

Especies de *Pythium* aisladas de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa

Pythium species isolated from agricultural waters in Culiacán, Sinaloa

Josué Cárdenas-Rodríguez¹ ,
 Felipe Ayala-Tafoya² ,
 Moisés Gilberto Yáñez-
 Juárez^{1*} ,
 Carlos Alfonso López-Orona² ,
 Sergio de Jesús Romero-
 Gómez³ 

¹Área de protección vegetal, Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, AP. 25. CP. 80000. Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

²Área de Horticultura, Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, AP. 25. CP. 80000. Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

³Área de química; Facultad de Química-Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario, Hidalgo s/n Cerro de las Campanas, CP. 76010. Querétaro, Querétaro, México.

*Autor de correspondencia: moisesyj@uas.edu.mx

Artículo científico

Recibido: 27 de agosto 2021

Aceptado: 21 de febrero 2022

Como citar: Cárdenas-Rodríguez J, Ayala-Tafoya F, Yáñez-Juárez MG, López-Orona CA, Romero-Gómez SJ (2022) Especies de *Pythium* aisladas de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 9(1): e3117. DOI: 10.19136/era.a9n1.3117

RESUMEN. Los Oomycetes son un grupo de organismos que alberga géneros y especies destructivas de plantas cultivadas y silvestres. En México, especialmente en el Estado Sinaloa, la información sobre esos organismos y su presencia en aguas superficiales empleadas para el uso agrícola es escasa. Esta investigación se realizó con el objetivo de determinar la presencia de especies del género *Pythium* en aguas empleadas para la irrigación agrícola en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. De septiembre de 2018 a enero de 2019, en 39 puntos de muestreo (presas, ríos, canales y estanques de almacenamiento de agua para uso agrícola), se colocaron trampas flotantes con frutos de pera, empleados como frutos-cebo. De los sitios muestreados, se obtuvieron cinco aislados pertenecientes al género *Pythium*, los cuales fueron identificados mediante características morfológicas, extracción y secuenciación de ácidos nucleicos; además, se determinó su patogenicidad a plantas y frutos de tomate, chile y pepino. Los resultados determinaron la presencia de *Pythium aphanidermatum*, *P. pachycaule* y *P. torulosum*, los cuales resultaron patogénicos a plantas y frutos de tomate, chile y pepino.

Palabras clave: Marchitez prematura, oomycetes, patogenicidad, secuenciación de ADN.

ABSTRACT. Oomycetes are a group of organisms that include destructive genera and species of cultivated and wild plants. In Mexico, especially in the State of Sinaloa, information on these organisms and their presence in surface waters used for agricultural use is scarce. The aim of this study was determining the presence of species of the genus *Pythium* in waters used for agricultural irrigation in the Culiacán Valley, Sinaloa, Mexico. During September 2018 to January 2019, in 39 sampling points (dams, rivers, canals and water storage ponds for agricultural use), floating traps with pear fruits were placed, used as trap fruits. From the sampled sites, five isolates belonging to the genus *Pythium* were obtained, were identified by means of morphological characteristics, extraction and nucleic acid sequencing; in addition, its pathogenicity to plants and fruits of tomato, chili and cucumber was determined. The results obtained determined the presence of *Pythium aphanidermatum*, *P. pachycaule* and *P. torulosum*, which were pathogenic to plants and fruits of tomato, chili and cucumber.

Key words: Premature wilt, oomycetes, pathogenicity, DNA sequencing.

INTRODUCCIÓN

La marchitez prematura o damping off es una enfermedad que se presenta en plántulas, originada por diversos agentes fitopatógenos, se manifiesta con síntomas de estrangulamiento, marchitez, declive del crecimiento y muerte repentina (Vásquez *et al.* 2009, Robledo 2016, Stouvenakers *et al.* 2020). El grupo de organismos denominados oomycetes, acoge especies señaladas como causantes predominantes de la marchitez prematura de plántulas, especialmente las pertenecientes al género *Pythium* (Sweet 2020). Para ese género se han descrito aproximadamente 160 especies cosmopolitas, versátiles y patogénicas (Grijalba y Ridao 2017, Marciulynas *et al.* 2020). La mayoría de especies de *Pythium* son homotéticas y se caracterizan por formar estructuras de origen sexual y asexual; desarrollan micelio hialino con hifas cenocíticas, hinchamientos, oosporas, esporangios globosos o irregulares que liberan zoosporas como fuente de inóculo (Del Castillo *et al.* 2019). Esas zoosporas tienen capacidad de desplazamiento y dispersión a largas distancias en ambientes acuáticos, lo que facilita su obtención con cebos trampa colocados en dichos hábitats (Oudemans 1999, Bush *et al.* 2003, Redekar *et al.* 2020). Algunos ejemplares encontrados en aguas superficiales son: *P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. debaryanum*, *P. deliense*, *P. mamillatum* y *P. ultimum* (Hong y Moorman 2005, Nongnuch *et al.* 2014, Slavov *et al.* 2018). Por otro lado, West *et al.* (2003) señalan que las enfermedades originadas por *Pythium* spp. son comunes y originan pérdidas estimadas en miles de millones de dólares en todo el mundo. Especies como: *P. lularium*, *P. oopapillum*, *P. sylvaticum* y *P. torulosum* causaron pérdidas del 20% en soya y maíz (Zitnick y Nelson 2015, Matthiesen *et al.* 2016) y *P. aphanidermatum* del 75% en plántulas de pepino (Al-Balushi *et al.* 2018, Morris *et al.* 2016). Mientras que en México, *P. aphanidermatum*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare*, *P. ultimum*, *P. splendens*, *P. arrhenomanes* y *P. amazonianum* causan pérdidas económicas en plantas de ornato, alfalfa, frijol, maíz, chile, tomate y aguacate (Vásquez *et al.* 2009, Díaz *et al.* 2011, Martínez *et al.* 2016, Rivera y Fernán-

dez 2017, Ochoa *et al.* 2018, Reyes *et al.* 2018, Velásquez *et al.* 2018).

