALES RODRÍGUEZ, 2011), concretamente, en la zona de los valles del Tiétar y el Alagón, donde *P. parasitica* es la única especie de *Phytophthora* que se ha encontrado afectando al cultivo de pimiento para pimentón

en dichas zonas. En esta zona es habitual la rotación de cultivos de pimiento y tabaco. En Extremadura el cultivo del tabaco supone prácticamente el 20% de la producción final agraria y el 93% de la superficie tabaquera del país (9043 ha) se encuentra en Extremadura. El tabaco es un cultivo en el que parece existir una especialización parasitaria y la interacción tabaco-*P. parasitica* ha sido de las más estudiadas dentro de esta especie de *Phytophthora* y en el caso del tabaco se han descrito especificidades parasitarias.

En el caso comentado anteriormente de Extremadura se realizaron aislamientos de *P. parasitica* en plantas de tomate y pimiento enfermas. Después se inocularon sobre especies vegetales que son hospedadores habituales de *P. parasitica* y que se podrían incluir en las rotaciones de cultivos en ambas zonas. Así los aislados de tomate se inocularon en plantas de pimiento y los de pimiento en plantas de tomate pero además se inocularon otras especies como tabaco, berenjena, kenaf, altramuz y algodón.

El comportamiento de los aislados en plantas de tabaco es de especial interés ya que en la zona de cultivo de pimiento para pimentón el tabaco es un cultivo que habitualmente forma parte de las rotaciones, de manera que estas especies ambas susceptibles a *P. parasitica*, se suceden en las mismas parcelas.

Los resultados fueron los siguientes: “Los datos obtenidos indican, además, que los aislados de plantas de tomate se muestran mucho más específicos en su patogenicidad, ya que independientemente del estado de desarrollo de la planta o el tipo de inoculación (riego o decapitación) únicamente causan enfermedad o daño en plantas de tomate, especie de la que han sido aisladas. Los aislados de plantas de pimiento se muestran menos específicos en su patogenicidad, ya que sí que son capaces de causar enfermedad en plantas de tomate aunque únicamente en el estado de planta pequeña (2- 4 hojas verdaderas) o en inoculación mediante decapitación” y además “Ninguno de los aislados inoculados, ni los procedentes de plantas de pimiento ni los de plantas de tomate fue patógeno en tabaco, berenjena, kenaf, altramuz y algodón”. Estudiando estos mismos aislados procedentes de plantas de tomate y pimiento mediante marcadores moleculares basadas en estudios de amplificación del ADN polimórfico (RAPDs) y de las secuencias entre los microsátélites (ISSRs) se llegó a la conclusión de que los aislados procedentes de tomate y pimiento son genotípicamente diferentes separando estos aislados en dos grupos claramente diferenciados, que se corresponden con el hospedador de procedencia de los mismos: plantas de pimiento o de tomate.

También PÉREZ VARGAS (2011) encontró de forma general especificidad parasitaria de los aislados de *P. parasitica* procedentes de tomate evaluado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CONSERVACIÓN DE *PHYTOPHTHORA*

2.1.1. Análisis de *Phytophthora* en muestras de suelos

Para conocer la conservación de *Phytophthora* se realizaron análisis de captura en 93 muestras de suelo, recogidas entre 2003 y 2004 y conservadas durante 8 y 9 años en bolsas de plástico en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería. Las muestras procedían de parcelas de los municipios de Zújar, Cúllar, Albuñol, Freila, de la zona del Pantano de los Bermejales como Fornes, Jayena y Arenas del Rey (Granada) y de Uleila Del Campo (Almería). Todas las muestras conservadas, que se analizaron tanto en el momento del muestreo como 1, 2 y 3 años después de este, tenían en su origen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.

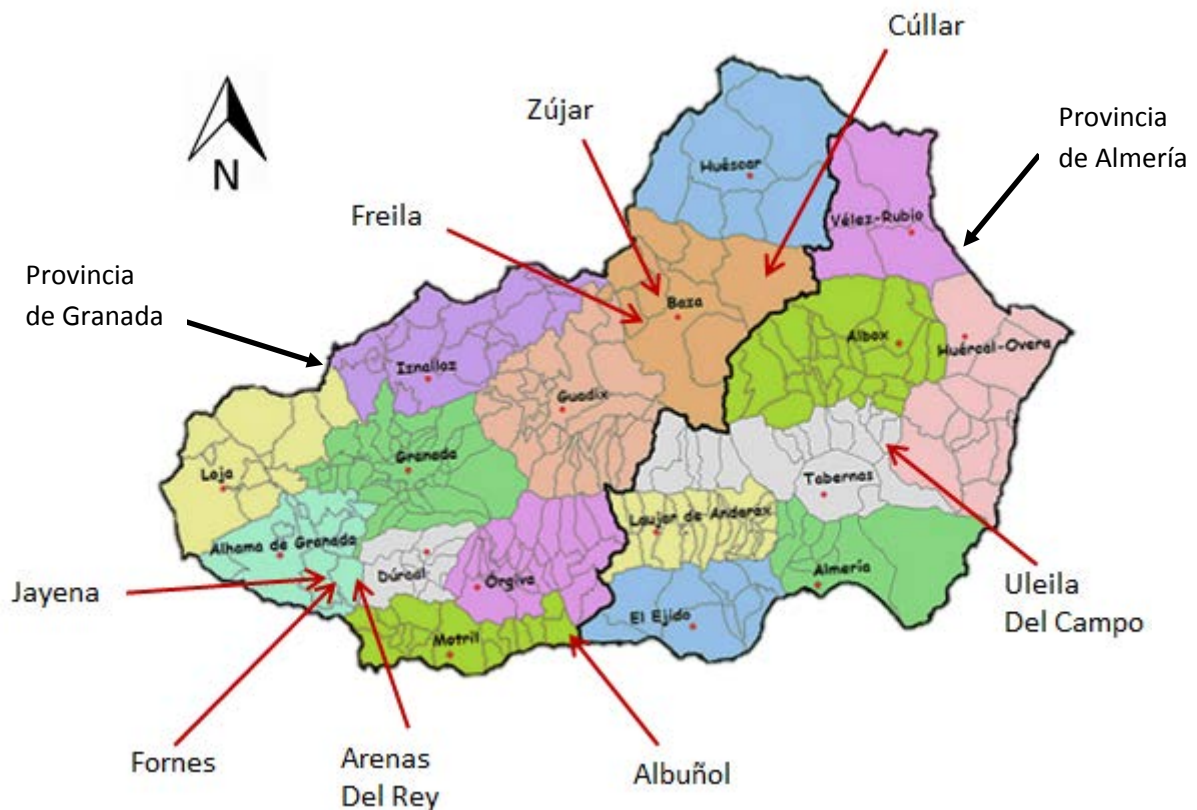
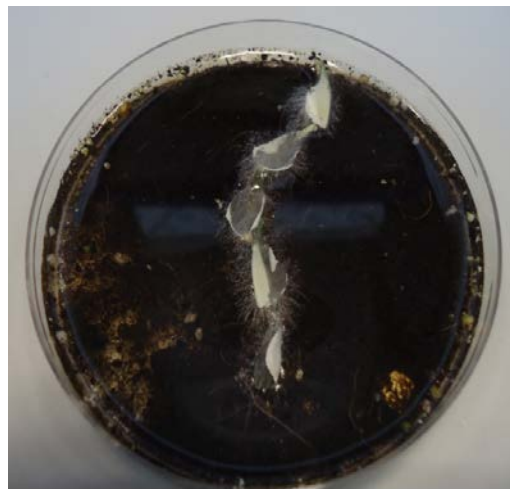


Figura 4: Zonas de las cuales proceden las muestras objeto de estudio.

Los análisis de las muestras de suelos se hicieron utilizando trampas vegetales, en este caso pétalos inmaduros de clavel, según el método de TELLO et al. (1991), en el cual se coloca con cucharilla esterilizada una pequeña cantidad de muestra en placas petri, agua y pétalos de clavel inmaduros. Para cada muestra se realizaron 5 repeticiones, cada repetición a su vez disponía de 5 pétalos. Las muestras de suelo se mantuvieron conservadas en laboratorio de la Escuela Superior de Ingeniería de Almería, en bolsas de plástico cerradas, durante 8 y 9 años (Fotos 1 y 2).



Las trampas vegetales se dejaron incubar a temperatura ambiente entre 3, 4 y 5 días haciendo posteriormente su lectura bajo microscopio (Olympus CH2) contabilizando en número de pétalos por placa en cuyos bordes había presencia de *Phytophthora*. En general, a simple vista también se pudiera ver su presencia cuando los pétalos muestran un aspecto aceitoso aunque no siempre es debido a la presencia de *Phytophthora*. En ocasiones, se puede observar a simple vista el micelio aéreo rodeando o recubriendo gran parte de los pétalos (Fotos 3 y 4).



Fotos 3 y 4: Trampas de pétalos de clavel, a la derecha se aprecia el micelio de *Phytophthora*.

2.1.2. Purificación de aislados de *Phytophthora*

De las trampas de pétalos de clavel se capturaron 25 cepas de *Phytophthora*, para aislar estas cepas, se purificaron de la siguiente manera:

Se cogieron con pinzas esterilizadas los pétalos en los cuales se detectó *Phytophthora* y se pusieron a secar en papel. Se recortaron los bordes de los pétalos y se colocaron en medio PARP selectivo para *Phytophthora* modificado (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Este medio se utilizó para la conservación de los aislados. Se trata de un medio selectivo a base de antibióticos evitando con esto las contaminaciones. Este medio fue obtenido en el laboratorio de la siguiente manera:

-A 50 ml de agua estéril se le añadió una mezcla de antibióticos y fungicidas (0,01g de pimaricina, 0,10g de PCNB y 0,2g de vancomicina).

-Separadamente, se colocó en autoclave durante 30 min y 120°C una mezcla de 950 ml de agua destilada con 17 g de harina de maíz y 10 g de agar.

-Una vez enfriado este último preparado, pero sin solidificar, se mezclaron ambos preparados, obteniendo 1 litro del medio deseado.

Las placas de conservación de los aislados se guardaron envueltas en papel de plata en el frigorífico dado que la luz directa descompone el medio (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

2.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

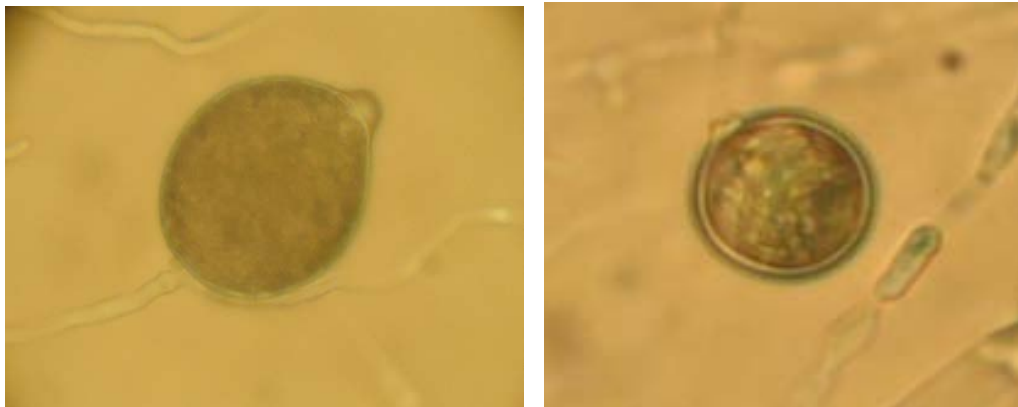
2.2.1. Órganos asexuales

Para el estudio taxonómico formaron parte las 25 cepas aisladas de las muestras de suelo conservadas en laboratorio y 3 aislados obtenidos de plantas de tomate con síntomas de *Phytophthora*, relacionados con una consulta recibida en el laboratorio, siendo en total 28 los aislados evaluados.

De cada cepa, se midieron 25 esporangios y 25 clamidosporas con el micrómetro ocular. Para ello los aislados fueron cultivados en medio PDA (caldo de patata agarizado y glucosado), un medio idóneo para aislamiento y para gran cantidad de estudios con hongos. A continuación su método de preparación según TELLO et al. (1991):

- Pelar, trocear y cocer 200 gr de patata.
- Filtrar el caldo de patata obtenido en la cocción y enrasar con agua hasta 1L.
- Añadir 20 g de D-glucosa y 17 g de agar.
- Esterilizar en autoclave durante 30 min a 120°C.

