

Phytophthora cinnamomi Rands. pathogenicity tests in *Pseudotsuga mensiezii*

Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*

Alejandra Almaraz-Sánchez¹, Dionicio Alvarado-Rosales^{1*}, Gerardo Leyva-Mir², Armando Equihua-Martínez¹, Sergio Aranda-Ocampo¹ y Javier Hernández-Morales¹. ¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 56230; ²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Estado de México. 56230. Correspondencia*dionicioyganoderma@gmail.com

Recibido: 13 de Octubre de 2015

Aceptado: 05 de Mayo de 2016

Almaraz-Sánchez A, Alvarado-Rosales D, Leyva-Mir G, Equihua-Martínez A, Aranda-Ocampo S y Hernández-Morales J. Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 142-157.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1509-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1509-2)

Primera publicación DOI: 09 de mayo 2016

First DOI publication: May 9th of 2016

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi Rands es un microorganismo del suelo que ha causado grandes pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial, en una amplia gama de hospedantes. Es por esto que se identificó y evaluó la patogenicidad de cinco aislados de *P. cinnamomi*, procedentes de cinco regiones de México, en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*. Los aislados se obtuvieron de suelo, raíz y canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, de El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* de Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* de

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi Rands is a soil microorganism that has caused large economic and environmental losses worldwide in a wide array of hosts. For this reason, *P. cinnamomi* was identified and its pathogenicity was evaluated in five isolations from five different regions in Mexico on *Pseudotsuga mensiezii* plants. The isolations were taken from the soil, roots, and cankers of *Quercus salicifolia* trees, from El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* from Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* from Manántlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* from Edo. de México (EDO-T), and *Persea americana*, defrom Peribán Mich. (MICH-P). Through a morphological analysis on genus and molecular analysis on species (accession number: KP773290, KP773291, KP773292, KP773293, KP773294) the identification of the isolations was corroborated with the molecular analyses that indicate a homology of 99 % identity with *P. cinnamomi*. Pathogenicity was tested on healthy

Manántlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga menziesii* del Edo. de México (EDO-T) y *Persea americana*, de Peribán Mich. (MICH-P). A través de un análisis morfológico a género y molecular a especie (No Accesoión: KP773290, KP773291, KP773292, KP773293, KP773294) se corroboró la identificación de los aislados con los análisis moleculares que indican una homología de 99 % de identidad con *P. cinnamomi*. La patogenicidad se probó en plantas sanas de *P. menziesii* de tres años de edad. Para cada aislado se utilizaron cinco plantas con su respectivo testigo de cinco plantas sin inocular, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y las observaciones de síntomas se realizaron semanalmente durante ocho meses. Los resultados obtenidos indicaron que los cinco aislados de *P. cinnamomi* son capaces de infectar a las plantas de *P. menziesii*.

El aislado COL-A, de la región del Arrayanal Col., se comportó como el más patogénico, causando la muerte en un periodo más corto de las plantas a los 120 ddi, le siguieron los aislados GRO-P a los 180 ddi, JAL-C y EDO-T a los 210 ddi, y MICH-P a los 240 ddi. Para analizar los datos obtenidos en el ensayo se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis detectando diferencias estadísticas significativas de los aislados sobre el hospedante. El testigo no presentó síntoma alguno. Este es el primer reporte de *P. cinnamomi* aislado de *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *P. menziesii* y *P. americana* evaluado en plantas de *P. menziesii*, donde se corrobora la patogenicidad del patógeno.

Palabras clave: *P. cinnamomi*, identificación; morfológica, molecular, *Pseudotsuga menziesii*, *Persea americana*, *Quercus* spp.

Phytophthora cinnamomi es un microorganismo del suelo que provoca grandes pérdidas económicas

three year old *P. menziesii* plants. Five plants were used for each isolation with its respective control of five uninoculated plants; the plants were kept under greenhouse conditions and the observations of symptoms were carried out weekly for eight months. The results obtained indicated that the five *P. cinnamomi* plants are capable of infecting the *P. menziesii* plants.

The isolation COL-A, from the area of Arrayanal Col. Behaved as the most pathogenic, causing the death, in the shortest period, of the plants after 120 ddi, followed by the isolations GRO-P at 180 ddi, JAL-C and EDO-T at 210 ddi, and MICH-P at 240 ddi. The data obtained in the test was analyzed with the Kruskal-Wallis test, finding significant differences of the isolations on the host. The control presented no symptoms. This is the first report on *P. cinnamomi* isolated from *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *P. menziesii*, and *P. americana* evaluated in *P. menziesii* plants, where the pathogenicity of the pathogen is corroborated.

Key words: *P. cinnamomi*, identification; morphological, molecular, *Pseudotsuga menziesii*, *Persea americana*, *Quercus* spp.

Phytophthora cinnamomi is a soil microorganism that causes large economic and environmental losses; it causes rotting of roots, butt, trunk, and branches. It affects many plant species in agriculture, vegetable production, and forest species, including over 1000 species and has a wide geographic distribution throughout the world (Crone *et al.*, 2013; Erwin and Ribeiro, 1996; Garbelotto *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2009; Zentmyer, 1980). The first description of *Phytophthora cinnamomi* was by Rands in 1922 as the cause of canker in cinammon tree trunks, in Sumatra (Erwin and Ribeiro, 1996). Since then, its damage has been reported in different

y daños ecológicos; causante de pudriciones radicales, cuello, tronco y ramas. Afecta a muchas especies de plantas en la agricultura, horticultura y especies forestales, que incluye a más de 1000 especies y cuenta con una amplia distribución geográfica, en todo el mundo (Crone *et al.*, 2013; Erwin y Ribeiro, 1996; Garbelotto *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2009; Zentmyer, 1980). La primera descripción de *Phytophthora cinnamomi* la realizó Rands, en 1922, como el agente causal del cancro en tallo de árboles de canelo, en Sumatra (Erwin y Ribeiro, 1996). Desde entonces sus daños se han reportado en diferentes hospedantes. En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952, causando daños severos en áreas productoras de aguacate y pérdidas de hasta 90 % (Pérez, 2008; Téliz y Mora, 2007; Tamayo, 2007). Así mismo, se ha reportado en bosques naturales de *Quercus* spp, a principios del año 2000, en El Arrayanal, Col., ocasionando la muerte y daños en árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000). Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008).