Por otro lado, la identificación de organismos fitopatógenos convencionalmente se realizaba mediante observación y medición de estructuras vegetativas y de origen sexual o/y asexual, también por observación y comparación mediante el uso de microscopio óptico y claves pictóricas, respectivamente; pero actualmente se sabe que algunas especies comparten características morfológicas, razón por la que su identificación y diagnóstico como agentes fitopatógenos puede resultar erróneo con esas prácticas (Díaz *et al.* 2011). No obstante, técnicas de laboratorio basadas en extracción, amplificación y secuenciación de regiones específicas de ácidos nucleicos, contribuyen a la identificación concreta y eficaz de organismos (Robledo 2016, Trzewik *et al.* 2016).

Por otra parte, con la finalidad de detectar o monitorear oomycetes presentes en agua o suelo, se emplearon frutos, hojas o semillas de diversas especies vegetales, con el propósito de atraer zoosporas que infecten el tejido vegetal y a partir del tejido infectado aislarlos (Bennet y Thines 2020, Frankel *et al.* 2020, Rai y Guest 2020). Debido a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de especies fitopatógenas del género *Pythium* en aguas empleadas para la irrigación agrícola en Culiacán, Sinaloa, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención, purificación y conservación de aislados de *Pythium* spp.

Del 1 de septiembre de 2018 al 20 de febrero de 2019, se recorrió y muestreó en 28 localidades un total de 39 puntos en sitios de almacenamiento y transporte de agua para uso agrícola (Presas, ríos, canales, diques, entre otros) de la red hídrica del municipio de Culiacán, Sinaloa, México. Los sitios (Tabla 1), se localizaron con información sobre fuentes de almacenamiento y distribución de agua de uso agrícola disponible en la Comisión Nacional del Agua.

Trampas flotantes (selladas con cuerdas de polipropileno y poliestireno para permanecer sus-

Tabla 1. Sitios de muestreo, Culiacán, Sinaloa, México.

Localidad	Cuerpo de agua	Coordenadas del punto de muestreo
Presa Adolfo López Mateos	Presa	25° 10' 08" N 107° 26' 10" W
		25° 09' 10" N 107° 26' 11" W
		25° 09' 56" N 107° 26' 30" W
		25° 09' 10" N 107° 26' 11" W
La Presita	Río	25° 09' 56" N 107° 26' 30" W
Empaque Castro	Río	24° 55' 49" N 107° 25' 39" W
El Tamarindo	Río	24° 55' 28" N 107° 31' 59" W
		24° 55' 07" N 107° 33' 32" W
Empaque Valle del sol	Canal de distribución	24° 55' 11" N 107° 32' 57" W
		24° 53' 20" N 107° 29' 17" W
Presa Sanalona	Presa	24° 48' 37" N 107° 08' 11" W
		24° 48' 46" N 107° 08' 14" W
Río Tamazula	Río	24° 48' 49" N 107° 08' 30" W
Río Humaya	Río	24° 49' 00" N 107° 11' 16" W
Jardín Botánico	Estanque	24° 48' 53" N 107° 21' 29" W
		24° 51' 48" N 107° 24' 25" W
Imala	Río	24° 49' 23" N 107° 23' 06" W
Tres Ríos	Río	24° 49' 24" N 107° 23' 04" W
		24° 51' 21" N 107° 13' 11" W
Bellavista	Canal de distribución	24° 48' 43" N 107° 24' 24" W
Bachigualato	Canal de distribución	24° 48' 24" N 107° 24' 33" W
Aguaruto	Canal de distribución	24° 48' 45" N 107° 27' 56" W
Campo Batán	Reservorio agrícola	24° 46' 59" N 107° 26' 48" W
		24° 47' 49" N 107° 30' 24" W
Campo Moroleón	Río	24° 46' 10" N 107° 30' 19" W
Campo Cardenal	Río	24° 45' 40" N 107° 30' 45" W
Dique La Primavera	Dique	24° 41' 14" N 107° 31' 09" W
Estación Hazera	Canal de distribución	24° 45' 10" N 107° 28' 39" W
Estación Enza Zaden	Canal de distribución	24° 43' 48" N 107° 24' 10" W
Estación Monsanto	Canal de distribución	24° 43' 32" N 107° 27' 24" W
Campo Divemex	Canal de distribución	24° 40' 58" N 107° 28' 47" W
Estación US Agriseeds	Canal de distribución	24° 40' 37" N 107° 28' 50" W
Estación Syngenta	Canal de distribución	24° 39' 46" N 107° 26' 58" W
Estación Rijk Zwaan	Canal de distribución	24° 38' 11" N 107° 26' 38" W
Estación Bayer	Canal de distribución	24° 37' 08" N 107° 26' 41" W
Dique Los Becos	Dique	24° 36' 12" N 107° 26' 41" W
Facultad de Agronomía	Canal de distribución	24° 36' 14" N 107° 27' 22" W
		24° 35' 44" N 107° 18' 33" W
		24° 37' 28" N 107° 26' 34" W

pendidas) con dos frutos de peras inocuos, desinfectados con alcohol etílico 96° y libre de lesiones, se colocaron sobre las periferias de cada sitio por 48 h, mientras que frutos desinfectados y sin desinfectar se mantuvieron en condiciones de laboratorio como testigos libres de oomycetes fitopatógenos. La temperatura del agua se registró con la inmersión de un termómetro de mercurio (Thomas -10 - 150 °C) en cada punto de muestreo al momento de la instalación y el retiro de la trampa (entre las 8:00 y 10:00 AM) (Frankel *et al.* 2020). Posteriormente, las trampas colectadas se transportaron al laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Los frutos