Una vez crecida la cepa en medio PDA se tomaron trozos y se pusieron en placas con agua y pétalos de clavel inmaduros. Se incubaron durante 4 días a condiciones ambientales, tiempo suficiente para que los aislados colonizaran los pétalos de clavel y produjeran los esporangios y clamidosporas. Para realizar la lectura bajo el microscopio (Olympus CH2), se tomaron trozos de los bordes de los pétalos, se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de colorante lactofucsina para la tinción de estructuras fúngicas y su correspondiente cubreobjetos. Se midieron la longitud y anchura de 25 esporangios y el diámetro de 25 clamidosporas de cada muestra. También se determinó la forma que presentaban los esporangios.



Fotos 5 y 6: Órgano asexual de *Phytophthora*, esporangio. A la derecha, clamidospora.

2.2.2. Órganos sexuales

Para provocar la producción de órganos sexuales de los aislados y determinar su grupo de compatibilidad genética y por lo tanto identificarlas como heterotálicas, se hicieron confrontaciones en placas de petri entre las cepas a estudiar y cepas A1 y A2 de *P. cryptogea* (Foto 7). El medio de cultivo utilizado fue V8 modificado (ERWIN y RIBEIRO, 1996), este medio es rico en esteroides por lo que permiten la producción de órganos sexuales. Este medio fue elaborado en laboratorio cuya receta se describe a continuación:

1- Mezclar 200 mL del preparado comercial V8 el cual contiene tomate, zanahoria, lechuga, apio, espinacas, betabel, berros y perejil con 100 mL de agua destilada. Batir con una batidora hasta homogeneizar bien.

2- Filtrar el jugo por muselina y algodón y enrasar hasta 1 L.

3- Añadir 3 g de carbonato cálcico y 20 g de agar.

4- Una vez mezclados todos los ingredientes se esteriliza en autoclave a 120°C durante 30 minutos.

A la vez se colocaron las cepas solas sin confrontar en placas petri con el mismo medio de cultivo para determinar en caso de que fueran cepas homotáticas.



Foto 7: Confrontamientos entre las cepas a estudiar y cepas A1 y A2 de *P. cryptogea*.

Una vez crecidas las cepas, se tomó una sección de la zona central de la placa donde se cruzaron los micelios de los 2 aislados pero previamente se observó con microscopio y se seleccionó el trozo de medio donde se encontraron órganos sexuales. El trozo de medio se colocó sobre un portaobjetos, se le añadió una gotita de agua, se le puso el cubre y se pasó por la llama de un mechero de alcohol hasta que el trocito se derritiera un poco. Se utilizó un ocular de 40x y objetivo de 10x.

Las estructuras sexuales que se midieron con el micrómetro ocular fueron la dimensión máxima del oogonio (estructura sexual femenina) y la anchura y longitud del anteridio (estructura sexual masculina) (Foto 8). El número de medidas fueron de 25 estructuras sexuales por cepa. También se identificó el tipo de oospora y el tipo de anteridio.



Foto 8: Medida con micrómetro ocular de órgano sexual.

2.3. ESPECIFICIDAD PARASITARIA Y PODER PATÓGENO

La especificidad parasitaria se evaluó tanto en cámara de ambiente controlado como en invernadero.

2.3.1. Ensayo en cámara de ambiente controlado

2.3.1.1. Material vegetal

La especificidad parasitaria se evaluó sobre tomate y pimiento, dos de los hospedadores habituales de *P. parasitica*, empleando para ello dos cultivares sin resistencia al oomiceto, tomate cv. Río Grande y pimiento cv. Sonar.

Previo a la siembra se desinfectaron las semillas con un baño en lejía (35g de cloro activo/L) en agitación magnética a 350 rpm durante 15 minutos, después se lavaron bajo el grifo hasta eliminar el olor a lejía.

Se sembraron en macetas de 1 litro rellenas de vermiculita (arcilla expandida a 1500°C) desinfectadas en autoclave a 121°C durante 60 minutos. Se prepararon 28 macetas de tomate y 28 macetas de pimiento más 2 macetas de testigo por cada cultivar. En cada maceta se sembraron 6 semillas. Las pinzas utilizadas para la siembra fueron flameadas con alcohol etílico (96°) con el objetivo de evitar contaminaciones. A continuación pasaron a la cámara de ambiente controlado cuyas características son las siguientes:

- Temperatura: entre 24-26 °C.
- Humedad relativa: entre 60-99%.
- Fotoperiodo: 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad al día.
- Intensidad luminosa: 12.000 lux.



Foto 9: Ensayo en cámara de ambiente controlado.

Para el crecimiento adecuado de las plantas, además de las condiciones controladas de la cámara, se le proporcionaba riego a demanda manualmente con una jarra. Se regaba en el momento que la maceta dejaba de pesar debido a la deshidratación, pero controlando el drenaje para evitar contaminaciones entre macetas y el lavado del inóculo. El riego se realizaba de 2 a 3 veces por semana. La solución utilizada era agua más abono complejo Hakaphos Verde (COMPO®) 15-15-15 en una disolución de 25 g de abono en 25 L de agua. Hasta la formación de la primera hoja verdadera se regó con agua sin abono.

2.3.1.2. Aislados del hongo

Se estudiaron 25 cepas aisladas de muestras de suelo conservadas en laboratorio y 3 aislados obtenidos de plantas de tomate, relacionados con una consulta recibida en el laboratorio, siendo en total 28 los aislados evaluados. Todos los aislados están conservados en la micoteca del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería.

2.3.1.3. Preparación del inóculo e inoculación

Para la inoculación se utilizaron las cepas previamente cultivadas en placas de petri de 9 cm de diámetro en medio PDA ya explicado anteriormente.

El tiempo de cultivo de las cepas en las placas fue el necesario hasta que cada cepa creciera, llegando al borde de la misma, quedando así toda la base de la placa cubierta (entre 7 y 14 días).

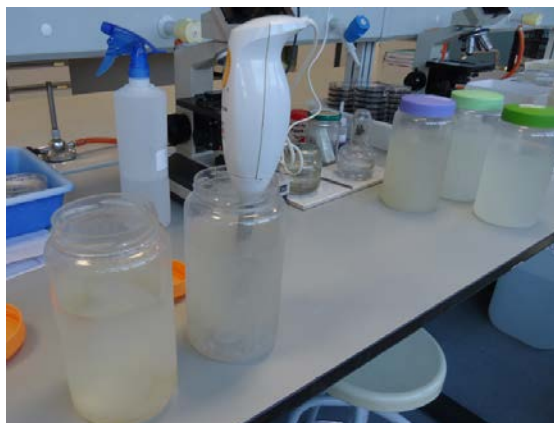


Foto 10: Cepa de *Phytophthora* cultivada en medio PDA.

Las inoculaciones se realizaron tras la emergencia y alcanzado el estado de 2 ó 3 hojas verdaderas de cada planta de tomate y pimiento. Se utilizó la técnica de inoculación por riego al sustrato con una suspensión de propágulos del oomiceto (BARTUAL et al., 1991).

Antes de la preparación de las soluciones, los instrumentos (lanceta y batidora) fueron flameadas con alcohol etílico (96°) y los contenedores del inóculo desinfectados y lavados previamente en lejía durante 24 horas y enjuagados, con el objetivo de evitar toxicidad por cloro. La suspensión de inóculo se preparó triturando el contenido de cada placa con el oomiceto en 100 ml de agua. La dosis de inóculo fue de 50 ml por cada maceta con una concentración de 1×10^4 propágulos ml^{-1} . La suspensión de propágulos contenía fragmentos de micelio, esporangios, zoosporas y clamidosporas.

Una maceta de cada cultivar se inoculó con cada uno de los aislados.



Fotos 11, 12 y 13: Preparación del inóculo e inoculación en cámara.

2.3.1.4. Evaluación de los parámetros

El periodo de evaluación para el ensayo en cámara desde la inoculación hasta el final del ensayo fue de 36 días. El seguimiento de la evolución de la enfermedad se hizo cuantificando el número de plantas muertas por maceta tras la inoculación cada 2 y 3 días.

Una vez finalizado el periodo de ensayo se sacaron las plantas de las macetas y se lavaron las raíces para realizar un análisis de los síntomas de la enfermedad utilizando una escala del 0 al 4 con el objetivo de calcular el índice de gravedad de la enfermedad (ISE). El significado de la escala es el siguiente:

- 0: sin síntomas.
- 1: leve, color miel en las raíces.
- 2: necrosis de las raíces secundarias.
- 3: necrosis de las raíces secundarias y la raíz principal.
- 4: planta muerta.

Los cálculos del ISE de cada maceta inoculada se realizaron con la siguiente fórmula:

$$ISE = \frac{\sum(\text{clase de la escala} \times \text{n}^{\circ} \text{ de plantas})}{\text{n}^{\circ} \text{ total de plantas} \times 4} \times 100$$

2.3.1.5. Reaislamiento de *Phytophthora*

Días después de las inoculaciones de las plantas con *P. parasitica*, se procedió al reaislado el oomiceto de los sustratos de las macetas de tomate y pimiento para verificar si este aún seguía presente o no.

Para ello, con una cucharilla previamente desinfectada, se tomaba una pequeña porción de sustrato y se colocaron en placas petri de 9 cm junto con agua y pétalos de clavel inmaduros como trampas vegetales. Se dejaron incubar entre 4 y 5 días a temperatura ambiente del laboratorio.

2.3.2. Ensayo en invernadero

De la misma manera que para el ensayo en cámara, para la inoculaciones en invernadero se prepararon 120 plántulas de tomate y 120 plántulas de pimiento, que permanecieron en el semillero hasta disponer de 2 a 3 hojas verdaderas. Una vez alcanzaron dicho tamaño, fueron transportadas al invernadero donde se trasplantaron a macetas de 3L, utilizando un sustrato compuesto por un 60% de coco, 20% de turba rubia y 20% de turba negra. Se trasplantaron 2 plantas por maceta con un total de 60 macetas por especie vegetal.



Foto 14: Inoculación en ensayo de invernadero.

El ensayo en invernadero se realizó sobre las mesas móviles de uno de los habitáculos del invernadero de patología Up de 480 m², ubicado en la Finca Experimental Ual-Anecoop del Paraje “Los Goterones”, Polígono 24, Parcela 281 (Foto 15).

La duración del ensayo en el invernadero fue de 90 días ya que el desarrollo de la enfermedad ocurre más lentamente. Durante este tiempo, se le aplicó fertirriego programado por goteo, mediante abonadora, con el mismo complejo y dosis que a las plantas de la cámara de ambiente controlado.



Foto 15: Disposición de las macetas en el ensayo de invernadero.

Por cada aislado se inocularon dos macetas, cada una con dos plantas, de cada especie vegetal, pimiento y tomate. El seguimiento de la evolución de la enfermedad se hizo cuantificando el número de plantas muertas por maceta tras la inoculación cada 7 días durante los 90 días.

La desinfección del material vegetal, la preparación del inóculo e inoculación, el reaislado del patógeno del sustrato, así como el tratamiento de las plantas, una vez finalizado el tiempo de ensayo, fue similar a la del ensayo en cámara de ambiente controlado.

2.3.3. Métodos estadísticos usados para la comparación de datos

Los análisis realizados para las comparaciones entre porcentajes de plantas muertas e ISE (índice de gravedad de la enfermedad) consistieron en análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial. Previamente, al tratarse de ANOVA paramétrico se comprobaron las asunciones de Normalidad y Homocedasticidad.

El análisis de la varianza y el test de diferencias significativas proceden de la transformación angular ($\text{Arcsen}(\sqrt{\%_1})$); siendo $\%_1 = (\% \text{ de plantas muertas o ISE})/100$. Test de mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD). Las diferentes letras indican diferencia significativa al 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. CONSERVACIÓN DE *PHYTOPHTHORA*

3.1.1. Análisis de *Phytophthora* en muestras de suelo

En el cuadro 1 se recogen las 93 muestras de suelos conservadas en laboratorio con sus respectivos códigos. Se muestran además los resultados de los análisis realizados en años anteriores. De las 93 muestras, 4 resultaron positivas tras el análisis de las trampas de pétalos de clavel inmaduros, albergando formas de resistencia de *Phytophthora*. De esas 4 muestras se aislaron 25 cepas: 13 cepas de Kik2, 4 cepas de AR35inv2, 5 cepas de AR43B y 3 de AR51B.