También se reporta que afecta árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, Edo. de México y Veracruz (García, 2007). Los síntomas causados por el patógeno son clorosis, defoliación, muerte de ramas, canchales en la corteza y pudrición de raíz, lo que ocasiona la muerte del árbol (Dos Santos *et al.*, 2011; Erwin y Ribeiro, 1996). La patogenicidad del género de *Phytophthora*, está influenciada por condiciones de temperatura, precipitación, humedad, textura del suelo, pH y disponibilidad de nutrientes (Shew y Benson, 1983; Balci *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2014). La patogenicidad depende del tipo de cepa y adaptación de los patógenos en la planta, y puede ser estimada por la

hosts. In Mexico, the first reports of *P. cinnamomi* were made by Zentmyer in 1952 as causing severe damages in avocado production areas, and losses of up to 90 % (Pérez, 2008; Téliz and Mora, 2007; Tamayo, 2007). Likewise, it has been reported in natural *Quercus* spp forests at the beginning of the year 2000, in El Arrayanal, Col., causing the death of, and damaging, red oak trees (Tainter *et al.*, 2000). Later, it was found to affect trees of the same genus in the Reserva de la Biosfera, in Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) and in Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 and 2008).

It has also been reported to affect *Pseudotsuga menziesii* trees in the states of Jalisco, Edo. de México, and Veracruz (García, 2007). The symptoms caused by the pathogen are chlorosis, defoliation, death of branches, cankers on the bark, and rotting of roots, leading to the death of the tree (Dos Santos *et al.*, 2011; Erwin and Ribeiro, 1996). The pathogenicity of the *Phytophthora* genus is influenced by temperature, humidity, soil texture, pH and nutrient availability (Shew and Benson, 1983; Balci *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2014). Pathogenicity depends on the type of strain and adaptation of pathogens in the plant, and can be calculated by the speed at which the pathogen damages the host (Pariaud *et al.*, 2009; Robin and Desprez 1998).

Pathogenicity tests have been performed on *P. cinnamomi* in Mexico on avocado varieties, although there are no reports of these with *P. cinnamomi* isolations from different regions in Mexico, taken from forest species. This pathogen is a threat to both commercial and natural forest species found in other areas of the country, since the lack of awareness of this information can bring as a consequence the economic and environmental importance of the species affected. This pathogen has been identified with the use of taxonomic keys,

rapidez del patógeno en dañar al hospedante (Pariaud *et al.*, 2009; Robin and Desprez., 1998)

En México se han realizado pruebas de patogenicidad de *P. cinnamomi* en variedades de aguacate, sin embargo, no hay reportes de estas con aislados de *P. cinnamomi* procedentes de distintas regiones de México, obtenidas de especies forestales. Este patógeno representa una amenaza para especies de plantas tanto comerciales como bosques naturales, que se encuentran en otras partes del país, ya que el desconocimiento de esta información puede traer como consecuencia una importancia económica y ecológica de la especie afectada. La identificación de este patógeno ha sido a través del uso de claves taxonómicas, medios selectivos y muy recientemente se ha caracterizado empleando diferentes técnicas moleculares mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), con iniciadores específicos para cada especie obteniendo resultados importantes sobre la taxonomía, filogenia y variabilidad del hongo (Gallegly y Hong, 2008; Tsai *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2000). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar y evaluar la patogenicidad de cinco aislados de *P. cinnamomi*, procedentes de cinco regiones de México obtenidos de árboles de *Quercus elliptica*, *Q. salicifolia*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana*., en plantas de *P. mensiezii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del patógeno

Los aislados empleados en esta investigación se obtuvieron de suelo, raíz o canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, de El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* de Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* de Manantlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* del Edo. de México (EDO-

selective media and has, very recently, has been characterized using different molecular techniques using PCR (Polymerase Chain Reaction), with specific indicators for each species, obtaining important results on the taxonomy, phylogeny, and variability of the fungus (Gallegly and Hong, 2008; Tsai *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2000). Due to this, the aim of this study was to identify and evaluate the pathogenicity of five *P. cinnamomi* isolations from five regions of Mexico taken from *Quercus elliptica*, *Q. salicifolia*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii*, and *Persea americana* trees, in *P. mensiezii* plants.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the pathogen

The isolations used in this investigation were obtained from soils, roots or cankers on *Quercus salicifolia* trees from El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* from Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* from Manantlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* from Edo. de México (EDO-T), and *Persea americana*, from Peribán Mich. (MICH-P), which were identified with a morphological analysis on the genus, and a molecular analysis on the species.

The trees displayed characteristic symptoms caused by *P. cinnamomi*, including regressive death, wilting, chlorosis, premature defoliation, cankers, and a dark colored exudate in the bark. In order to obtain the pathogen directly in the field from cankers, we used the selective medium PARPH (pimaricin-ampicilin-rifampicin-PCNB e hymexazol) (Jeffer and Martín, 1986; Erwin and Ribeiro, 1996). In the lab, the root samples were disinfected and planted in a PARPH selective medium. For the soil samples, a method of trapping

T) y *Persea americana*, de Peribán Mich. (MICH-P), los cuales fueron identificados a través de un análisis morfológico a género y molecular a especie.

Los árboles mostraban síntomas característicos que causa *P. cinnamomi*, entre estos muerte regresiva, marchitez, clorosis, defoliación prematura, canchales y exudado color oscuro en la corteza. Para obtener al patógeno directamente en campo, a partir de canchales, se utilizó medio selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) (Jeffer y Martín, 1986; Erwin y Ribeiro, 1996). En laboratorio las muestras de raíz, se desinfectaron y sembraron en medio selectivo PARPH. Para las muestras colectadas de suelo, se utilizó un método de trampeo con discos de camelia, una suspensión de agua suelo + raíz y medio selectivo (Almaraz *et al.*, 2013). El aislado de aguacate, fue proporcionado por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH. El aislado de planta de aguacate se obtuvo por los síntomas característicos de la enfermedad tristeza del aguacatero por *P. cinnamomi*.

Identificación morfológica

Las colonias obtenidas de *Phytophthora* se les realizó punta de hifa y se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) y se incubaron durante siete días en oscuridad, a una temperatura de ± 25 °C (Zentmyer, 1980). Posteriormente se caracterizaron a género con base en la morfología de la colonia y estructuras de reproducción. El desarrollo de las colonias se midió diariamente de cada uno de los aislamientos, hasta que el oomiceto llenó la caja Petri. Para la producción de esporangios se realizó una suspensión de extracto de suelo + agua destilada estéril, en la cual se colocó discos de micelios de 5 mm de diámetro en cajas Petri (Romero, 1996), estas cajas se colocaron a una temperatura de ± 25 °C bajo condiciones de luz

was used with camellia discs, a water soil + root and selective medium suspension was used (Almaraz *et al.*, 2013). The avocado isolation was provided by Dr. Salvador Ochoa Ascencio of the Department of Agrobiology “Presidente Juárez” of the UMSNH. The avocado tree isolation was obtained by the characteristic symptoms of the avocado tristeza disease by *P. cinnamomi*.

Morphological identification.