se extrajeron y bajo observación se logró identificar síntomas de infección (lesiones de color café). Los frutos lesionados fueron lavados con agua destilada estéril y desinfectados con alcohol etílico 96°. De cada fruto, se tomaron aleatoriamente cinco cortes de pericarpio infectado de 1 cm² de diámetro y 5 mm de profundidad. El tejido vegetal enfermo se depositó sobre cajas Petri con medio de cultivo PARR, para lo cual se empleó como base el medio Harina de maíz Agar (HMA, BD Difco) 17 g L⁻¹ de agua destilada estéril, al cual se le agregaron: 200, 25, 10 y 10 µg L⁻¹ de ampicilina, pentacloronitrobenzeno, penicilina y rifampicina, respectivamente (Jeffers y Martin 1986, Soto *et al.* 2017) y se incubaron a temperatura am-

biente (27 ± 2 °C) por 48 h. Posteriormente, cultivos puros se obtuvieron con transferencias hifales individuales (técnica de punta de hifa) sobre placas con medio de cultivo HMA incubadas por 48 h a temperatura ambiente. Una vez obtenido el aislado y con la finalidad de conservación, se efectuaron cinco cortes de 0.5 cm de diámetro con sacabocados sobre las colonias puras activas, y se colocaron en tubos eppendorf con 5 mL de agua destilada estéril. Los tubos se almacenaron en una incubadora a 15 °C para posteriores estudios de laboratorio (Jeffers y Martin 1986, Martin *et al.* 2012, Soto *et al.* 2017).

Características morfológicas

Los estudios de morfología se realizaron a partir de las cepas almacenadas. Crecimiento micelial de 48 h se colocó de forma individual sobre cajas Petri con los medios de cultivo HMA o V8-agar (agua destilada 800 mL, jugo V8 200 mL, CaCO_3 2 g L^{-1} y agar 15 g L^{-1}), una vez que el organismo llenó por completo la superficie de la caja, se agregó agua destilada estéril; las cajas con crecimiento de los organismos se conservaron en condiciones ambientales de laboratorio (27 ± 2 °C) durante cinco días para inducir el crecimiento y la reproducción de estructuras sexuales y asexuales de los organismos (Jeffers y Martin 1986, Martin *et al.* 2012, Soto *et al.* 2017). Adicionalmente y con la finalidad de inducir la formación de estructuras de reproducción, cilindros de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo y crecimiento micelial de 48 h se colocaron en cajas de Petri que contenían agua destilada estéril. Un microscopio óptico (Leica DM100), se utilizó para observar y caracterizar la morfología de cada aislado. La inducción al crecimiento y reproducción de los aislados fue realizado en tres diferentes ocasiones con cinco replicas cada uno.

Identificación molecular

La extracción de ADN genómico se realizó con el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) propuesto por Doyle (1990), al cual se le realizó modificaciones con la finalidad de optimizar la extracción y pureza de ADN. Inicialmente se procedió a desarrollar cepas sobre medio de cultivo

Papa Dextrosa Agar (PDA, 39 g L^{-1} de agua destilada estéril), cinco días después se colectaron 100-200 mg de micelio con una punta esterilizada y se depositaron en morteros individuales que contenía nitrógeno líquido; se maceró el micelio congelado hasta obtener polvo fino. El polvo de cada muestra se colocó en microtubos fríos, posteriormente se añadió 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, TRISH-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, β -mercaptoetanol 2%) a cada tubo. Se utilizó un vortex para homogenizar el contenido de los tubos durante un minuto. Los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min. El sobrenadante se recuperó, se transfirió a tubos eppendorf nuevos y se homogenizaron con 1 mL de alcohol cloroformo-isoamílico (49:1). Las muestras se centrifugaron por 10 min. Se recuperó la fase acuosa, cuidando de no perturbar la interface, y se transfirió a nuevos tubos eppendorf para mezclarse con 100 μL de acetato de sodio 3M y 1 mL de alcohol isopropílico, se incubaron a -20 °C por 20 min. Los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min, la fase líquida se decantó cuidando de no perturbar la pastilla de DNA. A los tubos se les añadió 1 mL de etanol y se centrifugaron por 3 min. La fase acuosa se eliminó sin perturbar la fase sólida, los tubos se colocaron 10 min boca abajo a temperatura ambiente para la eliminar los restos líquidos, la pastilla de ADN se disolvió en 50 μL de buffer TE. La concentración del ADN se midió por NANODROP a 260 nM, su calidad se determinó con una proporción 280/260 y la integridad se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 0.8% con solución amortiguadora 1X TAE.

Amplificación, purificación y secuenciación del ADN

La mezcla de PCR se preparó con 2.5 μL de buffer específico para la Taq (10X), 1.25 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL de mezcla de DNTP's (200 mM), 0.625 μL de cada primer individual (0.25 μM) (tabla 2), 1 μL de ADN (50 ng μL^{-1}), 0.25 μL de Taq ADN polimerasa (5 UI mL^{-1}), todo se disolvió en agua de grado molecular suficiente para completar el volumen total de 25 μL . El ADN se amplificó con un termociclador (Bio rad T100). Condiciones utilizadas en el

termociclador: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg a ITS (60 seg COX y NADH), alineamiento por 30 seg, extensión a 72 °C por 60 seg y extensión final 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento fue de 62 °C para ITS, 52 °C para COX y 53 °C para NADH. La amplificación se verificó con el gel de electroforesis. La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit wizard SV Gel and PCR CleanUp System (Promega, USA). Las dos cadenas del amplicón fueron enviadas para ser secuenciadas en Macrogen, Korea. Las secuencias se compararon en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology information (NCBI 1988).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de ADN de *Pythium* spp.