Cuadro 1: Presencia de *Phytophthora* en los diferentes análisis de trampas vegetales.

Código	Presencia de <i>Phytophthora</i>					Periodo de conservación (años)
	1° análisis (2003-2004)	2° análisis (2005)	3° análisis (2006)	4° análisis (2006)	5° análisis (2011-2012)	
Uleila	+	-	-	-	-	1-2
Uleila	+	-	-	-	-	1-2
Uleila	+	-	-	-	-	1-2
SER1	+	-	-	-	-	1-2
VER1	+	+	-	-	-	2-3
A3´	+	-	-	+	-	2-3
C3´	+	-	-	-	-	1-2
H2´	+	-	-	-	-	1-2
ULEILA	+	+	-	+	-	2-3
AR18	+	+	-	-	-	2-3
HOR1	+	-	-	-	-	1-2
VEZ1	+	-	-	-	-	1-2
MB5s	+	-	-	-	-	1-2
IBA1	+	-	-	-	-	1-2
VEZ7	+	-	-	-	-	1-2
FOR1	+	+	-	-	-	2-3
FRE1s	+	+	-	+	-	2-3
FOR3	+	+	-	-	-	2-3
KIK2	+	+	-	+	+	8-9
ALB2s	+	-	-	-	-	1-2
AR40	+	+	-	-	-	2-3
AR56´	+	+	-	-	-	2-3
AR43B	+	+	-	-	+	8-9
AR32	+	+	-	-	-	2-3
AR60	+	+	-	-	-	2-3
AR41Binv2	+	-	-	-	-	1-2
AR67	+	-	-	-	-	1-2
AR34inv1	+	-	-	-	-	1-2
AR64	+	-	-	-	-	1-2
AR31	+	-	-	-	-	1-2
KIK1	+	+	-	-	-	2-3
VEZ6	+	-	-	-	-	1-2
AL31	+	-	-	-	-	1-2

Cuadro 1 (continuación)

Código	Presencia de <i>Phytophthora</i>					Periodo de conservación (años)
	1° análisis (2003-2004)	2° análisis (2005)	3° análisis (2006)	4° análisis (2006)	5° análisis (2011-2012)	
AL48	+	+	-	-	-	2-3
AR51A	+	+	+	-	-	2-3
AR11	+	-	-	-	-	1-2
AR15	+	-	-	-	-	1-2
AR52c	+	+	+	-	-	2-3
AR52a	+	+	-	-	-	2-3
AR4	+	+	+	-	-	2-3
AR10	+	-	-	-	-	1-2
AR13	+	-	-	-	-	1-2
AR9	+	-	+	-	-	2-3
AR43A	+	-	-	-	-	1-2
AR14	+	+	+	-	-	2-3
AR42	+	-	+	-	-	2-3
AR53A	+	-	+	-	-	2-3
AR20	+	+	-	-	-	2-3
AR4	+	+	-	-	-	2-3
AR53B	+	-	-	-	-	1-2
AR1	+	+	-	-	-	2-3
AR35inv2	+	+	-	-	+	8-9
AR21	+	+	-	-	-	2-3
AR61	+	-	-	-	-	1-2
AR57	+	-	-	-	-	1-2
AR51B	+	+	-	-	+	8-9
AR8	+	+	-	-	-	2-3
AR63	+	+	-	-	-	2-3
AR36	+	+	-	-	-	2-3
AR52b	+	+	+	-	-	2-3
AR36	+	-	-	-	-	1-2
AR53c	+	-	-	-	-	1-2
AR55A	+	+	-	-	-	2-3
AR7	+	+	+	-	-	2-3
AR39	+	+	-	+	-	2-3
AR44	+	+	-	-	-	2-3

Cuadro 1 (continuación)

Código	Presencia de <i>Phytophthora</i>					Periodo de conservación (años)
	1° análisis (2003-2004)	2° análisis (2005)	3° análisis (2006)	4° análisis (2006)	5° análisis (2011-2012)	
AR54	+	-	-	-	-	1-2
AR55B	+	+	-	-	-	2-3
AR2	+	-	-	-	-	1-2
AR41A	+	-	-	-	-	1-2
JAY11	+	-	-	-	-	1-2
JAY10	+	+	-	-	-	2-3
JAY12	+	+	-	-	-	2-3
AR51B	+	-	-	-	-	1-2
JAY30	+	+	+	-	-	2-3
AR51E'	+	+	-	+	-	2-3
AR53	+	+	-	+	-	2-3
AR50	+	-	-	+	-	2-3
AR51C	+	+	+	-	-	2-3
V.V.	+	-	-	-	-	1-2
JAY28	+	-	+	-	-	2-3
JAY17	+	-	+	-	-	2-3
JAY27	+	+	-	-	-	2-3
JAY29	+	-	+	-	-	2-3
JAY26-B	+	+	+	-	-	2-3
JAY21	+	+	-	-	-	2-3
JAY23Ap'	+	-	-	-	-	1-2
JAY5	+	-	-	-	-	1-2
AR41C	+	-	-	-	-	1-2
JAY11	+	-	-	-	-	1-2
JAY12	+	+	+	-	-	2-3
JAY10	+	-	-	-	-	1-2
AR33	+	-	-	-	-	1-2

(+), presencia de *Phytophthora*. (-), ausencia de *Phytophthora*.

Cuadro 2: Presencia de *Phytophthora* en los diferentes análisis de trampas vegetales (resumen).

	Años de conservación				
	(1º análisis) 2003-2004	(2º análisis) 2005	(3º análisis) 2006	(4º análisis) 2006	(5º análisis) 2011-2012
Nº muestras analizadas	93	93	93	93	93
Periodo de conservación (años)	0	1-2	2-3	2-3	8-9
% Muestras con presencia positiva de <i>Phytophthora</i>	100	55,91	29,03	11,82	4,30

Tal y como muestra la tabla, dichas muestras ya habían sido examinadas encontrado conservación durante 4 años en el 20,58% de las muestras y durante casi 5 años (57 meses) en el 18,18% (Pérez Vargas 2011). En esta ocasión, la cifra se redujo a un 4,3% de las muestras después de 9 años de conservación.

Atendiendo a la tabla expuesta en la revisión bibliográfica del apartado de conservación (Tabla 1), ERWIN y RIBEIRO (1996) presentan unos periodos de conservación para las oosporas de *P. parasitica* de 6 años en suelos estériles y de 4 años en suelos no esterilizados, las clamidosporas son responsables de los mismos periodos y situación que los descritos para los órganos sexuales. Tras conseguir aislar las 25 cepas de suelos almacenados durante 8 y 9 años, los periodos de conservación para esta especie se prolongarían con respecto a los de ERWIN y RIBEIRO, apoyando así a estudios presentados por FRENCH-MONAR (2006) en los que se indica que el periodo de permanencia en el suelo de *Phytophthora* puede “ser mucho más largo”.

El 18,30% de las muestras estudiadas no dieron claros resultados de aislamiento a lo largo de los diferentes análisis realizados durante 8 y 9 años. Muestras de las que se dejó de aislar *Phytophthora*, nos sorprenden tiempo después tras sus análisis por aparición del oomiceto en estas. Este hecho revela que el método de las trampas vegetales de pétalos de clavel puede generar resultados minusvalorados. ERWIN y RIBEIRO (1996), indicaron que la dificultad de detectar *Phytophthora* en suelos puede evitar y ocultar largos periodos de supervivencia. Por estas razones, sería de importancia la realización de un método de mayor sensibilidad como lo es la fitopatometría de suelos y sustratos.

Como vemos, la capacidad de aislar *Phytophthora* de los suelos conservados va disminuyendo con el tiempo. Sin embargo, su presencia tras este periodo puede ayudar a explicar la rápida difusión de la enfermedad y su difícil control de la zona, especialmente de cara a futuros cultivos.

La presencia del hongo en las aguas de riego así como en los suelos de vega, PÉREZ VARGAS (2011), podrían sugerir que *P. parasitica* estaba ya en la zona antes de implantarse los cultivos y ha bastado con la extensión de los cultivos de tomate para que el patógeno se haya manifestado ocasionando enfermedad, interviniendo en ello los aperos de labranza que se utilizan (PÉREZ VARGAS, 2011).

3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

3.2.1. Órganos asexuales

Según los caracteres estudiados (cuadros 3 y 4), todas las cepas se han agrupado como *P. parasitica*. Estas cepas producen clamidosporas lo cual es un carácter distintivo de *P. parasitica*. Además, bajo el microscopio se observó la producción en estas cepas de hyphal swelling (Foto 16), y ese carácter podría atribuirse a *P. parasitica*. La ausencia de pedicelo es otra característica que nos ayuda a identificar el tipo de especie estudiada como *P. parasitica*.

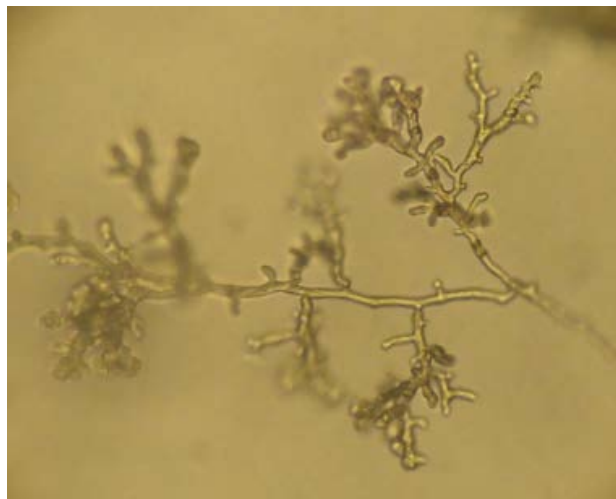


Foto 16: Hyphal swelling de *Phytophthora parasitica*.

La forma de los esporangios en el caso de *P. parasitica* es mayoritariamente ovoide, elipsoide, obturinado y obpyriforme. En este caso, estos esporangios son frecuentemente bipapilados y pueden llegar a tener hasta tres papilas (Foto 17).

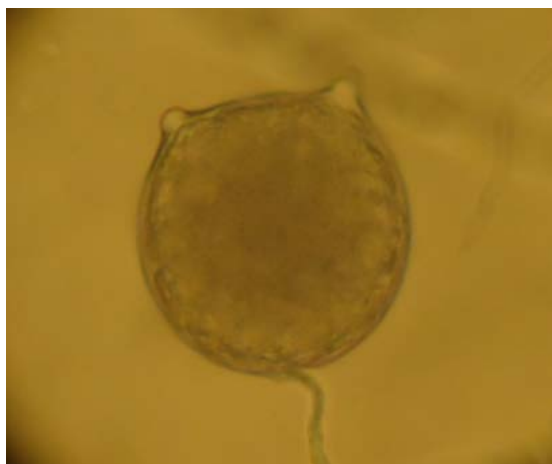


Foto 17: Esporangio bipapilado y esférico.

El tamaño de los esporangios es otro de los caracteres estudiados para la identificación taxonómica y especialmente la relación longitud/anchura (l/a). Si observamos esta relación en el cuadro 1, los valores oscilan para todas las cepas entre 1,14 y 1,7 con un valor medio de 1,28, lo que nos acercaría a encuadrar dichas cepas como *P. parasitica* que mayoritariamente tienen una relación l/a < 1,4 (PÉREZ VARGAS, 2011). Para las clamidosporas, ERWING y RIBEIRO (1996) reportaron una media del diámetro de 28 μm , mientras que G. HALL'S (1993) obtuvo un promedio de 33 μm , dato al cuál se aproxima más la media de clamidosporas obtenida en este ensayo (34,89 μm).

Para esta especie ERWIN y RIBEIRO (1996), proporcionaron los valores medios de longitud y anchura: 45x36 μm . Si revisamos el cuadro 1 los valores medios obtenidos de longitud y anchura (47, 6x37, 4 μm) son aproximados a los de los mencionados autores.

Cuadro 3: Características morfológicas de esporangios de *Phytophthora parasitica*. Se muestran resumidos los valores medios \pm desviación típica para cada muestra de suelo.