The colonies obtained from *Phytophthora* were performed at hypha point, transferred to Petri dishes with a PDA (potato-dextrose-agar) medium and incubated for 7 days in the dark at a temperature of ± 25 °C (Zentmyer, 1980). Later, were identified to genus based on the morphology of the colony and reproductive structures. The development of the colonies was measured on a daily basis from each of the isolations, until the oomycete filled the Petri dish. For the production of sporangia, a soil extract was suspended in sterile distilled water, and mycelia discs with a diameter of 5 mm in Petri dishes were placed inside them (Romero, 1996); these Petri dishes were kept at a temperature of ± 25 °C under continuous light for six days. The sporangia were observed under the microscope and each isolation was described, along with their measurements for height and length; 100 sporangia were measured from each isolation.

Once the genus of each isolation was identified, they were placed in test tubes containing PDA and mineral oil was added. All this was carried out in the Forest Pathology lab of the Colegio de Postgraduados.

Molecular characterization

The DNA of each isolation used for the identification of species was extracted from

continua por seis días. Los esporangios se observaron al microscopio y se realizaron las descripciones de cada aislamiento así como sus mediciones de la relación largo y ancho, se midieron 100 esporangios de cada aislamiento.

Una vez identificados a género todos los aislamientos, se procedió a conservarlos en tubos de ensayo que contenían PDA agregando aceite mineral. Todo esto se realizó en el laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados.

Caracterización molecular

El ADN de cada aislamiento que se utilizó para la identificación a especie se extrajo de colonias miceliales desarrolladas en medio de cultivo PDA de aproximadamente siete días de crecimiento. Para la extracción del ADN se empleó la técnica de Sambrook y Russell (2001). El ADN total obtenido se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Termoscientific).

PCR. Para realizar el análisis por PCR del ADN extraído, se amplificaron las regiones ITS con los primers ITS'5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS'4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de genes rRNA de las subunidades 18S-5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990). Para la reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 µL con la siguiente formulación: 13.22 µL de agua ultrapura estéril, 2.5 µL con solución amortiguadora de buffer 5X, 2.08 µL de MgCl₂ a 2.5 mM, 2 µL dNTPs a 2.0 mM, 2 µL de cada primers a 20 ρMol, 0.2 µL de Taq-DNA polimerasa a 1.5 U y 1 µL de muestra de ADN 80 ng. La amplificación de los iniciadores se realizó en un termociclador Perkin-Elmer (Mod. CT 2400), con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización del ADN a 95 °C por 2 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min; la extensión

mycelial colonies developed in a PDA medium with a growth of approximately seven days. For the extracion of DNA, the technique used was Sambrook and Russell (2001). The total DNA obtained was observed by electrophoresis in agarose gel at 0.8 % and quantified in a Nanodrop 1000 (Termoscientific) spectrophotometer.

PCR. To perform the analysis by PCR of the DNA extracted, we amplified the ITS regions with the primers ITS'5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS'4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) of rRNA genes of the subunits 18S-5.8S and 5.8S-28S (White *et al.*, 1990). For the PCR reaction, we used a final volume of 25 µL with the following formulation: 13.22 µL of ultrapure sterile water, 2.5 µL with a buffer solution 5X, 2.08 µL of MgCl₂ at 2.5 mM, 2 µL dNTPs at 2.0 mM, 2 µL of each primers at 20 ρMol, 0.2 µL of Taq-DNA polymerase at 1.5 U and 1 µL of an 80 ng DNA sample. The amplification of the primers was performed in a Perkin-Elmer (Mod. CT 2400) thermocycler, with the following program: one initial DNA denaturation cycle at 95 °C for 2 min; 30 cycles at 95 °C for 1 min, aligning at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C for 2 min; the final extension was at 72 °C for 10 min. The amplified fragment was purified using the KIT Quiagen® and the quality was verified by electrophoresis in agarose gel at 1 % stained with ethidium bromide. La banda se visualizó en un transilluminator (GelDoc 2000, BIO RAD®), and analyzed with the program Quantity One 4.0.3 (Sambrook and Russel, 2001). The PCR product was sent to the company Macrogen, U.S.A. for sequencing (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer).

The sequences obtained with the primers ITS5–ITS4 were aligned with those available in the genebank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in the U.S.A. (<http://www>.

final fue a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se purificó con el KIT Quiagen® y la calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. La banda se visualizó en un transiluminador (GelDoc 2000, BIO RAD®), y se analizó con el programa Quantity One 4.0.3 (Sambrook y Russel, 2001). El producto de PCR se envió a la compañía Macrogen, E.U.A, para su secuenciación (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer).

Las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS5–ITS4 se alinearon con las disponibles en el banco de genes del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), de E.U.A. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los valores cuantitativos generados, solo se bajaron las secuencias con el valor más alto, para su comparación con las que se obtuvieron en este estudio. Las secuencias se alinearon con Clustal W versión 1.6. y se depositaron en la base de datos del Gen Bank para obtener su número de acceso.

Pruebas de patogenicidad

Una vez desarrolladas las colonias en medio de cultivo PDA con siete días de edad, se procedió a realizar las pruebas de patogenicidad. De cada uno de los aislamientos obtenidos se procedió a realizar las pruebas bajo condiciones de invernadero en árboles cultivados en macetas de *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad, con una altura de 45 a 47 cm. La inoculación se realizó con el método de disco de micelio en tallo (O’Gara *et al.*, 1996). En el punto de inoculación los tallos de plantas se limpiaron con agua destilada estéril, con una aguja de disección desinfectada con alcohol al 70 % y flameada al mechero, se realizaron 10 punciones, de cada aislado se tomaron discos de 0.5 mm de diámetro con micelio del pseudohongo crecido en medio de cultivo PDA, los cuales se colocaron en

ncbi.nlm.nih.gov). Of the quantitative values generated, only the sequences with the highest values were reduced in order to compare them with those obtained in this study. The sequences were aligned with Clustal W version 1.6. and were deposited in the database of the Gen Bank to obtain their accession number.

Pathogenicity tests

Once the colonies were developed in the seven-day old PDA medium, the pathogenicity tests began. For each one of the isolations obtained, the tests were carried out under greenhouse conditions on three-year old *Pseudotsuga menziesii* trees planted in pots, with a height of 45 to 47 cm. The inoculation was carried out with the method of mycelium discs in the stem (O’Gara *et al.*, 1996). In the point of inoculation, the stems of the plants were cleaned with sterile distilled water, using a dissection needle disinfected with alcohol at 70 % and heated with a burner, ten punctures were performed, from each isolation, disks were taken with a diameter of 0.5 mm with a mycelium of the pseudofungus grown in a PDA medium, which were placed in the area and covered with moist sterile cotton, and covered with a gauze and parafilm tape around the stem in order to retain humidity. All this was carried out under aseptic conditions.

Five plants were inoculated for each of the isolations (repetitions), and there was a control which was only applied PDA medium, giving a total of 30 inoculated plants. Finally, each plant was covered with a plastic bag to produce conditions of relative humidity. They remained in this way for one week, and were kept at a temperature of ± 25 °C. The plants were distributed at random on tables in the greenhouse and watered every three days at field capacity. The number of days before the appearance of symptoms and death of each plant

el área y se cubrieron con algodón estéril húmedo, y se cubrió con una gasa y cinta de parafilm alrededor del tallo, con el fin de mantener la humedad. Todo esto se realizó bajo condiciones asépticas.