Primer	Secuencia de primer	Tamaño (pb)
ITS4C0569	TCCTCCGCTTATTGATATGC	930
ITS6C0570	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	
COXF4N	GTATTTCTTCTTTATTAGGTG	972
COXR4N	CGTGAAGTAATGTTACATATAC	
NADHF1	CTGTGGCTTATTTACTTTAG	897
NADHR1	CAGCAGTATACAAAAGCAAC	

El árbol filogenético y el historial evolutivo se construyeron partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei 1993), utilizando 848 pares de bases correspondientes al espacio transcrito del ADNr (los gaps/missing se consideraron como deleciones completas) y con la máxima verosimilitud posible. La búsqueda heurística se aplicó automáticamente con los algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ para emparejar las distancias estimadas utilizando el modelo de Tamura-Nei y después seleccionar el valor de máxima topología posible. Para establecer los valores de confianza entre las agrupaciones del árbol resultante, se utilizaron 1000 bootstraps. Este análisis filogenético se realizó empleando el software MEGA X (Kumar *et al.* 2018).

Pruebas de patogenicidad

La actividad patogénica de los aislados se comprobó mediante la inoculación de plántulas y frutos de tomate saladette cv SV-3543, chile bell cv Caravaggio y pepino tipo slicer cv Luxell.

Obtención de plántulas

Las semillas de cada especie (tomate, chile y pepino) se sembraron por separado en charolas de poliestireno con 256 cavidades y sustrato peat moss (Berger), se regaron y condujeron bajo condiciones de invernadero. La emergencia de plántulas ocurrió siete días después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a macetas plásticas con capacidad de 2 kg con sustrato peat moss 15 días después de la emergencia. Los riegos se efectuaron todos los días y se fertilizó cada tres días con una mezcla de agua más fertilizante Maxi-grow[®] Excel (COSMOCEL, composición porcentual g L⁻¹: extractos orgánicos 112, auxinas 0.09, giberelinas 0.10, citoquininas 1.5, nitrógeno 6.6, fósforo 13.3, potasio 13.3, calcio 2.0, magnesio 4.0, hierro 17.2, zinc 26.5, manganeso 13.3 y cobre 13.3).

Inoculación de plantas y frutos

Los aislados se transfirieron de forma individual a cajas Petri con medio de cultivo PARP y se incubaron por 10 días. Transcurridos 25 días después del trasplante, la inoculación se realizó mediante un cilindro de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo y crecimiento de micelio, colocado en la base del tallo en cada plántula inoculada (para el caso de plántulas testigo se colocó sólo cilindro con medio de cultivo sin crecimiento de patógeno). El inóculo se cubrió con sustrato para evitar su degradación. Cinco días después de la inoculación, los riegos se efectuaron con mayor intensidad con el propósito de favorecer la infección del patógeno. La actividad patogénica de los aislados se determinó 20 días después de la inoculación mediante observación para lo cual, se empleó la escala propuesta por Molina *et al.* (2010) donde: 0 = sin síntomas, 1 = ligera marchitez o ligero daño en tallo, 2 = severa marchitez o severo daño en tallo y 3 = muerte de planta.

Con la finalidad de demostrar que los organismos inoculados fueron patogénicos, se realizaron postulados de Koch, para lo cual, muestras individuales de tejido enfermo de las plantas inoculadas con los aislados fueron transferidos a cajas de Petri con medio de cultivo (PARP) y permanecieron a temperatura ambiente (25 a 32 °C).

La actividad patogénica de los aislados en frutos se comprobó mediante frutos inocuos, inmaduros, de tomate, chile y pepino. Previa a la inoculación de los aislados, los frutos fueron lavados con agua destilada estéril y desinfectados con etanol de 70°. Cada fruto se inoculó con cilindros de 0.5 cm de diámetro, con medio de cultivo y crecimiento micelial (para el caso de frutos testigo se colocó sólo cilindro con medio de cultivo sin crecimiento de patógeno); los frutos inoculados, se colocaron dentro de cámaras húmedas, elaboradas con recipientes de plástico y algodón humedecido con agua destilada estéril. La severidad se determinó a las 48 h después de la inoculación, con base a la cantidad de tejido dañado por el patógeno (diámetro promedio de tejido dañado). Las pruebas de patogenicidad se establecieron en un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones y su respectivo tratamiento control. Las pruebas de patogenicidad se establecieron en cámara de incubación con temperatura que fluctuó de 25 a 32 °C y humedad relativa del 100%. Concluidas las evaluaciones, del tejido enfermo en las plantas inoculadas se reaislaron los organismos para comprobar su patogenicidad mediante los postulados de Koch.

Los datos de ambas pruebas patogénicas se procesaron con el software INFOSTAT, y se realizó prueba de normalidad y homogeneidad de los datos para posteriormente analizarlos mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey $P \geq 0.05$).

RESULTADOS

La temperatura promedio del agua entre los 5 y 10 cm de profundidad, al momento de la instalación de las trampas osciló de 21 a 32 °C, mientras que al momento del retiro osciló de 20 y 33 °C. Las temperaturas más bajas se registraron durante el mes de diciembre con $20 \pm 1^\circ\text{C}$; mientras que las temperaturas más altas se registraron en septiembre $33 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 1).