Código cepa	Longitud Esporangios (μm)	Anchura Esporangios (μm)	Relación l/a	Clamidosporas (μm)
Kik2	49,48 \pm 6,59	37,86 \pm 5,59	1,32 \pm 0,29	35,17 \pm 6,88
AR35inv2	42,25 \pm 8,01	35,15 \pm 7,54	1,22 \pm 0,11	33,8 \pm 6,17
AR43B	48,88 \pm 7,82	39,98 \pm 5,58	1,24 \pm 0,16	37,8 \pm 6,06
AR51 B	43,23 \pm 6,87	35,13 \pm 5,87	1,33 \pm 0,14	33 \pm 5,47
11/39	45,83 \pm 5,46	36,43 \pm 4,99	1,21 \pm 0,12	32,1 \pm 6,57

Cuadro 4: Características morfológicas de esporangios de *Phytophthora parasitica*. Se muestran valores medios \pm desviación típica para 28 muestras.

Código cepa	Longitud Esporangios (μm)	Anchura Esporangios (μm)	Relación l/a	Clamidosporas (μm)
Kik2 Phy 1	50,8 \pm 4,25	40,5 \pm 4,89	1,26 \pm 0,11	36,8 \pm 7,38
Kik2 Phy 2	49,9 \pm 7,23	38,7 \pm 5,78	1,3 \pm 0,11	34,8 \pm 7,29
Kik2 Phy 3	48,2 \pm 7,24	36,6 \pm 5,86	1,33 \pm 0,15	35,6 \pm 7,61
Kik2 Phy 4	48,1 \pm 7,08	38 \pm 6,33	1,28 \pm 0,14	40,6 \pm 6,59
Kik2 Phy 5	44,8 \pm 4,78	35,3 \pm 3,56	1,27 \pm 0,10	26,5 \pm 6,04
Kik2 Phy 6	64,7 \pm 90,41	37,8 \pm 5,07	1,72 \pm 2,41	36,6 \pm 5,35
Kik2 Phy 7	43,7 \pm 4,95	34,8 \pm 4,26	1,26 \pm 0,10	33,5 \pm 6,37
Kik2 Phy 8	49,7 \pm 8,14	40 \pm 7,32	1,25 \pm 0,11	33,9 \pm 8,96
Kik2 Phy 9	46,5 \pm 9,66	36,3 \pm 8,17	1,29 \pm 0,10	34,5 \pm 7,57
Kik2 Phy 10	46,4 \pm 5,26	37,4 \pm 5,02	1,25 \pm 0,11	35,6 \pm 5,60
Kik2 Phy 11	51,7 \pm 5,44	39,9 \pm 5,57	1,31 \pm 0,13	37,3 \pm 6,88
Kik2 Phy 12	50,2 \pm 7,39	39,1 \pm 5,99	1,29 \pm 0,14	33,4 \pm 6,49
Kik2 Phy 13	48,5 \pm 4,84	37,5 \pm 4,79	1,30 \pm 0,11	38,1 \pm 7,37
AR35inv2 Phy 1	45,7 \pm 8,43	39,1 \pm 9,24	1,19 \pm 0,12	38,8 \pm 7,91
AR35inv2 Phy 2	37,5 \pm 6,08	30,8 \pm 5,09	1,22 \pm 0,11	31,5 \pm 4,50
AR35inv2 Phy 3	39,7 \pm 7,88	32,5 \pm 7,25	1,23 \pm 0,12	31,6 \pm 7,28
AR35inv2 Phy 4	46,1 \pm 9,63	38,2 \pm 8,59	1,22 \pm 0,10	33,6 \pm 5,00
AR43B Phy 1	54,1 \pm 5,39	46,1 \pm 5,16	1,18 \pm 0,10	41,6 \pm 5,90
AR43B Phy 2	44,4 \pm 10,93	36,1 \pm 8,72	1,23 \pm 0,11	34,7 \pm 7,78
AR43B Phy 3	53,3 \pm 11,10	46,1 \pm 4,09	1,16 \pm 0,23	42,8 \pm 5,97
AR43B Phy 4	51,7 \pm 6,28	40 \pm 4,08	1,30 \pm 0,19	38,7 \pm 4,09
AR43B Phy 5	40,9 \pm 5,39	31,6 \pm 5,86	1,32 \pm 0,19	31,2 \pm 6,58
AR51 B Phy 1	48,3 \pm 6,52	37,7 \pm 6,12	1,29 \pm 0,11	34,8 \pm 7,39
AR51 B Phy 2	40,9 \pm 7,67	32,2 \pm 6,14	1,28 \pm 0,14	29,8 \pm 3,37
AR51 B Phy 3	49,5 \pm 6,41	35,5 \pm 5,35	1,41 \pm 0,18	34,4 \pm 5,65
11/39 Phy 1	36,6 \pm 5,90	28,1 \pm 5,22	1,14 \pm 0,14	28,3 \pm 6,07
11/39 Phy 2	48,6 \pm 6,34	38,5 \pm 4,39	1,27 \pm 0,13	36,8 \pm 7,38
11/39 Phy 3	52,3 \pm 4,14	42,7 \pm 5,35	1,23 \pm 0,10	31,2 \pm 6,26
VALOR MEDIO	47,6\pm9,81	37,4\pm5,83	1,28\pm0,21	34,89\pm6,45

3.2.2. Órganos sexuales

La morfología y sexualidad de las cepas recogidas en la cuadro 5 y 6 también nos indican que el 100% de los aislados corresponden a *P. parasitica*. Todos los aislados se comportaron como heterotálicos produciendo órganos sexuales en los enfrentamientos, presentando los dos tipos de compatibilidad genética (A1 y A2). El 21,42% de los aislados pertenecen al grupo A1 y el 78,57% al A2, presentando la muestra AR43B aislados de ambos grupos de compatibilidad además de presentar homotalismo en una de los aislados.

Todos presentaron un tipo de anteridio anfigino, y como bien clasificó SAVAGE et al. (1968), *P. parasitica* pertenece al grupo de especies heterotálicas cuyo anteridio es siempre anfigino. Ésta especie además tiene todas sus oosporas pleróticas, resultados que difieren de los presentados por ERWIN y RIBEIRO (1996) en los que las oosporas de *P. parasitica* son apleróticas. Estos autores atribuyeron a la especie una media del diámetro del oogonio de 26,8 μm , con un rango entre 15 y 64 μm , la media del diámetro de oogonio que se obtuvo en estos ensayos (24,73 μm) está comprendida entre estos dos valores. No obstante los autores hablan de un rango bastante amplio en el que no sólo *P. parasitica* encajaría. El tamaño del anteridio oscila entre 10-12 x 9-10 μm (PÉREZ VARGAS, 2011). En el caso de las cepas estudiadas, los valores de los anteridios están por encima de dichos valores, acercándose así a los de *P. capsici*. Sin embargo el carácter no pedicelado de los esporangios y la presencia abundante de clamidosporas permiten clasificar a los aislados como *P. parasitica*.

Como podemos observar las medidas no orientan con total exactitud para la identificación taxonomía sino que tenemos que orientarnos además con otros caracteres como la presencia de clamidosporas, pedicelos en los esporangios e hinchamientos hifales. De ahí la gran importancia del desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación del ADN que identifican con mayor precisión el tipo de especie que se está estudiando.

Cuadro 5: Compatibilidad genética y características morfológicas de los órganos sexuales de cepas de *Phytophthora parasitica*. Se muestran resumidos los valores medios \pm desviación típica para cada muestra.

Código cepa	Diámetro Oogonio	Long. Anteridio	Anchura Anteridio	Grupo de Compatibilidad
Kik2	23,31 \pm 3,78	15,17 \pm 2,45	12,82 \pm 1,88	A2
AR35inv2	29,03 \pm 3,57	15,20 \pm 2,15	13,03 \pm 1,52	A1
AR43B	29,28 \pm 3,52	13,5 \pm 2,28	11,8 \pm 1,70	A1, A1, Homotálica, A2,A2
AR51 B	21,13 \pm 3,06	14,7 \pm 2,00	12,8 \pm 1,77	A2
11/39	21,17 \pm 2,93	16,23 \pm 2,85	13,87 \pm 1,68	A2

Cuadro 6: Compatibilidad genética y características morfológicas de los órganos sexuales de cepas de *Phytophthora parasitica*. Se presentan valores medios \pm desviación típica para 28 muestras.

Código cepa	Diámetro Oogonio	Long. Anteridio	Anchura Anteridio	Tipo de oospora	Tipo de anteridio	Grupo de Compatibilidad
Kik2 Phy 1	24,2 \pm 2,95	14,6 \pm 2,86	12,2 \pm 2,08	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 2	22,3 \pm 3,67	15,6 \pm 2,53	13,5 \pm 2,39	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 3	23,8 \pm 3,32	13,5 \pm 2,28	11,8 \pm 1,70	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 4	24,8 \pm 3,14	15 \pm 2,39	12,8 \pm 1,66	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 5	21,7 \pm 3,74	15,7 \pm 2,23	13,6 \pm 2,05	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 6	24,3 \pm 4,36	15,4 \pm 2,25	12,9 \pm 1,72	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 7	27,3 \pm 3,88	13,8 \pm 1,79	11,5 \pm 1,62	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 8	21,3 \pm 4,63	16 \pm 2,60	13,7 \pm 1,93	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 9	23,8 \pm 3,76	15,3 \pm 2,32	12,9 \pm 2	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 10	24,3 \pm 4,24	15,5 \pm 3,31	12,3 \pm 2,03	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 11	21,8 \pm 3,19	15,9 \pm 2,03	13,6 \pm 1,67	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 12	18,5 \pm 4,21	15,3 \pm 2,82	12,9 \pm 1,38	Plerótica	Anfigino	A2
Kik2 Phy 13	24,9 \pm 4,11	15,6 \pm 2,42	12,9 \pm 2,25	Plerótica	Anfigino	A2
AR35inv2 Phy 1	28,6 \pm 3,31	14,7 \pm 1,95	12,5 \pm 1,02	Plerótica	Anfigino	A1
AR35inv2 Phy 2	29,9 \pm 4,36	15,1 \pm 2,34	13,3 \pm 1,87	Plerótica	Anfigino	A1
AR35inv2 Phy 3	27,9 \pm 3,12	15,5 \pm 1,61	13,3 \pm 1,57	Plerótica	Anfigino	A1
AR35inv2 Phy 4	29,7 \pm 3,49	15,5 \pm 2,7	13 \pm 1,61	Plerótica	Anfigino	A1
AR43B Phy 1	30,7 \pm 4,05	15,1 \pm 2,34	13,5 \pm 1,91	Plerótica	Anfigino	A1
AR43B Phy 2	26,7 \pm 4,49	14 \pm 1,91	12 \pm 1,61	Plerótica	Anfigino	A1
AR43B Phy 3	32,6 \pm 3,85	16,6 \pm 2,27	14,7 \pm 1,95	Plerótica	Anfigino	Homotámica
AR43B Phy 4	28 \pm 2,5	14,7 \pm 1,67	13 \pm 1,02	Plerótica	Anfigino	A2
AR43B Phy 5	28,4 \pm 2,82	13,3 \pm 1,57	12,1 \pm 0,94	Plerótica	Anfigino	A2
AR51 B Phy 1	20,7 \pm 2,45	14,8 \pm 2,49	12,8 \pm 2,32	Plerótica	Anfigino	A2
AR51 B Phy 2	19,7 \pm 2,53	15,3 \pm 2,08	13,2 \pm 1,84	Plerótica	Anfigino	A2
AR51 B Phy 3	23 \pm 4,21	14 \pm 1,44	12,4 \pm 1,14	Plerótica	Anfigino	A2
11/39 Phy 1	21,5 \pm 2,39	17,1 \pm 3,44	14,1 \pm 1,75	Plerótica	Anfigino	A2
11/39 Phy2	22,3 \pm 2,49	14,6 \pm 1,72	13,1 \pm 1,81	Plerótica	Anfigino	A2
11/39 Phy 3	19,7 \pm 3,91	17 \pm 3,39	14,4 \pm 1,49	Plerótica	Anfigino	A2
VALOR MEDIO	24,73\pm3,54	15,16\pm2,31	13\pm1,73			

Phytophthora parasitica aparece asociada a los cultivos de tomate de las zonas del interior de Granada, parasitando las variedades tipo “cherry”, pero aparece muy frecuentemente en suelos y plantas de cultivos de pimiento en el Campo de Cartagena. Ambos tipos de compatibilidad coexisten en los campos mencionados (PÉREZ VARGAS, 2011). Este hecho es diferencial con respecto a los aislados estudiados por MORALES RODRÍGUEZ (2011) que fueron todos heterotálicos y del tipo A2.