Se inocularon cinco plantas para cada uno de los aislamientos (repeticiones), así mismo, se contó con un testigo, al que sólo se le aplicó medio de cultivo PDA, dando un total de 30 plantas inoculadas. Finalmente, a cada planta se le cubrió con una bolsa de plástico, para generar condiciones de alta humedad relativa. Así permanecieron por una semana y se mantuvieron a una temperatura ambiente ± 25 °C. Las plantas se distribuyeron al azar sobre mesas en el invernadero y se regaron cada tercer día a capacidad de campo. Se evaluó el número de días a la aparición de los síntomas y muerte en la planta, esto se realizó semanalmente durante ocho meses, y los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico (prueba de Kruskal-Wallis) utilizando el programa SAS (SAS, 2012) para determinar el comportamiento de los aislados de *P. cinnamomi*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislamientos obtenidos de suelo, raíz y canchales de árboles de las diferentes localidades se muestran en el Cuadro 1.

Identificación morfológica

Las cinco colonias aisladas de árboles de *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* mostraron un crecimiento uniforme en medio de cultivo PDA observándose el crecimiento micelial de aspecto algodonoso, de color blanco, en forma de camelia (Figura 1) debido al crecimiento deprimido; micelio cenocítico, toruloso, con hifas coraloides y

was evaluated on a weekly basis for eight months, and the results obtained underwent a statistical analysis (Kruskal-Wallis test) using the program SAS (SAS, 2012) to determine the behavior of the *P. cinnamomi* isolations.

RESULTS AND DISCUSSION

The isolations obtained from the soil, root, and cankers of the trees in different locations are shown in Table 1.

Morphological identification

The five isolated colonies of *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* and *Persea americana* trees showed a uniform growth in a PDA medium, displaying a mycelial growth with a cotton-like aspect, white colored, camellia-shaped (Figure 1) due to the depressed growth; coenocytic mycelium, torulose, with coraloid hyphea and abundant swellings, all at the genus level. This pathogen was observed to produce spherical, oval, piriform, terminal or intercalated chlamydo spores, frequently in bunches. Some authors mention that they persist in the soil for years, which constitute an organ of conservation and survival as reported by Erwin and Ribeiro (1996); Jung *et al.*, (2013) and Zentmyer *et al.*, (1996).

The measurements of the average length and width of 100 sporangia from each isolation were also taken, and they are as follows: COL-A 40.49 x 28.19, JAL-C 40.81 x 28.63 μm , GRO-P 48.24 x 31.47 μm , EDO-T 43.2 x 32.9 μm and MICH 56.23 x 33.8 μm . On the other hand, Erwin and Ribeiro (1996) report values of 75 x 40 μm , and therefore they do not coincide with those obtained in this study. Regarding the size of the sporangia, these

Cuadro 1. Aislados obtenidos de *P. cinnamomi*, empleados en las pruebas de patogenicidad en plantas de *Pseudotsuga menziesii*.

Table 1. Isolations obtained from *P. cinnamomi*, used in the pathogenicity tests on *Pseudotsuga menziesii* plants.

Clave	Localidad	Hospedante	Origen Suelo/Raíz/cancho
COL – A	El Arrayanal, Col.	<i>Quercus salicifolia</i> .	cancho
GRO – P	Tecoanapa, Gro	<i>Quercus elliptica</i> .	cancho
JAL – C	Manantlán, Jal.	<i>Quercus peduncularis</i> .	Suelo
MICH- P	Peribán, Mich.	Aguacate	Raíz
EDO – T	Tres Encinos. Edo. de México	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Suelo

abundantes hinchamientos, todo esto a nivel de género. Se observó que este patógeno produce clamidosporas esféricas, ovales, piriformes, terminales o intercalares, frecuentemente en racimos, algunos autores mencionan que persisten en el suelo por años, las cuales constituyen un órgano de conservación y supervivencia como lo reportan Erwin y Ribeiro (1996); Jung *et al.*, (2013) y Zentmyer *et al.*, (1996).

Además, se midió el largo y ancho promedio de 100 esporangios de cada aislamiento, éstos fueron los siguientes: COL-A 40.49 x 28.19, JAL-C 40.81 x 28.63 µm, GRO-P 48.24 x 31.47 µm, EDO-T 43.2 x 32.9 µm y MICH 56.23 x 33. 8 µm, por su parte Erwin y Ribeiro (1996), reportan valores

vary depending on the weather conditions and are only produced in the soil extract (Sánchez *et al.*, 2002b). The morphological characteristics of the *P. cinnamomi* sporangia, elongated ovoids and a non-papillated apex, agree with those reported by Erwin and Ribeiro (1996), Gallegly and Hong (2008) and Waterhouse (1963).

Molecular characterization

The band of the product of PCR was approximately 1200 to 1500 pb (Figure 3). The results of the sequencing of each isolation were compared with the sequences reported in the gene bank (NCBI). The sequences by isolation had a

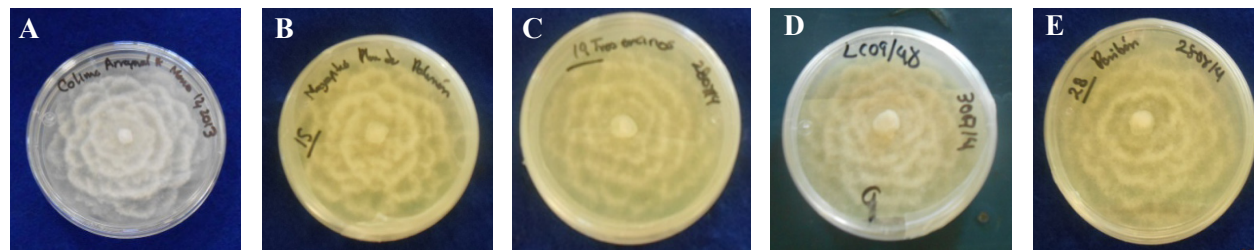


Figura 1. A) Colonias de los aislados heterotálicos de *P. cinnamomi* de seis días con clave: A) COL-A y siete días de edad con clave: B) GRO-P, C) EDO-T encinos, D) JAL-C y E) MICH-P en forma de camelia desarrollándose en medio de cultivo PDA.

Figure 1. A) Colonies of the six-day old heterothallic *P. cinnamomi* isolations coded: A) COL-A and seven days old with the codes: B) GRO-P, C) EDO-T encinos, D) JAL-C and E) MICH-P, camellia-shaped, developing in PDA medium.

de 75 x 40 µm, por lo que no concuerdan con las obtenidas en este estudio. En cuanto al tamaño de los esporangios, estos varían con las condiciones ambientales y solo se producen en extracto de suelo (Sánchez *et al.*, 2002b). En las características morfológicas de los esporangios de *P. cinnamomi*, ovoides a elongados y ápice no papilado, concuerdan con las reportadas por Erwin y Ribeiro (1996), Gallegly y Hong (2008) y Waterhouse (1963).