En total se obtuvieron 107 aislados de oomycetes, pero sólo cinco aislados (Tabla 3) mostraron características morfológicas

pertenecientes al género *Pythium* como: micelio hialino, cenocítico, esporangios lobulados terminales, intercalares y presencia de oosporas apleróticas (Figura 2). El análisis de algunas características morfológicas determinó que los aislados colectados del género *Pythium* mostraron micelio hialino y cenocítico, esporangios lobulados terminales e intercalares, presencia de oosporas apleróticas, las cuales se observaron en los aislados: EC17, JB56 y PP106 (Figura 2).

Las secuencias propias de cada aislado se compararon con secuencias depositadas del GenBank. El análisis por BLAST del NCBI, mostró 99.8% de similitud a *Pythium aphanidermatum* para las secuencias de los aislados EC17, JB56 y PP106 (número de acceso MW488307, MW486431 y MT232874, respectivamente), de 98.0% a *P. pachycaule* para el aislado PV1 (número de acceso MT261893) y de 98.0% de similitud a *P. torulosum* para el aislado PS1 (número de acceso MT232848).

El árbol filogenético creado (Figura 3), permitió observar la relación estrecha que existe entre las secuencias obtenidas con otras de distintas regiones. Ese árbol separó diferentes clados con las especies del género *Pythium*: el clado I, incluyó al aislado PV1 que corresponde a *P. pachycaule*; en el clado II al aislado PS1 de *P. torulosum* y el clado III incluyó los aislados EC17, JB56 y PP106 de *P. aphanidermatum*.

Los cinco aislados de *Pythium* fueron patogénicos en plántulas de tres semanas de edad (Tabla 4). La severidad en plantas de tomate y chile originada por *P. aphanidermatum* (aislados PP106, JB56 y EC17) fue significativamente superior ($P \geq 0.05$) a la originada por *P. torulosum* (aislado PS1), y semejante a la originada por *P. pachycaule* (aislado PV1). En contraste, la severidad inducida por los cinco aislados en plantas de pepino fue estadísticamente igual. La Figura 4 muestra el daño originado por el aislado EC17 (*P. aphanidermatum*) sobre plántulas de tomate, chile y pepino.

En frutos, todos los aislados de *Pythium* fueron patogénicos (Tabla 5). La severidad en frutos de tomate, chile y pepino originada por los tres aislados de *P. aphanidermatum* (aislados PP106, JB56 y EC17) fue estadísticamente igual ($P \geq 0.05$). En tanto que,

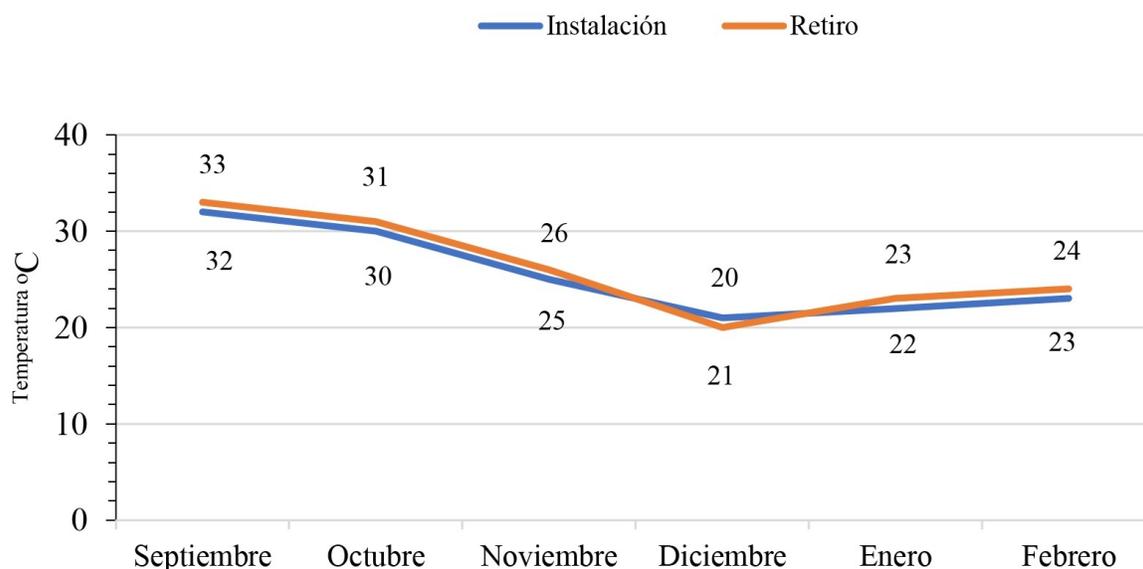


Figura 1. Temperatura promedio ($\pm 1^\circ\text{C}$) del agua en 39 puntos de muestreo en el periodo 1 de septiembre de 2018 al 20 de febrero de 2019. Culiacán Sinaloa, México.

Tabla 3. Localidad y coordenadas de sitios de muestreo donde se obtuvieron aislados del género *Pythium*.

Nombre de aislado	Localidad	Coordenadas del punto de muestreo
EC17	Empaque Castro	24° 55' 28" N 107° 31' 59" W
JB56	Jardín Botánico	24° 49' 23" N 107° 23' 06" W
PP106	Facultad de Agronomía	24° 37' 28" N 107° 26' 34" W
PV1	Presa Adolfo López Mateos	25° 10' 08" N 107° 26' 10" W
PS33	Presa Sanalona	24° 48' 46" N 107° 08' 14" W



Figura 2. Características morfológicas de *Pythium* spp. a) esporangios lobulados (EC17); b) oosporas apaléroticas, anteridio intercalar (aislado JB56) y c) grupo de oosporas en tejido de pepino (aislado PP106).

con *P. pachycaule* (aislado PV1) la severidad fue significativamente inferior en frutos de tomate con el aislado JB56. Para *P. torulosum* (aislado PS1), la severidad fue estadísticamente igual a la originada

por *P. pachycaule* y *P. aphanidermatum*, excepto en frutos de tomate con el aislado JB56, y en frutos de chile y pepino con el aislado EC17.