Además de coexistir los dos tipos de compatibilidad A1 y A2 en una misma zona, existe evidencia de que pueden convivir en un mismo suelo, como es el caso de la muestra AR43B. Este hecho tiene una consecuencia significativa ya que puede dar lugar a una reducción o a un aumento del poder patógeno de la descendencia frente a sus hospedadores reconocidos o tradicionales de la especie, además de una ampliación de su espectro parasitario tal y como señalaron Boccas (1978) y Boccas y Zentmyer (1976). Esto indica que la variabilidad genética de las poblaciones puede aumentar en dichas parcelas, lo que podría modificar su patogeneicidad, afectando, por ejemplo, a su especificidad parasitaria y a la resistencia frente a los pocos tratamientos químicos disponibles para su control. Aparte de explicar una larga conservación del oomiceto en el suelo.

3.3. ESPECIFICIDAD PARASITARIA Y PODER PATÓGENO

A continuación presentan los resultados de patogeneicidad de aislados de *P. parasitica* sobre plantas de tomate y pimiento, en cámara y en invernadero.

3.3.1. Ensayo en cámara

En el ensayo de especificidad parasitaria, el 64, 29% de las cepas evaluadas fueron capaces de matar a todas las plantas de tomate, antes incluso de los 30 días de ensayo (cuadro 7, figura 5). El 35,71% de los aislados restantes no causaron la muerte de todas las plantas, aunque estas mostraron graves síntomas de pudrición de cuello y raíces, con un ISE por encima del 80%, lo que sin duda conduciría a la muerte de las plantas pocos días después. Sin embargo, ninguna planta de pimiento se vio afectada por alguna de las cepas.

Cuadro 7: Expresión del poder patógeno sobre pimiento y tomate de aislados de *P. parasitica* obtenidos de suelos y sustratos conservados durante 8 y 9 años en laboratorio.

Código aislado	Tomate				Pimiento			
	% Plantas muertas	Nº Plantas con síntomas	ISE	Reaisl.	% Plantas muertas	Nº Plantas con síntomas	ISE	Reaisl.
Kik2 Phy 1	100	6 ^a (4) ^b	100	+	0	4(0)	0	+
Kik2 Phy 2	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 3	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 4	100	5(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 5	80	1(3)-4(4)	95	+	0	5(0)	0	+
Kik2 Phy 6	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 7	100	6(4)	100	+	0	11(0)	0	+
Kik2 Phy 8	60	2(3)-3(4)	90	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 9	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 10	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 11	80	1(3)-4(4)	95	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 12	83,33	1(2)-5(4)	91,67	+	0	6(0)	0	+
Kik2 Phy 13	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
AR35inv2 Phy 1	83,33	1(3)-5(4)	95,83	+	0	6(0)	0	+
AR35inv2 Phy 2	83,33	1(3)-5(4)	95,83	+	0	6(0)	0	+
AR35inv2 Phy 3	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
AR35inv2 Phy 4	100	7(4)	100	+	0	5(0)	0	+
AR43B Phy 1	50	3(3)-3(4)	87,5	+	0	6(0)	0	+
AR43B Phy 2	83,33	1(2)-5(4)	91,67	+	0	6(0)	0	+
AR43B Phy 3	100	5(4)	100	+	0	6(0)	0	+
AR43B Phy 4	40	3(3)-2(4)	85	+	0	6(0)	0	+
AR43B Phy 5	83,33	1(3)-5(4)	95,83	+	0	7(0)	0	+
AR51 B Phy 1	100	7(4)	100	+	0	6(0)	0	+
AR51 B Phy 2	100	9(4)	100	+	0	6(0)	0	+
AR51 B Phy 3	100	5(4)	100	+	0	6(0)	0	+
11/39 Phy 1	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
11/39 Phy2	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
11/39 Phy 3	100	6(4)	100	+	0	6(0)	0	+
Testigo	0	6(0)	0	-	0	6(0)	0	-

ISE: índice de gravedad de la enfermedad.

a: n° Planta con síntoma, b: (n° escala del ISE).

(+), presencia de *Phytophthora*. (-), ausencia de *Phytophthora*.

Reaisl.:reaislamiento.



Fotos 18 y 19: Expresión del poder patógeno en pimiento y tomate. Raíces de tomate afectadas por *Phytophthora*.

Para descartar un fallo en la inoculación, en el caso del pimiento, al no producirse síntoma alguno con ninguno de los aislados, se procedió al reaislado del oomiceto del sustrato de cada maceta días después de la inoculación, siendo positiva la presencia del hongo en el sustrato tanto en el caso de las macetas de tomate, como de pimiento (cuadro 7).

Frente a la falta de expresión de síntomas en pimiento, la patogeneicidad de la que hicieron gala los aislados de *P. parasitica* inoculados en tomate, inclusive tras los nueve años de conservación en bolsas de plástico de alguna de las muestras de las que procedían, no hace sino mostrar la marcada especificidad parasitaria de dichos aislados en tomate.

El cuadro 7 y la figura 5 ponen en evidencia otro hecho: la expresión de la variabilidad en la patogeneicidad de aislados. Los aislados cuyos códigos van precedidos de Kik2, AR35inv2, AR43B, AR51B, indican para cada distintivo que fueron obtenidos de las mismas muestras de suelo. De esa manera pueden detectarse pequeñas diferencias de patogeneicidad que no parecen relevantes para la finalidad del ensayo y que no pueden ser atribuidas a la conservación, pese a que los aislados obtenidos de un suelo con cultivo de tomate y plantas enfermas (código 11/39) dan una mayor uniformidad en la respuesta. Estadísticamente existen diferencias significativas entre los aislados con respecto al porcentaje de plantas muertas y el ISE (cuadro 8).

Cuadro 8: Diferencias estadísticas de patogeneidad entre los aislados inoculados/muestras de suelo en plantas de tomate.

Muestras suelo	%Plantas muertas		ISE	
AR43B	71,33±25,23	b	92±6,08	b
AR35inv2	91,67±9,62	ab	97,92±2,41	ab
Kik2	92,53±12,77	a	97,82±3,62	a
AR51B	100±0	a	100±0	a
11/39	100±0	a	100±0	a
P-valor	0,0441		0,041	

El análisis de la varianza y el test de diferencias significativas proceden de la transformación angular ($\text{Arcsen}(\sqrt{\%}/1)$); siendo $\%1 = (\% \text{ de plantas muertas o ISE})/100$. Test de mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD). Las diferentes letras indican diferencia significativa al 95%.

En el cuadro 7 no se aprecian las diferencias de patogeneidad entre los diferentes aislados inoculados en plantas de tomate. Si se observa el análisis estadístico de la varianza, (cuadro 8) la muestra de suelo AR43B difiere de Kik2, AR51B y 11/39 mostrando una menor patogeneidad. Entonces surge la cuestión, si el homotalismo o el heterotalismo están relacionados con la variabilidad genética de la descendencia de las poblaciones de *Phytophthora* y esta a su vez relacionada con la variabilidad de la especificidad parasitaria, ¿significa esto que el homotalismo está relacionado con una disminución de la patogeneidad?, o que en este caso, ¿se generó una descendencia menos patógena debido a la coexistencia de los dos tipos de compatibilidad?

Tomate-Inoculación por riego-Cámara

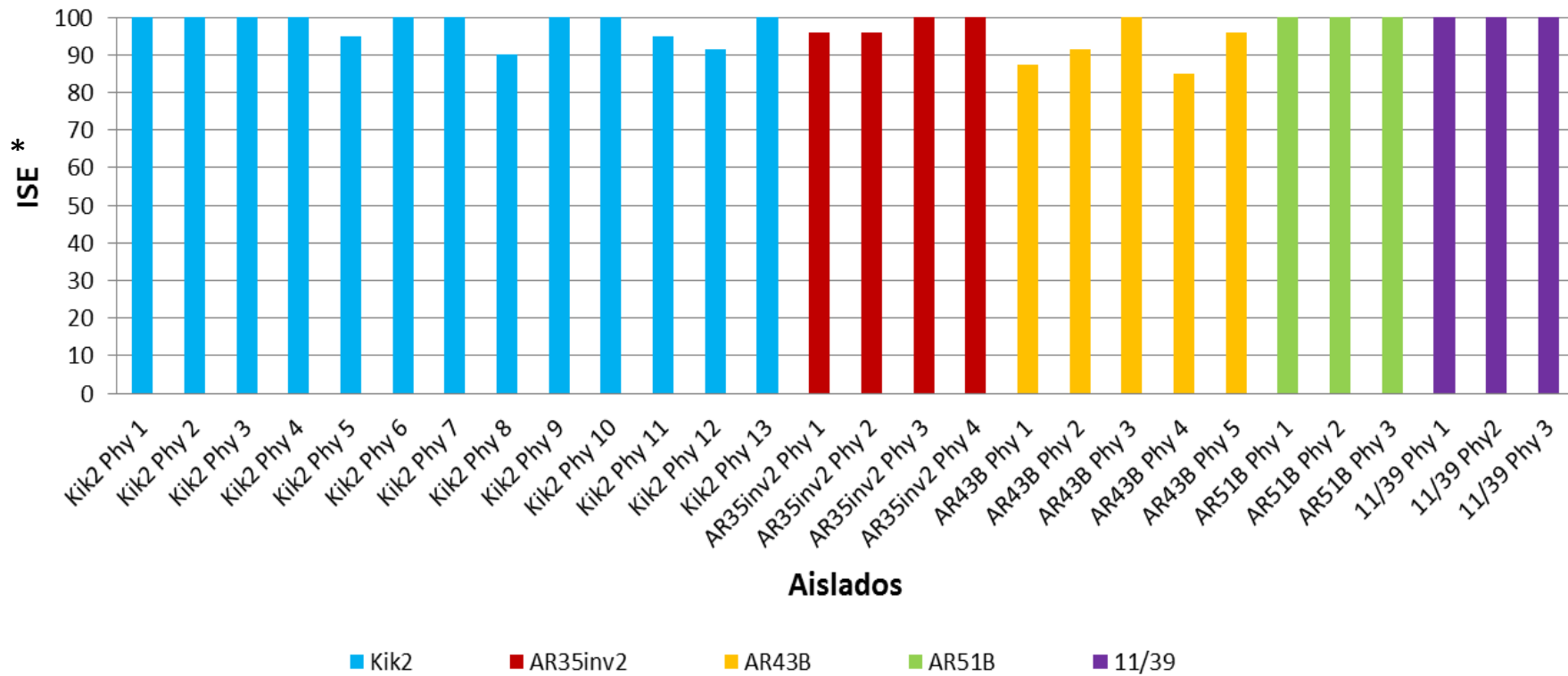


Figura 5: Patogeneidad (*Índice de gravedad de la enfermedad, ISE) de aislados de *P. parasitica* obtenidos de suelos cultivados con tomate y conservados en laboratorio durante 8 y 9 años.

3.3.2. Ensayo en invernadero

El cuadro 9 y la figura 6 muestran una diferencia marcada en lo que concierne a la expresión del poder patógeno en invernadero y con un sustrato diferente. Las diferencias son muy aparentes y sugieren varios comentarios, especialmente cuando la bibliografía sobre el tema es mas bien escasa.

En este ensayo, no todas las plantas de tomate fueron afectadas por *P. parasitica*. Un 53,57% de los aislados parasitaron a las plantas pero nunca llegó a provocar la muerte completa de las cuatro plantas inoculadas por aislado. Los resultados del ISE, por lo general, están entrono al 50% o por debajo de este valor. Al igual que el ensayo en cámara, las plantas de pimiento no mostraron síntomas.



Fotos 20 y 21: Expresión del poder patógeno en plantas de tomate.

Cuadro 9: Expresión del poder patógeno sobre tomate y pimiento de aislados de *P. parasitica* obtenidos de suelos y sustratos conservados durante 8 y 9 años en laboratorio.