Caracterización molecular

La banda del producto de PCR fue de aproximadamente 1200 a 1500 pb (Figura 3). Los resultados de la secuenciación de cada aislado se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI). Las secuencias por aislamiento tuvieron 99 % de índice de similaridad para la especie *P. cinnamomi*. Al comparar los nucleótidos de cada aislamiento e identificados morfológicamente con las reportadas en el banco de genes (NCBI), estas correspondieron a la misma especie. Esto corroboró la identificación morfológica de cada aislado (Cuadro 3).

Pruebas de patogenicidad

Las plantas de *Pseudotsuga mensiezii* que se les colocó el patógeno empezaron a presentar síntomas de marchitez de brotes, flacidez en las puntas, clorosis en las acículas, muerte de ramas en la base de la planta. Acompañado del desarrollo de cancro en el tallo, el cual se caracterizó por la presencia de necrosis en la epidermis del mismo y desprendimiento de la corteza, dando una coloración de color café claro a oscura.

Los aislados presentaron una patogenicidad diferente en el hospedante inoculado. El aislado COL-A del Arrayanal, Col., procedente de *Quercus salicifolia*, fue el primero en causar síntomas visi-

99 % similarity index for the species *P. cinnamomi*. When comparing the nucleotides of each isolation and morphologically identified with those reported in the gene bank (NCBI), they corresponded to the same species. This corroborated the morphological identification of each isolation (Table 3).

Pathogenicity tests

The *Pseudotsuga mensiezii* plants that were given the pathogen began showing symptoms of sprout wilting, flaccid tips, chlorosis of the needles, death of leaves on the base of the plants, along with the growth of cankers on the stem, which was characterized by the presence of necrosis on its epidermis and detachment of the bark, giving a light to dark brown color.

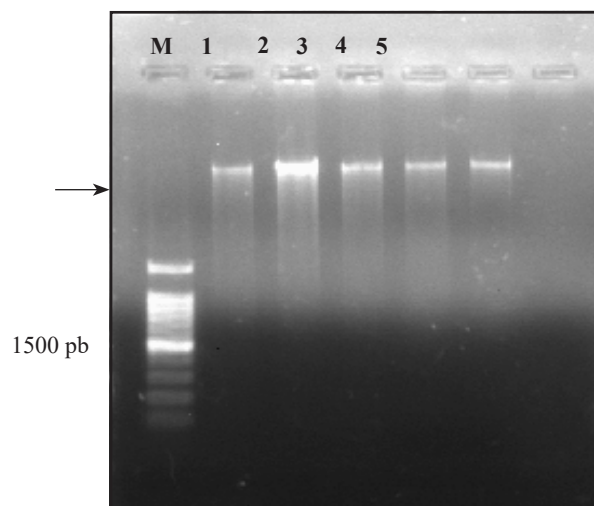


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % que muestra una banda de aproximadamente 1500 pb del producto amplificado por PCR con los iniciadores ITS4 e ITS5; M. Marcador molecular de 1 kb, carril 1. COL-A., 2. GRO-P., 3. JAL-C., 4. MICH-P y 5. EDO-T.

Figure 3. Electrophoresis in 1% agarose gel that shows a band of approximately 1500 pb of the product amplified by PCR with the primers ITS4 and ITS5; M. 1 kb molecular marker, lane 1. COL-A., 2. GRO-P., 3. JAL-C., 4. MICH-P, and 5. EDO-T.

Cuadro 3. Identificación morfológica y molecular de aislados de *Phytophthora cinnamomi*, número de nucleótidos, especie alineada con el 99 % de confiabilidad y número de acceso en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Table 3. Morphological and molecular identification of *Phytophthora cinnamomi* isolations, number of nucleotides, species aligned with 99 % reliability and accession number in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

Clave de Aislamiento	Identificación Morfológica	No. de nucleótidos	Especie alineada	Núm. de acceso a especie alineada NCBI
Col-A	<i>P. cinnamomi</i>	1046	<i>P. cinnamomi</i>	KP773290
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	925	<i>P. cinnamomi</i>	KP773291
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	940	<i>P. cinnamomi</i>	KP773292
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	926	<i>P. cinnamomi</i>	KP773293
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	952	<i>P. cinnamomi</i>	KP773294

bles a los 67 ddi y la muerte de la plantas a los 120 días después de la inoculación. Además se observó que el aislamiento procedente del El Arrayanal, Col. (COL-A) fue el primero en cubrir la caja Petri a los cinco días; así mismo, el primero en la formación de esporangios en seis días en solución de suelo. El aislado GRO-P, procedente de *Q. elliptica*, ocasionó los síntomas 93 ddi y la muerte 180 días después de la inoculación; en el caso del EDO-T, de *Pseudotsuga menziesii*, se requirieron 135 ddi lo mismo que para JAL-C, obtenido de *Q. peduncularis* y la muerte de la plantas 210, y para MICH-P, aislado de *Persea americana* 160 ddi y 240 días para la muerte (Figura 2). Los resultados anteriores muestran que todos los aislamientos fueron capaces de causar enfermedad pero el aislado COL-A se comportó como el más patogénico en las plantas de *Pseudotsuga menziesii*, por lo que fue evidente que hay variación de patogenicidad entre los aislamientos de *P. cinnamomi* de las diferentes regiones de México.

Los datos anteriores, específicamente determinan la muerte en base a patogenicidad de los aislamientos, estos resultados se sometieron a un análisis estadístico utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Se obtuvieron diferencias significativas entre los aislados (P 0.0001) (Cuadro 2). El aislado

The isolations presented a different pathogenicity in the inoculated host. The isolation COL-A from Arrayanal, Col., found in *Quercus salicifolia*, was the first to cause visible symptoms at 67 ddi, and the death of plants at 120 days after inoculation. It was also observed that the isolation from El Arrayanal, Col. (COL-A) was the first to cover the Petri dish after 5 days, as well as the first to form sporangia in six days in the soil solution. Isolation GRO-P, taken from *Q. elliptica*, caused the symptoms 93 ddi and death at 180 days after inoculation; in the case of EDO-T, in *Pseudotsuga menziesii*, 135 days were required, as with JAL-C, taken from *Q. peduncularis* and for the death of plants, 210; for MICH-P, isolated from *Persea Americana*, 160 ddi and 240 days for death (Figure 2). These results show that all the isolations were able to cause a disease, yet the isolation COL-A behaved the most pathogenic in *Pseudotsuga menziesii* plants, therefore it was evident that there is a variation in pathogenicity amongst the *P. cinnamomi* isolations from the different regions in Mexico.