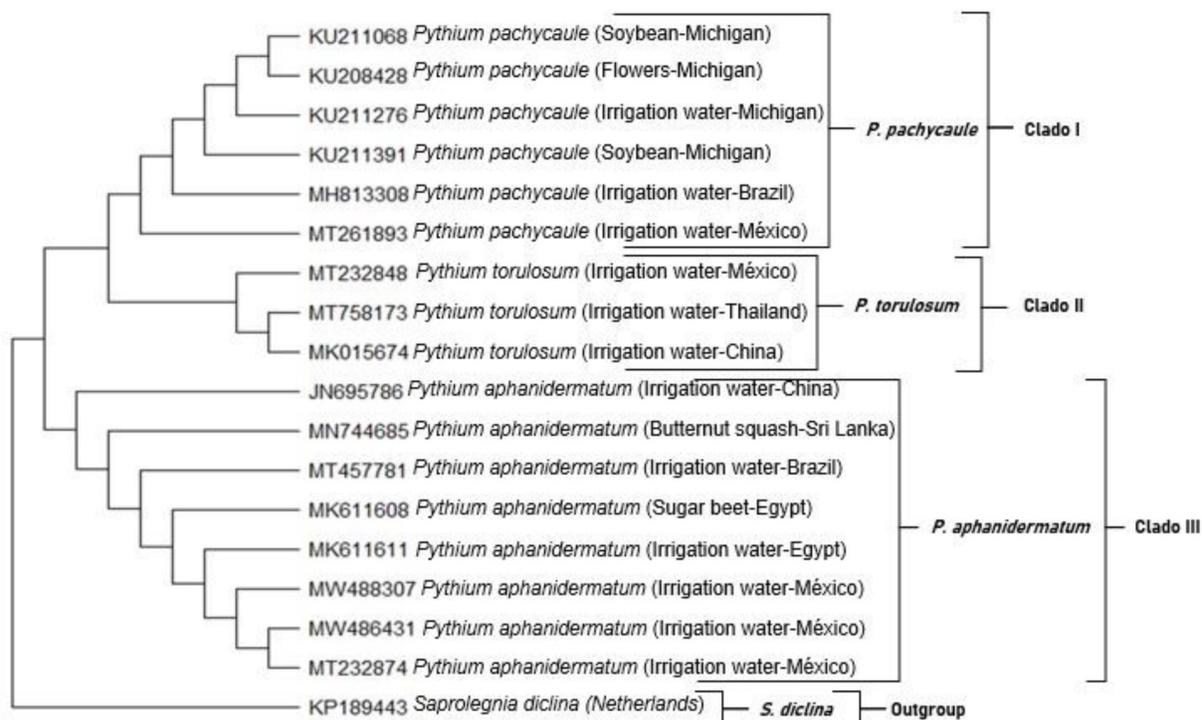


Figura 3. Árbol filogenético resultante de las especies de *Pythium* elaborado con el método de máxima verosimilitud. Los aislados colectados de agua de uso agrícola en el Culiacán, Sinaloa, están marcados con la leyenda de "Irrigation water-México". Los aislados pertenecen a *P. aphanidermatum* (número de acceso MW488307-EC17, MW486431-JB56 y MT232874-PP106); *P. pachycaule* (número de acceso MT261893-PV1) y *P. torulosum* (número de acceso MT232848-PS1). Como secuencia outgroup se colocó a *Saprolegnia diclina*.

Tabla 4. Severidad del daño en plántulas de tomate, chile y pepino originada por cinco aislados de *Pythium* sp. obtenidos de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.

Aislado	Especie	Tomate	Chile	Pepino
PS1	<i>P. torulosum</i>	1.5 ^{a*}	1.5 ^a	2.5 ^a
PV1	<i>P. pachycaule</i>	1.8 ^{ab}	2.0 ^{ab}	1.8 ^a
PP106	<i>P. aphanidermatum</i>	3.0 ^b	3.0 ^b	2.3 ^a
JB56	<i>P. aphanidermatum</i>	3.0 ^b	3.0 ^b	3.0 ^a
EC17	<i>P. aphanidermatum</i>	3.0 ^b	3.0 ^b	3.0 ^a

* Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes según Tukey ($P \geq 0.05$).

DISCUSIÓN

Las características morfológicas de micelio, esporangio y oospora registradas, coinciden con lo descrito por Díaz *et al.* (2011), Al-Sheikh y Abdelzahr (2012) y Saelee *et al.* (2021) para *P. aphanidermatum*, *P. pachycaule* y *P. torulosum*. Se ha descrito que las especies *P. pachycaule* y *P. torulosum*, en reproducción sexual forman oosporas apleróticas al i-

gual que *P. aphanidermatum* (Abdelzahr y Kageyama 2020). Pero, es posible que las condiciones en las que se realizó la identificación morfológica no permitieron que esa estructura se formara, no obstante, la secuenciación de los ácidos nucleicos permitió la identificación del género y especie de cada aislado. Lo que es congruente con lo descrito por Díaz *et al.* (2011) quienes señalan que la caracterización morfológica de estos organismos debe complementarse con la molecular, debido a que dentro del mismo género existe la posibilidad de similitud morfológica entre especies (Herrero *et al.* 2020). La identificación morfológica de los aislados se confirmó con los resultados obtenidos de la secuenciación de las regiones ITS, el BLAST del NCBI y por la construcción del árbol filogenético. Por otro lado, las especies *P. aphanidermatum*, *P. torulosum* y *P. pachycaule* se han encontrado en ambientes acuáticos con temperaturas entre 30 y



Figura 4. Pruebas de patogenicidad, izquierda plantas testigo, derecha plantas inoculadas con *P. aphanidermatum* aislado EC17: a) plántulas de tomate, b) plántulas de chile y c) plántulas de pepino.