Código aislado	Tomate				Pimiento			
	% Plantas muertas	N° Plantas con síntomas	ISE	Reaisl.	% Plantas muertas	N° Plantas con síntomas	ISE	Reaisl.
Kik2 Phy 1	50	1 ^a (0) ^b -1(2)-2(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 2	0	3(0)-1(2)	12,5	-	0	4(0)	0	+
Kik2 Phy 3	25	1(0)-2(3)-1(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 4	25	1(0)-2(3)-1(4)	62,5	-	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 5	75	1(3)-3(4)	93,75	+	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 6	0	2(0)-2(3)	37,5	-	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 7	50	1(0)-1(2)-2(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 8	25	1(0)-2(3)-1(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 9	0	4(2)	50	-	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 10	25	2(0)-2(4)	25	-	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 11	25	2(0)-2(4)	25	+	0	4(0)	0	+
Kik2 Phy 12	25	1(2)-1(3)-2(4)	56,25	+	0	4(0)	0	-
Kik2 Phy 13	50	2(0)-2(4)	50	+	0	4(0)	0	-
AR35inv2 Phy 1	0	3(0)-1(2)	12,5	-	0	4(0)	0	-
AR35inv2 Phy 2	0	3(0)-1(2)	12,5	-	0	4(0)	0	-
AR35inv2 Phy 3	25	2(2)-2(4)	50	+	0	4(0)	0	-
AR35inv2 Phy 4	50	1(0)-1(2)-2(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
AR43B Phy 1	0	4(0)	0	+	0	4(0)	0	+
AR43B Phy 2	25	1(0)-2(3)-1(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
AR43B Phy 3	25	1(0)-2(3)-1(4)	62,5	+	0	4(0)	0	-
AR43B Phy 4	0	1(1)-1(2)-2(3)	56,25	+	0	4(0)	0	-
AR43B Phy 5	0	1(0)-2(2)-1(3)	43,75	-	0	4(0)	0	-
AR51 B Phy 1	75	1(2)-3(4)	87,5	+	0	4(0)	0	-
AR51 B Phy 2	0	1(1)-1(2)-2(3)	56,25	+	0	4(0)	0	-
AR51 B Phy 3	0	1(0)-1(1)-1(2)-1(3)	37,5	-	0	4(0)	0	-
11/39 Phy 1	0	1(0)-1(1)-1(2)-1(3)	37,5	-	0	4(0)	0	-
11/39 Phy2	0	4(2)	50	-	0	4(0)	0	-
11/39 Phy 3	0	4(2)	50	+	0	4(0)	0	-
Testigo	0	4(0)	0	-	0	4(0)	0	-

ISE: índice de gravedad de la enfermedad.

a: n° Planta con síntoma, b: (n° escala del ISE).

(+), presencia de *Phytophthora*. (-), ausencia de *Phytophthora*

Reaisl.:reaislamiento.

Lo que concierne al reaislamiento del oomiceto en el ensayo de invernadero, no todas las macetas estudiadas de tomate dieron positivo como ocurrió en cámara. Referente a las plantas de tomate, se han obtenido datos no interpretables ya que ha dado reaislamiento negativo en plantas donde sí se encontraron síntomas o incluso murieron. Para las plantas de pimiento, generalmente se encontraron datos negativos pero en 3 de las macetas sí se pudo reaislar *P. parasitica* pero sin embargo, no hubo síntomas en ninguna de las plantas de pimiento. Estadísticamente, no existen diferencias significativas entre los aislados de las cinco muestras de suelo con respecto al porcentaje de plantas muertas y el ISE (cuadro 10). Aquí se apoya lo comentado en la discusión del apartado de conservación sobre la fiabilidad del método de las trampas vegetales de pétalos de clavel.

Cuadro 10: Diferencias estadísticas de patogeneicidad entre los aislados inoculados en plantas de tomate.

Muestras suelo	%Plantas muertas	ISE
AR43B	10±13,69	45±26,29
AR35inv2	18,75±23,94	34,38±25,77
Kik2	28,85±22,47	50,96±21,48
AR51B	25±43,30	60,42±25,26
11/39	0±0	45,83±7,22
P-valor	0,2138	0,5950

El análisis de la varianza y el test de diferencias significativas proceden de la transformación angular ($\arcsen(\sqrt{\%})$); siendo $\%1 = (\% \text{ de plantas muertas o ISE})/100$. Test de mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD). Las diferentes letras indican diferencia significativa al 95%.

El desarrollo de la enfermedad en el caso del invernadero ha sido claramente más lento y menos acentuado que el ensayo en cámara. Puede deberse a las condiciones ambientales presentes. Como ya sabemos, *Phytophthora* se desarrolla y crece a mayor velocidad en suelos con gran cantidad de agua donde las esporas nadadoras tienen más facilidad de movilidad y dispersión. Problemente la cantidad de agua aplicada para el riego de las plantas de invernadero no era la suficiente para que el oomiceto se desarrollara y creciera a gran velocidad. El hecho de que existan periodos de sequedad del sustrato, retrasa el desarrollo del oomiceto llegando incluso a su pérdida o transformación en forma de resistencia. Otros factores que influyeron fueron los contrastes de temperaturas a lo largo del día y la noche, siendo las temperaturas bajas un factor limitante para el crecimiento del oomiceto; la influencia del viento, que ayuda a la evaporación del agua en el sustrato y por lo tanto a la

sequedad de este y el periodo de luz incidente. Además, la supresividad del sustrato es un factor presente por la que los patógenos no son capaces de instalarse o de expresarse a pesar de la presencia de cultivos susceptibles y de condiciones ambientales favorables para la manifestación de enfermedades. La supresividad natural de los suelos y sustratos pueden tener naturaleza química como la proporción de lignina/celulosa, la concentración en micronutrientes, la nutrición nitrogenada, el pH del sustrato, el grado de descomposición de la materia orgánica, los compuestos fitotóxicos y salinidad; naturaleza biológica como la fungistasis, parasitismo y antibiosis; o física como la capacidad de aireación y el contenido de humedad del sustrato. Según Hoitink y Fahy (1986), la responsable más frecuente del carácter supresivo de los mismos es la microbiota presente en los compost.

Tomate-Inoculación por riego-Invernadero

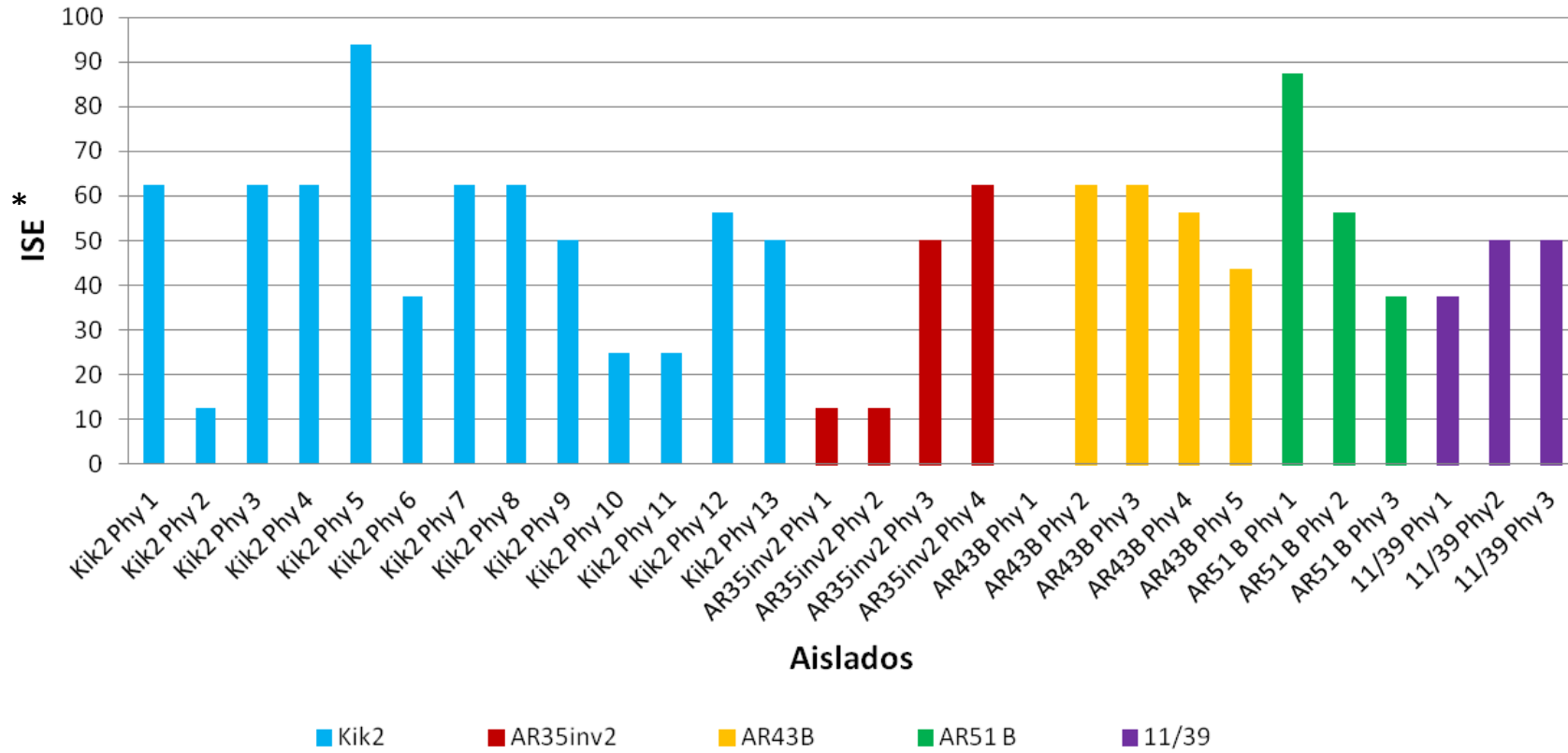


Figura 6: Patogenicidad (*Índice de gravedad de la enfermedad, ISE) de aislados de *P. parasitica* obtenidos de suelos cultivados con tomate y conservados en laboratorio durante 8 y 9 años.

Se observó durante el ensayo que las plantas de tomate que murieron, lo hicieron en las primeras semanas después de la inoculación, donde las plantas eran más jóvenes y sus sistemas radiculares se encontraban poco desarrollados en sus respectivas macetas, es decir, en un estado de mayor debilidad de la planta. Esta observación nos podría decir que quizás con el trasplante de plántulas de mayor tamaño, lo que se conoce como “big plant” también comercializada por semilleros, la planta pudiera ser menos afectada por *P. parasitica*, así que otro posible estudio relacionado a este proyecto sería el inóculo de estas cepas en plantas “big plant”. MORALES RODRIGEZ observó en su estudio que las plantas de pimiento en un estado de desarrollo temprano (2-4 hojas verdaderas) muestran una mayor susceptibilidad al ataque de *P. nicotianae* que las plantas con 6-8 ó 10-12 hojas verdaderas, existiendo una resistencia relacionada con la edad.

CONCLUSION

Una parte de este trabajo es continuación de otros iniciados hace 9 años: la conservación de *Phytophthora parasitica* en muestras de suelo mantenidas en laboratorio desde hace 9 años. ¡Y, todavía, en el 4% de las muestras sigue aislándose el fomiceto!. Esto aporta una novedad no registrada en la bibliografía consultada, y nos advierte de lo que puede significar una rotación de cultivos para disminuir la presencia del patógeno en el suelo.

La novedad más llamativa radica en el conocimiento de los tipos sexuales del parásito, manifestando en una de las muestras los dos tipos de compatibilidad genética además de mostrar homotalismo garantizando la perpetuación de la especie y una posible inducción a una variabilidad en la descendencia importante. Aunque su menor patogeneicidad comparada con el resto de las muestras hace reflexionar si el homotalismo está relacionado con una disminución de la patogeneicidad o sencillamente la coexistencia de los dos tipos de compatibilidad, en este caso, generaron descendencia menos patógena.

Se trata de una variabilidad que podría incidir en la especificidad parasitaria. Especificidad que ha sido neta sobre tomate en los dos ensayos de inoculación y que debería orientar a los mejoradores de plantas.

4. BIBLIOGRAFÍA

ALLAGUI, M. B., LEPOIVRE, P. 2000. Molecular and pathogenicity characteristics of *Phytophthora nicotianae* responsible for root necrosis and wilting of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Tunisia. Eur. J. Plant Pathol, 106:887-894.