The above data, specifically determine death based on the pathogenicity of the isolations. These results underwent a statistical analysis using the Kruskal-Wallis test. Significant differences between isolates (P 0.0001) were obtained (Table

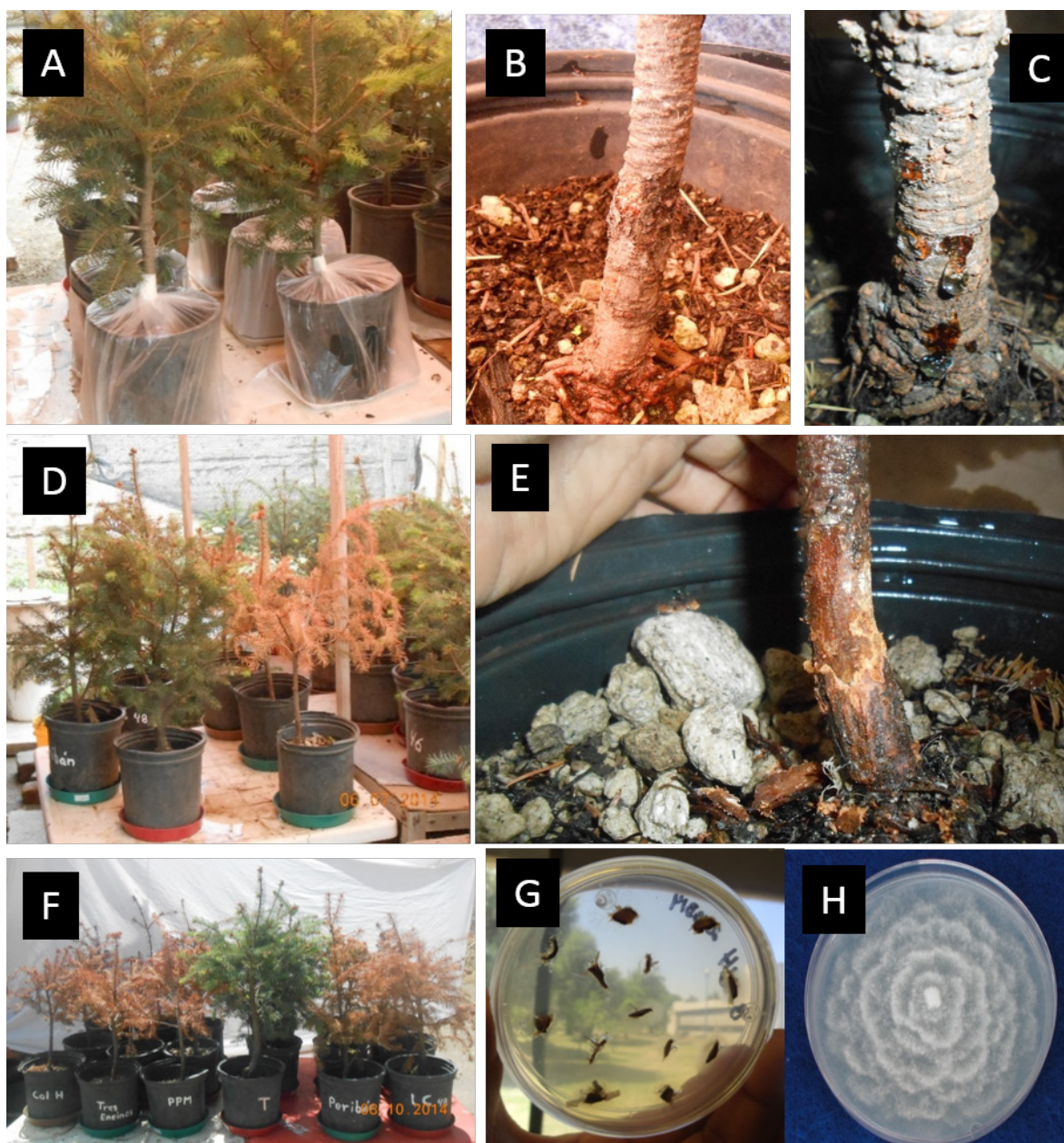


Figura 2. A) Desarrollo de síntomas en plantas de *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad inoculadas con los diferentes aislados de *P. cinnamomi* clave (COL-A, GRO-P, EDO-T, JAL-C, y MICH-P). B) Cancro en plantas. C) Resinación en la base del tallo. D) Progreso de la enfermedad en la planta E) Cancro de coloración café claro a oscuro causado por el aislamiento COL-A. F) Testigo y plantas inoculadas durante las pruebas de patogenicidad. G) Tejido enfermo del aislado COL-A y micelio del organismo en medio selectivo PARHP. H) Reaislamiento COL-A de *P. cinnamomi* de siete días en PDA.

Figure 2. A) Development of symptoms in three-year old *Pseudotsuga menziesii* plants inoculated with the different *P. cinnamomi* isolations, coded (COL-A, GRO-P, EDO-T, JAL-C, and MICH-P). B) Canker in plants. C) Sap on the base of the stem. D) Progress of the disease in the plant E) Light to dark brown canker caused by the isolation COL-A. F) Control and plants inoculated during the pathogenicity tests. G) Tissue infected with the isolation COL-A and mycelia of the organism in the selective medium PARHP. H) Reaisolation COL-A of seven-day old *P. cinnamomi* in PDA.

COL-A fue estadísticamente diferente al resto de los demás, mostrando una media de rango mayor a la de los otros.

A partir del tejido infectado de las plantas inoculadas con cada aislado, se re aisló el patógeno *P. cinnamomi*. Las plantas de *Pseudotsuga menziesii* que se emplearon como testigo no presentaron ningún síntoma. No se encontraron estudios similares en especies forestales, sin embargo, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Ceja *et al.*, (2000) en plantas de aguacate inoculadas con *P. cinnamomi* quienes observaron que el patógeno provocó marchitez en el follaje, presencia de cancro de color oscuro en tallo con una lesión interna de color café y finalmente la muerte de las plantas.

En este estudio se relacionó la sintomatología causada por los aislados en plantas de *Pseudotsuga menziesii*, la cual coincide con lo reportado por Erwin y Ribeiro (1996).

Por otra parte, Jordan y Tainter (1996) observaron que al inocular plantas de robles blancos y rojos, estas especies son muy susceptibles a *P. cinnamomi* y que los síntomas pueden tardar de meses a años para ser evidentes.

De igual manera, Robin y Desprez-Loustau (1998), quienes inocularon discos de agar de micelio de *P. cinnamomi* en plantas de castaño y roble rojo, probaron su patogenicidad, encontrando que todas las plantas manifestaron síntomas de amarillamiento, defoliación, agrietamientos, coloración color marrón y canchros pero con diferente nivel de virulencia. Sin embargo, Chastagner (1997), hace mención que la formación o desarrollo del cancro no siempre se forma ya que este dependerá del mecanismo del patógeno y del ambiente.