40 °C (Choudhary *et al.* 2016, Kachour *et al.* 2016, Salmaninezhad y Ghalamfarsa 2019), lo cual es congruente con las condiciones en las que se realizó el presente trabajo.

Tabla 5. Severidad en frutos de tomate, chile y pepino originada por cinco aislados de *Pythium* spp. obtenidos de aguas para el uso agrícola en Culiacán, Sinaloa.

Aislado	Especie	Tomate	Chile	Pepino
Diámetro (cm)				
PS1	<i>P. torulosum</i>	4.5 ^{a*}	5.3 ^a	5.0 ^a
PV1	<i>P. pachycaule</i>	4.8 ^a	7.5 ^{ab}	6.3 ^{ab}
PP106	<i>P. aphanidermatum</i>	7.5 ^{ab}	8.5 ^{ab}	5.5 ^{ab}
JB56	<i>P. aphanidermatum</i>	7.5 ^{ab}	8.50 ^{ab}	5.5 ^{ab}
EC17	<i>P. aphanidermatum</i>	7.3 ^{ab}	9.8 ^b	8.5 ^b

*Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes según Tukey ($P \geq 0.05$).

Las tres especies encontradas fueron capaces de infectar tanto plántulas como frutos de tomate, chile y pepino, con diferente severidad de daño en cada especie de planta y con diferencias en el nivel de severidad interespecífica, pero no se presentó dicha diferencia en los aislados de la misma especie.

Tanto *P. aphanidermatum* como *P. pachycaule* y *P. torulosum* son organismos que, en investigaciones previas se han obtenido de aguas de uso agrícola en otras regiones del mundo (Al-Sheikh y Abdelzاهر 2012, Parke *et al.* 2019, Redekar *et al.* 2019, Abdelzاهر y Kageyama 2020). Pero para el

caso de México es la primera vez que se determina la patogenicidad en plantas de interés hortícola de los organismos *P. pachycaule* y *P. torulosum*. Los resultados obtenidos en este estudio morfológico, molecular y de pruebas de patogenicidad en plántulas y frutos de tomate, chile y pepino, permitió confirmar la presencia en aguas de uso agrícola en el valle de Culiacán, Sinaloa, de tres especies fitopatógenas del oomycete *Pythium*, lo que proporciona información que sustenta que el agua de riego debe ser un componente a considerar en la implementación del manejo integrado de enfermedades en plantas de hortalizas susceptibles.

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de los oomycetes *P. aphanidermatum*, *P. torulosum* y *P. pachycaule* en aguas empleadas para el riego agrícola en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Con diferencia interespecífica en el nivel de severidad de la enfermedad. Los aislados de *P. aphanidermatum* originaron la mayor severidad de la enfermedad en plantas y frutos de tomate, chile y pepino. El agua empleada para el riego agrícola constituye un medio de dispersión de oomycetes fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

Abdelzاهر MA, Kageyama K (2020) Diversity of aquatic *Pythium* and *Phytophythium* spp. from rivers and a pond of Gifu city, japan. *Novel Research in Microbiology Journal* 4: 1029-1044.

- Al-Balushi ZM, Agrama H, Al-Mahmooli IH, Maharachchikumbura SS, Al-Sadi AM (2018) Development of Resistance to Hymexazol Among *Pythium* Species in Cucumber Greenhouses in Oman. *Plant Disease* 102: 202-208.
- Al-Sheikh H, Abdelzaher H (2012) Occurrence, identification and pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. diclinum*, *p. gissotocum* and *Pythium* "Group P" isolated from Dawmat AL-JANDAL Lake, Saudi Arabia. *Research Journal of Environmental Sciences* 6: 196-209.
- Bennet RM, Thines M (2020) An overview on Philippine estuarine oomycetes. *Philippine Journal of Systematic Biology* 14: 1-14.
- Bush EA, Hong C, Stromberg EL (2003) Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a recycling irrigation system. *Plant Disease* 87: 1500-1506.
- Choudhary CE, Burgos ML, Moorman GW, Hong C (2016) *Pythium* and *Phytophthora* species in two Pennsylvania greenhouse irrigation water tanks. *Plant Disease* 100: 926-932.
- Del Castillo J, Belayneh B, Ritsvey A, Koivunenb EE, Cox JL, Sweet CL (2019) Enabling adaptation to water scarcity: Identifying and managing root disease risks associated with reducing irrigation inputs in greenhouse crop production - A case study in poinsettia. *Agricultural water management* 20: 1-11.
- Díaz M, Rodríguez G, Silva HV, Pedraza M, Garciglia R, Fernández S (2011) Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 431-443.
- Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *focus* 12: 13-15.
- Frankel SJ, Conforti C, Hillman J, Ingolia M, Shor A, Benner D, Alexander JM, Bernhardt E, Swiecki TJ (2020) *Phytophthora* introductions in restoration areas: responding to protect California native flora from human-assisted pathogen spread. *Forests* 11: 1-21.
- Grijalba PE, Ridaao AC (2017) Control químico de *Pythium* spp. en plántulas de soja. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 43: 67-71.
- Herrero ML, Brurberg MB, Ojeda DI, Roleda MY (2020) Occurrence and pathogenicity of *Pythium* (Oomycota) on *Ulva* species (Chlorophyta) at different salinities. *Algae* 35: 79-89.
- Hong CX, Moorman GW (2005) Plant Pathogens in Irrigation Water: Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 189-208.
- Jeffers SN, Martin SB (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70: 1038-1043.
- Kachour L, Gacemi-Kirane D, Loucif L, Alayat H (2016) First survey of aquatic microbial fungi-like pythiaceae predominantly colonizing the South-Mediterranean Freshwater Wetlands. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 7: 3067-3078.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Marciulynas A, Marciulyniene D, Lynikiene J, Gedminas A, Vaiciukyne M, Menkis A (2020) Fungi and Oomycetes in the irrigation water of forest nurseries. *Forests* 11: 1-16.
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y, Ivors K (2012) Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* 96: 1080-1103.