ANDRÉS, J.L., RIVERA, A., FERNÁNDEZ, J. 2006. Virulence of Spanish *Phytophthora nicotianae* isolates towards *Capsicum annuum* germplams and pathogenicity towards *Lycopersicon esculentum*. Spain. J. Agric. Res. 4 (3):248-254.

ANDRIVON, D. 1995. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. Phytopathology 85:1053-1056.

ANSANI, C.V., AND MATSUOKA, K. 1983. Sobrevivencia de *Phytophthora capsici* no solo (Survival of *Phytophthora capsici* in soil). Fitopatol. Bras. 8:269-276. (In Portuguese). (Rev. Plant Pathol. 1984, 63:4205).

APPLE, J.L. 1957. Pathogenic, cultural and physiological variation within *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Phytopathology, 47:733-740.

ASHBY, S.F. 1928. The oospores of *Phytophthora nicotianae* Br. De Haan, with notes on the taxonomy of *P. parasitica* Dastur. Trans. Br. Mycol. Soc. 13:86-95. (Cited in Tucker 1933).

BAIN, H.F. AND DEEMARE, J.B. 1945. Red stele root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae*. J. Agric. Res. 70:11-30.

BARTUAL, R., MARSAL, J.I., CARBONELL, E.A., TELLO, J.C., CAMPOS, T. 1991. Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* León. en pimiento. Bol. San. Veg. Plagas, 17:3-124.

BASU, P.K. 1980. Production of chlamidospores of *Phytophthora megasperma* and their possible role in primary infection and survival in soil. Can. J. Plant Pathol. 2:70-75.

BLACKWELL, E. (1949). Terminology in *Phytophthora*. Commonw. Mycol. Instit. Mycol. Pap., No. 30, 24 pp.

BOCCAS, B. 1978. La reproduction sexuelle chez les *Phytophthora*. Ses voies et quelques unes ses conséquences génétiques. Thèse docteur es Sciences Naturelles. Université Paris-Sud. France.

BOCCAS, B., ZENTMYER, G.A. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *P. parasitica*. Phytopathology, 66:79-85.

BONNET, P., LACOURT, I., VENARD, P., RICCI, P. 1994. Diversity in pathogenicity to tobacco and in elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica*. J. Phytopathol, 141:25-37.

BONNET, PH., MAÏA, N., TELLO-MARQUINA, J.C. y VENARD, P. 1978. Pouvoir pathogène de *Phytophthora parasitica* (DASTUR): Facteurs de variabilité et notion de Spécialization parasitaire (Pathogenic capacity of *Phytophthora parasitica* (Dastur): Factor son variability and concept of parasite specialization). Ann. Phytopathol., 10:15-29. (In French). 187 pp.

BOUKEMA, I.W. 1983. Inheritance of resistance to foot and root caused by *Phytophthora nicotianae* v. Breda de Haan var. *nicotianae* in tomato (*Lycopersicon* Mill). Euphytica, 32:103-109.

BOWERS, J.H. AND MITCHELL, D.J. 1990. Effect of soil-water matric potential and periodic flooding on mortality of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 80:1447-1450.

BRASIER, C.M. 1972. Observations on the sexual mechanism in *Phytophthora palmivora* and related species. Trans. Br. Mycol. Soc. 58:237-251.

BRASSIER, C.M. 1983. Problems and prospects in *Phytophthora* research. Pages 351-364 in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 392 pp.

BREDA DE HAAN, J. VAN. 1896. De bibitziekte in de Deil tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae* (The root disease in Deil tobacco caused by *Phytophthora nicotianae*). Meded. S. Lands Plantetuin 15. 107 pp. (In Dutch). (Cited in Tucker 1933).

BUMBIERIS, M. 1979. Aspectsof the biology of *Phytophthora cryptogea*. Aust. J. Bot. 27:11-16.

CAMPBELL, C.L., JACOBI, W.R., POWEL, N.T., and MAIN, C.E. 1984. Analisis of disease progression and the randomness of occurrence of infected plants during tobacco blank shank epidemics. Phytopathology 74:230-235.

CAPASSO, R., CRISTINZIO, G., EVIDENTE, A., VISCA, C., FERRANTI P., DEL VECCHIO BLANCO, F., PARENTE, A. 1999. Elicitor 172 from on isolate of *Phytophthora nicotianae* pathogenic to tomato. Phytochemistry, 50 (5):703-709.

COLAS, V., LACOURT, I., RICCI, P., VANLERBERGHE-MASUTTI, F., VENARD, P., POUPET, A., PANABIERES, F. 1998. Diversity of virulence in *Phytophthora parasitica* on tobacco, as reflected by nuclear RFLPs. Phytopathology, 88 (3):205-212.

CRISTINZIO, G. y NOVIELLO, C., 1980. Ricerche sulla specializzazione della *Phytophthora capsici* in Campania. Inf. tore fitopatol. 11-12, 13-15.

DASTUR, J.F. 1913. *Phytophthora parasitica* n. sp., a new disease of the castor oil plant. Mem. Dep. Agric. India, Bot. Ser. 5(4):177-231. (Cited in Tucker 1933).

DE BARY, A. 1876. Researches into the nature of the potato fungus, *Phytophthora infestans*. J.R. Agric. Soc. Engl., Ser. 2. 12:239-269. (Cited in Tucker 1933).

DICK, M.W. 1990. Phylum Oomycota. Pages 661-685 in: Handbook of Protoctista. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman, eds. Jones and Bartlett Pub. Boston.914 pp.

DRENTH, A., JANSSEN, E.M., AND GOVERS, F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. Plant Pathol. 44:86-94.

DUNCAN, J.M. 1980. Persistence of micelium *Phytophthora fragariae* in soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 75:383-387.

DUNCAN, J.M. AND COWAN, J.B. 1980. Effect of temperature and soil moisture content on persistence of infectivity of *Phytophthora fragariae* in naturally infested field soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 75:133-139.

ERWIN, D.C., RIBEIRO, K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS press. St. Paul, Minnesota. USA.562 pp.

FARIS, M.A, SABO, F.E., BARR, D.J.S., LIN, C.S. 1989. The systematics of *Phytophthora sojae* and *P. megaesperma*. Can.J.Bot 67:1442-1447.

FÉLIX, E. L. 1953. Susceptibility to tomato buckeye rot fungus in Tennessee. Phytopathology, 43:290. Abstract.

FRENCH-MONAR, R.D. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Dis.*, 90:345-350.

FRY, W.E. 1982. Principles of Disease Management. Academic Press, New York. 378 pp.

GALINDO, J., GALLEGLY, M.E. 1960. The nature of sexuality in *P. infestans*. Phytopathology, 50:123-128.

GARCÍA RUÍZ, A., TELLO MARQUINA, J.C., AVILÉS GUERRERO, M., ORDOVÁS ASCASO, J. 2009. Fusariosis del clavel. Últimos avances en su control.

GEMAWAT, P.D., AND PRASAD, N. 1964. Further studies on *Phytophthora* blight of *Sesamum*. Indian Phytopathol. 17:273-283.

- GERLACH, W.W., HOITINK, H.A.J. AND SCHMITTHENNER, A.F. 1976. survival and host range of *Phytophthora citrophthora* in Ohio nurseries. *Phytopathology* 66:309-311.
- GISI, U. and MEYER, D. 1973. Ökologische untersuchungen and *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. im Boden mit direkten Beobachtungsmethoden (Research on direct observation of *Phytophthora cactorum* [Leb. et Schroet.] in soil). *Phytopathol. Z.* 76:276-279.
- GODFREY, G.H. 1923. A *Phytophthora* foot rot of rhubarb. *J. Agric. Res.* 23:1-26.
- GOLLIFER, D.E., JACKSON, G.V.H. AND NEWHOOK, F.J. 1980. Survival of inoculum of the leaf blight fungus *Phytophthora colocasiae* infecting taro, *Colocasia esculenta* in the Solomon Islands. *Ann. Appl. Biol.* 94:379-390.
- GREGORY, P.H. 1983. Some mayor epidemics caused by *Phytophthora*. Pages 271-278 in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D.C., BARTNICKI-GARCIA, S. and TSAO, P.H., eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 392pp.
- GROVE, G.G., ELLIS, M. A., MADDEN, L.V. AND SCHMITTHENNER, A.F. 1985. Overwinter survival of *Phytophthora cactorum* in infected strawberry fruit. *Plant Dis.* 69:514-515.
- HALL, G. 1993. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and redescription of the species. *Mycol. Res.* 97:559-574.
- HANSEN, E.M. 1991. Variation in the species of the *Phytophthora megaesperma* Complex. In. Lucas, J.A.R.C., Shattock, D.S., Shaw, L.R., Cooke (eds). *Phytophthora*, 148-163 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- HARRIS, D.C. 1985. Survival of *Phytophthora syringae* oospores in and on apple orchard soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84:358-361.
- HICKMAN, C.J. 1958. *Phytophthora*-Plant destroyer. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41:1-13.
- HIRST, J.M. and STEDMAN, O.J. 1960. The epidemiology of *Phytophthora infestans*. II. The source of inoculum. *Ann. Appl. Biol.* 48:489-517.
- HO, H.H AND JONG, S.C. 1989. *Phytophthora nicotianae* (*P. parasitica*) *Mycotaxon* 35:243-276.

- HO, H.H. 1969. Notes on the behavior of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soil. *Mycologia* 61:835-838.
- HOITINK, H.A.J., FAHY, P.C. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology* 24:93-114.
- HOLDAWAY, B.F. AND TSAO, P.H. 1971. Survival of *Phytophthora parasitica* in soils (Abstr.). *Phytopathology* 61:1321.
- HWANG, S.C. AND KO, W.H. 1978. Biology of chlamydospores, sporangia and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology* 68:726-731.
- IVANTCHEVA-GABROSKA, T. 1958. Resistance of Tobacco varieties to black shank (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*). Ministry of Agriculture and Forests. Plant Prot. Inst. Sofia. Sci. Works. 1:65-103.
- JEFFERS, S.N. AND ALDWINCKLE, H.S. 1987. Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology* 77:1475-1482.
- JEFFERS, S.N. AND ALDWINCKLE, H.S. 1988. *Phytophthora* crown rot of apple trees: Sources of *Phytophthora cactorum* and *P. cambivora* as primary inoculum. *Phytopathology* 78:328-335.
- KALE, G.B. AND PRASAD, N. 1957. *Phytophthora* blight of *Sesamum*. *Indian Phytopathol.* 10:38-47.
- KANNAIYAN, J., RIBEIRO, O.K., ERWIN, D.C., NENÈ, Y.L. 1980. *Phytophthora* blight of pigeon pea in India. *Mycologia.*, 72:169-181.
- KASSABY, F.Y., FAGG, P.C. AND MARKS, G.C. 1977. Survival in, and colonization of mountain forest by *Phytophthora cinnamomi* Rands in eastern Victoria. *Aust. For. Res.* 7:173-183.
- KLOTZ, L.J. AND FAWCETT, H.S. 1939. Isolation of *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 29:290-291.
- KRÖBER, H. 1980. Überdauerung einiger *Phytophthora*-Arten im Boden (Survival of some *Phytophthora* species in soil). *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 87:227-235. (In German).
- KROON, L.P.N.M., BROUWER, H., DE COOK, A.W.A.M., GOVERS, F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytophthora*, 102:348-364.
- KUAN, T.L., ERWIN, D.C. 1980. Formae specialis differentiation of *Phytophthora megaesperma* isolates from soybean and alfalfa. *Phytopathology*, 70:333-338.