Podger (1989) por su parte, menciona que cuando utilizó 14 aislados australianos de *P. cinnamomi*, aisladas de 10 especies de plantas hospederas, causaron enfermedad en especies de dicotiledóneas y el síntoma principal consistió de una coloración

Cuadro 2. Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar número de días en síntomas y la muerte en las plantas inoculadas con los cinco aislamientos de *Phytophthora cinnamomi*.

Table 2. Kruskal-Wallis test to evaluate the number of days in symptoms and the deaths of plants inoculated with the five *Phytophthora cinnamomi* isolations.

Tratamiento	Hongo	Medias de rangos	Grupos
Testigo	<i>P. cinnamomi</i>	31.50	A
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	60.68	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	64.85	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	64.85	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	66.52	B
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	97.00	C

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos./ Same letters do not differ significantly between treatments.

2). The isolation COL-A was statistically different to the others, showing an average with a higher range than the others.

The pathogen *P. cinnamomi* was re-isolated from the infected tissue of the plants inoculated with each isolation. The *Pseudotsuga menziesii* plants used as a control presented no symptoms. No similar studies on forest species were found, although these results coincide with reports by Ceja *et al.*, (2000) on avocado plants inoculated with *P. cinnamomi*, who observed that the pathogen caused wilting in the foliage, dark colored cankers in the stem with a brown internal lesion, and finally the death of the plants.

This study related the symptoms caused by for the isolations in *Pseudotsuga menziesii* plants, which coincides with reports by Erwin and Ribeiro (1996).

On the other hand, Jordan and Tainter (1996) observed that inoculating white oak or red oak trees, these species are very vulnerable to *P. cinnamomi*, and that symptoms may take months or years to become evident.

anormal en raíz y finalmente la muerte. Los aislados no mostraron diferencia en su patogenicidad.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la patogenicidad de los aislados de *P. cinnamomi* coinciden con los reportados por Huberli *et al.*, (2001), quienes encontraron que la patogenicidad de aislados australianos en plantas de *Eucalyptus marginata* y *Corymbia calophylla* mostraron tres tipos de respuesta: la primera, con alta capacidad para matar plantas, a los 59 días, después de la inoculación; la segunda, de 182, los cuales fueron considerados intermedios y la tercera, los que no inducen muerte de planta, pero son considerados los menos patogénicos.

Por su parte, Dudzinski *et al.*, (1993), encontraron diferencias entre los aislados de *P. cinnamomi* colectados en Australia inoculados en tallos de *Eucalyptus marginata*, estos autores detectaron una variación de la patogenicidad en la manifestación de síntomas, desde la inoculación hasta la muerte de la planta. Otros estudio realizado por Brasier *et al.*, (1993) menciona que *P. cinnamomi* es un patógeno agresivo en árboles de robles y que la introducción y la propagación de suelo de bosque con el patógeno puede ser un factor importante en la declinación y disminución del alcornoques en la Península Ibérica.

Por otra parte Tippett *et al.*, 1985. Evaluaron el método de inoculación por herida en 21 árboles de *Eucalyptus marginata* y con un aislamiento de *P. cinnamomi* observaron que no existe variación en la patogenicidad de *P. cinnamomi* en las plantas inoculadas.

CONCLUSIONES

Todos los aislados de *Phytophthora* correspondieron a *P. cinnamomi* y mostraron ser patogénicos sobre *Pseudotsuga mensiezii* de los cuales el aislado COL-A fue el más patogénico.

Likewise, Robin and Desprez-Loustau (1998), who inoculated *P. cinnamomi* mycelium agar discs in chestnut and red oak trees, tested its pathogenicity and found symptoms of yellowing, defoliation, cracking, brown coloring, and cankers, but with different levels of virulence. However, Chastagner (1997), mention that the formation or development of the canker does not always take place, since it will depend on the mechanism of the pathogen and the environment.

Podger (1989), meanwhile, mentions that when he used 14 Australian *P. cinnamomi* isolations, taken from 10 species of host plants, they diseased dicotyledonous species, and the main symptom consisted of an abnormal coloring in the root, and finally death. The isolates showed no difference in their pathogenicity.

The results obtained in this study on the pathogenicity of the *P. cinnamomi* isolations coincide with those reported by Huberli *et al.*, (2001), who found that the pathogenicity of Australian isolations on *Eucalyptus marginata* and *Corymbia calophylla* plants displayed three types of responses: the first, with a high capacity to kill plants after 59 days after inoculation; the second, of 182, which were considered intermediate, and the third, which do not lead to the death of plants, but are considered the least pathogenic.

At the same time, Dudzinski *et al.*, (1993) found differences between the *P. cinnamomi* isolations collected in Australia inoculated in *Eucalyptus marginata* stems. These authors found a variation of the pathogenicity of the manifestation of symptoms, from inoculation until the death of the plant. Another study, by Brasier *et al.*, (1993) mentions that *P. cinnamomi* is an aggressive pathogen on oak trees, and that the introduction and spreading of forest soil with the pathogen may be an important factor in declining and reducing cork in the Iberian Peninsula.

Este es el primer estudio en México donde se reportan la patogenicidad de aislados de *P. cinnamomi* procedentes de diferentes lugares y hospedantes sobre *P. menziesii*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento y aceptación para realizar mis estudios de postgrado.

LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales D, L de L Saavedra Romero, A Almaraz-Sánchez, B. Tlapal-Bolaños, O Trejo-Ramírez, J. M Davidson, J T Kliejunas, S W Oak, J G O'Brien, F Orozco-Torres y Quiroz-Reygadas D. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. Polibotánica 23: 1-21. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62102301>
- Alvarado-Rosales-D, L de L Saavedra y A Almaraz-Sánchez. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino *Quercus* spp., en Tecoanapa, Guerrero, México. Agrociencia 42: 565-572. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000500008
- Almaraz-Sánchez-A, Alvarado-Rosales-D, Saavedra-Romero LdeL. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de esporulación. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestal y del Ambiente 19: 5-12. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.062>
- Balci Y, S Balci, W L MacDonald, and Gottschalk K W. 2008. Relative susceptibility of oaks to seven species of *Phytophthora* isolated from oak forest soils. For. Pathol. 38:394-409. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00559.x>
- Brasier C M, Sobredo F Ferraz J F P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant. Pathol. 42, 140-145. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01482.x>
- Crone M McComb, J A O'Brien P A, Hardy G E St J 2013. Assessment of Australian native annual/herbaceous perennial plant species as asymptomatic or symptomatic hosts of *Phytophthora cinnamomi* under controlled conditions. For. Pathol. 245-251. <http://dx.doi.org/10.1111/efp.12027>
- Ceja T L F, Téliz O D, Osada K S, Morales G J L. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea Americana* Mill. en cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Rev. Mexi. Fitopatol. 18:79-86.
- Chastagner G A, (Eds). 1997. Christmas tree diseases, insects, and disorders in the Pacific Northwest: identification and management. Washington State University Cooperative, Pullman 156.
- Davidson J M, O'Brien, J G, S W Oak and J Kliejunas. 2003. Report on a site visit to México-Muerte del Encino. USDA

On the other hand, Tippet *et al.*, 1985 evaluated the inoculation method by injury in 21 *Eucalyptus marginata* trees, and with a treatment of *P. cinnamomi* they discovered there is no variation in the pathogenicity of *P. cinnamomi* in inoculated plants.