- Martínez FE, Cervantes L, Aíl CE, Hernández LG, Sánchez CL, Rueda EO (2016) Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal* 12: 232-241.
- Matthiesen RL, Ahmad AA, Robertson AE (2016) Temperature affects aggressiveness and fungicide sensitivity of four *Pythium* spp. that cause soybean and corn damping off in Iowa. *Plant Disease* 100: 583-591.
- Morris KA, Langston DB, Dutta B, Davis RF, Timper P, Noe JP, Dickson DW (2016) Evidence for a Disease Complex Between *Pythium aphanidermatum* and Root-knot Nematodes in Cucumber. *Plant Health Progress* 17: 200-201.
- Molina MC, Morales MC, Osorio C, Núñez E, Verdejo E, Duarte MS, Toro J (2010) Short communication. *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of root and crown rot (Tristeza disease) of red pepper in La Vera region (Cáceres, Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: 770-744.
- NCBI (1988) Sequence Analysis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2020.
- Nongnuch VA, Jidapa SB, Sophit KC, Pritsana SA, Pramote VD, Fisher MC (2014) Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. *International Journal of Medical Microbiology* 304: 321-326.
- Ochoa YM, Hernández A, Delgado JC, Beltrán M, Tapia L, Hernández O, Cerna E (2018) First report of avocado tree wilt by *Pythium* sp. *amazonianum* in México. *Ciencia e Investigación Agraria* 45: 301-305.
- Oudemans PV (1999) *Phytophthora* species associated with cranberry root rot and surface irrigation water in New Jersey. *Plant Disease* 83: 251-258.
- Parke J, Redekar NR, Eberhart JL, Funahashi (2019) Hazard analysis for *Phytophthora* species in container nurseries: Three case studies. *HortTechnology* 29: 745-755.
- Rai GS, Guest DI (2020) Drainage, animal manures and fungicides reduce *Phytophthora* wilt (caused by *Phytophthora capsici*) of chilli (*Capsicum annuum* L.) in Bhutan. *Australasian Plant Pathology* 50: 169-177.
- Redekar NR, Eberhart JL, Parke JL (2019) Diversity of *Phytophthora*, *Pythium*, and 10 *Phytophythium* species in recycled irrigation water in a container nursery. *Phytobiomes* 1: 31-45.
- Redekar NR, Bourret TB, Eberhart JL, Johnson GE, Pitton B JL, Haver DL, Oki LR, Parke JL (2020) The population of oomycetes in a recycled irrigation water system at a horticultural nursery in southern California. *Water Research* 183: 1-39.
- Reyes A, Vallejo R, Santillán R, Rodríguez G, Larsen J, Fernández SP (2018) *Pythium arrhenomanes* causal agent of root rot on yellow maize in México. *Australasian Plant Disease* 13: 6. DOI: 10.1007/s13314-018-0291-8.
- Rivera CH, Fernández S (2017) Técnica de evaluación para damping-off en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) infectado por *Pythium aphanidermatum*. *Tecnociencia* 11: 41-47.
- Robledo DO (2016) Enfermedad de damping-off en plántulas de lechuga: un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias* 13: 680-685.
- Saelee R, Busarakam K, Koohakan P (2021) Caracterización morfológica y filogenia de *Pythium* y géneros relacionados en la provincia de Rayong, Tailandia. *Ciencia y tecnología aplicada actual* 1: 132-153.
- Salmaninezhad F, Ghalamfarsa M (2019) Phenotypic plasticity of the isolates assigned to *Pythium plurisporium*. *Mycologia Iranica* 6: 59-71.

- Slavov S, Lyubenova A, Kostov K, Christova P (2018) Oomycetes from genus *Pythium* found in water and soil samples in Bulgaria. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans* 21: 161-171.
- Soto PA, Rodríguez AG, Fernández YL, Pedraza ME, López PL, Díaz SM, Fernández SP (2017) Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1867-1880.
- Stouvenakers G, Massart S, Depireux P, Jijakli H (2020) Microbial origin of aquaponic water suppressiveness against *Pythium aphanidermatum* lettuce root rot disease. *Microorganisms* 8: 1683 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111683>.
- Sweet CL (2020) Managing crops diseases under water scarcity. *Annual review phytopathology* 58: 387-406.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Trzewik A, Nowak KJ, Orlikowska T (2016) A simple method for extracting DNA from rhododendron plants infected with *Phytophthora* spp. for use in PCR. *Journal of Plant Protection Research* 56: 104-109.
- Vásquez A, Tlapal B, Yáñez J, Pérez R, Quintos M (2009) Etiología de la marchitez del “chile de agua” (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 32: 127-134.
- Velásquez R, Reveles LR, Talavera H (2018) Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 414-422.
- West V, Piete A, Neil A, Neil G (2003) Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular. Plant Pathology* 62: 99-113.
- Zitnick KK, Nelson BD (2015) Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in North Dakota. *Plant Disease* 99: 31-38.