- KUSKE, C.R. AND BENSON, D.M. 1983. Overwintering and survival of *Phytophthora parasitica*, causing dieback of rhododendron. *Phytopathology* 73:1192-1196.
- LEONIAN, L.H. 1934. Identification of *Phytophthora* species. W. Va. Univ. Agric. Exp. Stn. Bull. 262. 36 pp.
- LIYANAGE, N.I.S. AND WHEELER, B.E.J. 1991. Survival of *Phytophthora meadii* in Sri Lanka soils. *Plant Pathol.* 38:627-629.
- LUCAS, G.B. 1975. Black shank. Pages 115-141 in: Diseases of Tobacco. Biological Consulting Associates, Raleigh, N.C. 621 pp.
- LUTZ, A. AND MENGE, J.A. 1991. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occur in irrigated citrus groves. *Plant Dis.* 75:173-179.
- MacDONALD, J.D. AND DUNIWAY, J.M., 1979. Use of fluorescent antibodies to study the survival of *Phytophthora megasperma* and *P. cinnamomi* zoospores in soil. *Phytopathology* 69:436-441.
- MACKAY, A., WESTE, G. AND SHARPE, K. 1985. Survival of *Phytophthora cinnamomi* in buried eucalyptus roots. *Phytopathol. Z.* 114:214-223.
- MacKENZIE, D.R., ELLIOTT, V.J., KIDNEY, B.A., KING, E.D., ROGER, M.H. AND THEBERGE, R.L. 1983. Application of modern approaches to the study of the epidemiology of diseases caused by *hytophthora*. Pages 303-313 in: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D.C. ERWIN S., BARTNICKI-GARCIA, AND P.H. TSAO, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 392pp.
- MADDEN, L.V., ELLIS, M. A., GROVE, G.G., REYNOLDS, K.M. AND WILSON, L.L. 1991. Epidemiology and control of leather rot of strawberries. *Plant Dis.* 75:439-446.
- MARGULIS, L., CORLISS, J.O., MELKONIAN, M. AND CHAPMAN, D.J., eds. 1990. Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett Pub. Boston, Mass. 914 pp.
- MARHOLD, K., NICOLSON, D.H., PRADO, J., SILVA, P.C., SKOG, J.E., WIERSEMA, J.H. TURLAND, N.J. 2006. International code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005.

MATHERON, M.E.N. AND MATEJKA, J.C. 1990. Differential virulence of *Phytophthora parasitica* recovered from citrus and other plants to rough lemon and tomato. *Plant Dis.* 74:138-140.

McINTOSH, D.L. 1972. Effects of soil water suction, soil temperature, carbon and nitrogen amendments, and host rootlets on survival in soil of zoospores of *Phytophthora cactorum*. *Can. J. Bot.* 50:269-272.

McINTYRE, J.L., TAYLOR, G.S. 1978. Race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 68:35-38.

McNEIL, J., BARRIE, F.R, BURDET, H.M., DEMOULIN, V., HAWKSWORTH, D.L., MEHROTRA, R.S. 1970. Behavior of zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* and *P. drechsleri* in soil. *Can. J. Bot.* 50:2125-2130.

MEURS, A. 1934. Parasitic stemburn of Deil tobacco. *Phytopathol. Z.* 7:169-185.

MITCHELL, D. J. AND KANNWISCHER-MITCHEL, E. 1983. Relationship of inoculum density of *Phytophthora* species to disease incidence in various hosts. Pages 259-269 in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D.C. ERWIN S., BARTNICKI-GARCIA, and P.H. TSAO, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 392pp.

MONTGOMERIE, I.G. 1977. Red core disease of strawberry. *Hortic. Rev.* No. 5. Scottish Hortic. Res. Inst., Invergowrie, Dundee, U.K.47 pp.

MORALES RODRIGUEZ, M.C. 2011. Caracterización fenotípica y molecular de *Phytophthora nicotianae* (Breda de Haan, 1896) de cultivos de pimiento y tomate de Extremadura. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.220 pp.

PARKER, S.P. 1982. *Synopsis and Classification of Living organisms*. McGraw-Hill Book Co., New York 1166 pp.

PÉREZ VARGAS, M. 2011. Epidemiología y control de *Phytophthora* parasítica en cultivos de tomate y pimiento bajo abrigo en el Sureste Peninsular de España.

PEYRONEL, B. 1920. Un interessante parasita del Lupino non ancora segnalato in Italia, *Blepharospora terrestris* (Sherb.) Peyr. *Atti R. Acad. Lincei, Ser. 5. Rend. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat.* 29. I:194-197. (In Italian). (Cited in Tucker 1933).

PITTIS, J.E. AND SHATTOCK, R.C. 1994. Viability, germination and infection potential of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 43:387-396.

- PRATT, R.G., MITCHELL, J.E. AND WILLIS, D.A. 1975. Resistance and susceptibility to *Phytophthora megasperma* expressed in alfalfa cotyledons. *Phytopathology* 65:365-369.
- PRINSLOO, G.C., PAUER, G.D.C. 1973. Die race 3 oidentifikasie van rasse van *Phytophthora nicotianae* (B. de Haan) *Nicotianae* wat in Suid Afrika voorkom. *Phytophylactica*, 6:217-220.
- RAMARAO, P. AND UMABALA, K. 1982. Survival of *Phytophthora palmivora* in soil. *Indian Phytopathol.* 35:65-67.
- RATTINK, H. 1981. Characteristics and pathogenicity of six isolates from pot plants. *Neth. J. Plant Pathol.* 87:83-90.
- REVEES, R. J. 1975. Behavior of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soiland water regimes. *Soil Biol. Biochem.* 7:19-24.
- RICCI, P., PANABIÉRES, F., BONNET, P., PONCHET, M., DEVERGNE, J.C., MARAIS, A., CARDIN, L., MILAT, M. L., BLEIN, J.P. 1993. Proteinaceous elicitors of plant defense responses. 121-135 pp. En : Mechanisms of plant defense responses. Fritig B; Legrand M. ed. Kluwer Academic Publishers.
- RICCI, P., TRENTIN, F., BONNET, P., VENARD, P., MOUTON-PERRONNET, F., BRUNETEAU, M. 1992. Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathol*, 41:298-307.
- ROBIN, C., GUEST, D. 1994. Characterisation of pathogenicity of *Phytophthora parasitica* isolates by stem and detached-leaf inoculations. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 22:159-166.
- ROSENBAUM, J. 1917. Studies of the genus *Phytophthora*. *J. Agric. Res.* 8:233-276.
- SANSOME, E. 1965. Meiosis in diploid and polyploid sex organs *Phytophthora* and *Achlya*. *Cytologia* 30:103-117.
- SATOUR, M.M., BUTLER, E.E. 1967. A root and crown rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* and *P. parasitica*. *Phytopathology*, 57:510-515.
- SATOUR, M.M., BUTLER, E.E. 1968. Comparative morphological and physiological studies of the progenies from intraspecific matings of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 58:183-192.
- SAVAGE, E.J., CLAYTO, C.W., HUNTER, J.H., BRENNEMAN, J.A., LAVIOLA, C., GALLEGLY, M.E. 1968. Homothallism, heterotallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology*, 58:1004-1021.

SAWADA, K. 1915. Two new species of the genus *Phytophthora* causing diseases of onion and eggplant. Spec. Bull. Agric. Exp. Stn. Govt. Formosa 11:1-139. (In Japanese). (Cited in Ho 1992).

SAWADA, K. 1927. Descriptive catalogue of the Formosan fungi (III). Rep. Dep. Agric. Gov. Res. Inst. Formosa Bull. 27:1-62. (In Japanese). (Rev. Appl. Mycol. 1928, 7:273). (Cited in Tucker 1933).

SAWADA, K. 1942. On the species of the genus *Kawakamia*. Formosan Agric. Rev. 38:351-355. (In Japanese). (Cited in Waterhouse 1970).

SCHUBERT, T.S. AND LEAHY, R.M. 1989. *Phytophthora* blight of *Catharanthus roseus*. Fla. Dep. Agric. Consum. Serv., Plant Pathol. Circ. No. 321:174-175.

SHEA, S.R., GUILLEN, K.J. AND LEPPARD, W.I. 1980. Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm. Sites in the northern jarrah forest of south-western Australia. Prot. Ecol. 2:135-156.

SHERBAKOFF, C.D. 1917. Buckeye rot of tomato fruit. Phytopathology 7:119-129.

SHEW, H.D., BENSON, D.M. AND GRAND L.F. 1979a. A comparison of baits for isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil (Abstr.) Phytopathology 69:532.

SHEW, H.D., BENSON, D.M. AND GRAND, L.F. 1979b. A quantitative soil assay for *Phytophthora cinnamomi* (Abstr.) Phytopathology 69:1045.

SNEH, B. AND McINTOSH, D.L. 1974. Studies on the behavior and survival of *Phytophthora cactorum* in soil. Can. J. Bot. 52:795-802.

SNEH, B. AND KATZ, D.A. 1988. Behaviour of *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* var. in soil, and differences in their tolerance to antimicrobial components of selective media used for isolation of *Phytophthora* spp. J. Phytopathol. 122:208-221.

SPARROW, F.K. 1973. Mastigomycotina (zoosporic fungi). Chapter 4. Pages 61-73 in: The fungi: An Advanced Treatise. Vol. IVb. G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.C. Sussman, eds. Academic Press, New York. 504 pp.

STACK, J.P. AND MILLAR, R.L. 1985c. Relative survival potential of propagules of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Medicaginis*. Phytopathology. 75:1398-1404.

STAMPS, D.J., WATERHOUSE, G.M., NEWHOOK, F.J. AND HALL, G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Commonw. Agric. Bur. Int. Mycol. Pap. 162. 28 pp.

TELLO, J. y LACASA PLASENCIA, A. 2004. Las enfermedades de origen edáfico y su control en los pimentonares del Campo de Cartagena. Una interpretación retrospectiva del sexenio 1979 – 1985. En: Desinfección de Suelos en Invernaderos de Pimiento. II Jornadas sobre alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento de invernadero. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Conserjería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. 11 – 26 pp.

TELLO, J.C., VARÉS, F., LACASA, A. 1991. Análisis de muestras, 39-48. En: Manual de Laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos. M.A.P.A., Madrid, 485 pp.

THOMSON, S.V. AND HINE, R.B. 1972. Atypical sporangium-like structures of *Phytophthora parasitica*. Mycologia 64:457-460.

TISDALE, W.B. 1922. Tobacco diseases in Gadsden County in 1922. Flac. Agric. Exp. Stn. Bull. 166:77-118.

TSAO, P.H. 1969. Studies on the saprophytic behavior of *Phytophthora parasitica* in soil. Proc. 1st Int. Citrus Symp. 3:1221-1230.

TSAO, P.H. 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. Pages 219-236. En: *Phytophthora: It's Biology. Taxonomy, Ecology and Pathology*.

TSAO, P.H., UGALE, R., HOBBS, S. AND FARIH, A. 1980. Control of homothallic oospore formation in *Phytophthora parasitica* by culture manipulations. Trans. Br. Mycol. Soc. 75:153-156.

TUCKER, C.M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. Univ. Missouri. Agric. Exp.Sta.Bull, 153, 208 pp.

TURNER, P.D. 1965. Behavior of *Phytophthora palmivora* in soil. Plant Dis. Rep. 49:135-137.

TURNER, P.D. 1974. Allied pathogens of other crops. Pages 287-300 in: *Phytophthora Diseases of Cocoa*. P.H. Gregory, ed. Longman, London. 348pp.

WATERHOUSE, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de BARY. Mycological papers, 92. CMI. Kew, Surrey. England.

WATERHOUSE, G.M. 1974. *Phytophthora palmivora* and some related species. Pages 51-70 in: *Phytophthora Disease of Cocoa*. P. H. Gregory, ed. Longman, London 336 pp.

WATERHOUSE, G.M. AND WATERSTON, J.M. 1964. *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. Commown. Mycol. Inst. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 34. 2 pp.

WESTE, G. 1983a. *Phytophthora cinnamomi*: The dynamics of chlamidospore formation and survival. Phytopathol. Z. 106:163-176.

WESTE, G. 1983b. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. Pages 237-257 in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Escology, and Pathology*. D.C. ERWIN S., BARTNICKI-GARCIA, and P.H. TSAO, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 392pp.

WESTE, G. AND RUPPIN, P. 1975. Factors affecting the population density of *Phytophthora cinnamomi* in native forest in the Brisbane Ranges, Victoria. Aust. J. Bot. 23:77-85.

WESTE, G. AND VITHANAGE, K. 1979. Survival of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* in several non-sterile, host-free forest soils water potentials. Aust. J. Bot. 27:1-9.

WESTER, R.E., GOTH, R.W. AND DRECHSLER, C. 1966. Overwintering of *Phytophthora phaseoli*. Phytopathology 56:95-97.

ZAN, K. 1962. Activity of *Phytophthora infestans* in soil in relation to tuber infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 45:205-221.

ZENTMYER, G.A. AND MIRCETICH, S.M. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 56:710-712.