CONCLUSIONS

All *Phytophthora* isolations corresponded to *P. cinnamomi* and proved to be pathogenic on *Pseudotsuga mensiezii*, out of which the isolation COL-A was the most pathogenic.

This is the first study in Mexico to report the pathogenicity of *P. cinnamomi* isolations from different places and hosts on *P. menziesii*.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council (CONACYT) and the Colegio de Postgraduados for the funding and acceptance to carry out my graduate studies.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Forest Service. 9 p.
- Dos Santos Á F, D J Tessmann, T C A, Alves J B Vida, and R Harakava. 2011. Root and crown rot of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) caused by *Phytophthora cinnamomi*. J. Phytopathol. 159:194-196. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01741.x>
- Dudzinski M L, Old K M, and Gibbs R.J. 1993. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. Aust. J. Bot 17: 35-37. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9930721>
- Erwin D C, and O K Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. USA. 562 Gallegly M.E, and Hong C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. ST. Paul, MN USA. 158.
- Gallegly M E, and Hong M. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. ST. Paul, MN USA. 150 p.
- Garbelotto M, Huberli D. 2006. First report on an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in natural oak woodlands of California and its differential impact on two native oak species. Plant Dis. 90:685 <http://dx.doi.org/10.1094/PD->

- 90-0685C
- García D S E. 2007. Pudriciones de raíz por *Phytophthora* / Root rot by *Phytophthora*. En: Cibrián T D, Alvarado R.D, y García D S E (Eds). 2007 Enfermedades forestales en México/ Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo y CONAFOR- SEMARNAT, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, CONAFOR, FAO Chapingo, México. 587.
- Huberli D, Tommerup I C, Dobrowolski M P, Calver M C, and Hardy G E St J. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycol. Res.* 105:1053-1064. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61967-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61967-X)
- Jordan A P and Tainter F H. 1996. The susceptibility of Southern Appalachian Oaks to *Phytophthora cinnamomi*. *Department of Forest Resources, Cleson University, USA. Castanea* 61(4): 348-355. [http://www.jstor.org/stable/4033859?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/4033859?seq=1#page_scan_tab_contents)
- Jonsson U Jung T, Sonesson K, and Rosengren U. 2005. Relationships between health of *Quercus robur*, occurrence of *Phytophthora* species and site conditions in southern Sweden. *Plant Pathol.* 54: 502-511. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01228.x>
- Jeffer N, Martin JB. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70, 1038-1043. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-70-1038>
- Jung T, Colquhoun I J, Hardy G E St J. 2013. New insights into the survival strategy of invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in indifferent natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathol.* 43: 266-288. <http://dx.doi.org/10.1111/efp.12025>
- Martin R R, James D, Levesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* 38: 207-239. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.207>
- Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, y Lanou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58:409-424. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>
- O'Gara E, Hardy G E S, and Mc Comb J A. The ability of *Phytophthora cinnamomi* to infect through wounded periderm tissue of *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology* 45: 955-963. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1996.tb02906.x>
- Pérez M, 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European J Plant Sci Biotechnol* 2(1):1-24. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0806/EJPSB\\_2\(1\)/EJPSB\\_2\(1\)1-24o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0806/EJPSB_2(1)/EJPSB_2(1)1-24o.pdf)
- Philip A, O'Brien Nari Williams, and Giles E St J Hardy. 2009. Critical Review in *Microbiology* 35(3): 169-181.
- Podger F D. 1989. Comparative pathogenicity of fourteen Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* determined on transplants of Tasmanian temperate heathland. *Aust.J.Bot.* 37: 491-500. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9890491>
- Robin C, and Desprez-Loustau M L. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology (Buscar abreviatura)* 104: 465-475. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008649806620>
- Romero C S. 1998. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General de Patronato Universitario. 347 p
- Sánchez M E, Andicoberry S, and Trapero A. 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathol* 35: 115-125. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00392.x>
- Sánchez M E, Caetano P, Ferraz J, Trapero A. 2002b. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For. Path.* 32, 5-18. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00261.x>
- Sambrook J, and Russell D W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volumen 1*, 3rd. edition. Cold spring Harbour Laboratory Press, NY. USA. 234 p.
- Shew H D, and Benso D M. 1983. Influence of soil temperature and inoculum density of *Phytophthora cinnamomi* on root rot of Fraser fir. *Plant Dis.* 67:522-524. [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05\\_522.PDF](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05_522.PDF)
- SAS Intitute. 2012. GLM Procedure. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Tainter F H, O'Brien J G, Hernández A, Orozco and O Rebolledo. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Dis.* 84(4):394-398. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.394>
- Tamayo P J .2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4:52-71.
- Tsai H L, Huang L C, Ann P J, and Liou R F. 2006. Detection of orchid *Phytophthora* diseases by nested PCR. *Bot Bull. Acad. Sin.* 47: 379-387. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2006/4/Bot474-03.pdf>
- Téliz O D y Mora A J A. 2007. El manejo integral del aguacate. In Téliz, O D; Mora A. *El aguacate y su manejo integral 2a. ed*(Eds). Editorial Mundi-Prensa, Méx.D.F., p 287-306.
- Tippett J T, Hill T C, and Shearer B L. 1985. Resistance of *Eucalyptus* spp. to invasion by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* 33, 409-18. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9850409>
- Thompson S E, Levin S, and Rodriguez-Iturbe I. 2014. Rainfall and temperatures changes have confounding impacts on *Phytophthora cinnamomi* occurrence risk in the southwestern USA under climate change scenarios. *Glob. Chang. Biol.* 20 1299-1312. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcb.12463/abstract>
- Waterhouse G H. 1963 Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw Mycol. Inst. Kew. UK.* 92 p.
- White JCH, Bruns, T Lee S, Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P315-322 In: Innis, ma, Gel fand, D.H., Sninsky, J. J., White, J. J. PCR protocols A guide to methods and applications. Eds. Academic Press, Inc., New York. Pp:315-322
- Zentmyer G A. 1952. *Phytophthora cinnamomi* on avocado in México and Costa Rica and others avocado diseases in México. *Plant. Dis. Rep.* 36: 31 p.
- Zentmyer A G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograh. 10 APS.Press. St. Paul, MN. USA. 96 pp.
- Zentmyer G A, Mircetich S M. 1966. Saprophytims and persistence in soil by *Phytohthora cinnamomi*. *Phythopathology* 56:710-112.