



Revista Mexicana de Fitopatología
E-ISSN: 2007-8080
revmexfitopatologia@gmail.com
Sociedad Mexicana de Fitopatología,
A.C.
México

Álvarez-Rodríguez, Brando; Carrillo-Fasio, José Armando; García-Estrada, Raymundo
Saúl; Allende- Molar, Raúl; Santos- Cervantes, María Elena
Caracterización de *Phytophthora nicotianae* causante de tizón de vinca en áreas urbanas
y viveros de ornamentales en Culiacán, México
Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 34, núm. 3, septiembre, 2016, pp. 242-257
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.
Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61247022003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Characterization of *Phytophthora nicotianae* causing vinca blight in urban areas and ornamental nurseries in Culiacan, Mexico

Caracterización de *Phytophthora nicotianae* causante de tizón de vinca en áreas urbanas y viveros de ornamentales en Culiacán, México

Álvarez-Rodríguez Brando, Carrillo-Fasio José Armando, García-Estrada Raymundo Saúl, Allende-Molar Raúl*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. CIAD AC. Área de Horticultura. Km 5.5 Carr. Culiacán-Eldorado, Campo El Diez. Culiacán, Sinaloa, México. CP 80110 Tel. 6677605536; Santos-Cervantes María Elena. Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquin, Guasave, Sinaloa. CP 81101 Tel. 6878729626. Correo electrónico: msantos@ipn.mx. *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 06 de mayo de 2016

Aceptado: 08 de julio de 2016

Álvarez-Rodríguez B, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Santos-Cervantes ME. Characterization of *Phytophthora nicotianae* causing vinca blight in urban areas and ornamental nurseries in Culiacan, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 242-257.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-1)

Primera publicación DOI: 12 de Julio, 2016.

First DOI publication: July 12, 2016.

Resumen. Los objetivos de este estudio fueron obtener y caracterizar, mediante técnicas morfológicas y moleculares, aislados de *Phytophthora* asociados con tizón en plantas de vinca en áreas urbanas y viveros en Culiacán, México, determinar los tipos de compatibilidad sexual y evaluar la patogenicidad de los aislados. Los aislados desarrollaron micelio cenocítico y colonias algodonosas de color blanco en agar V8; clamidosporas (20 µm) intercalares y terminales, y esporangios papi-

Abstract. The aims of this study were to obtain and characterize, by morphological and molecular techniques, *Phytophthora* isolates associated with blight symptoms on vinca plants in urban areas and nurseries in Culiacan, Mexico, determine the mating types and evaluate the pathogenicity of isolates. Isolates developed white and cottony colonies with coenocytic mycelium on V8 agar; intercalary and terminal chlamydospores (20 µm) and papillate sporangia, round or oval (34.16 µm and 26.35 µm). The isolates were heterothallic: 21 isolates resulted A1 type and 18 isolates were A2 type. A group of representative isolates showed pathogenicity and caused vinca blight incidence between 13 and 66 %. The identity of the isolates was confirmed by analysis of nucleotidic sequences of the ITS region and nuclear genes as elongation factor (TEF-1α) and beta tubulin (β-Tub). The sequences, compared to the NCBI database, showed a high degree of identity with *P. nicotianae* (ITS, 98-100 %; TEF-1α, 99-100 %; βTub, 98-100 %) and phylogenetically

lados redondos a ovales (34.16 μm y 26.35 μm). Los aislados fueron heterotáticos: 21 del tipo de compatibilidad A1 y 18 del tipo A2. Un grupo de aislados representativos mostraron patogenicidad y causaron incidencia de tizón en vinca entre 13 y 66 %. La identidad de los aislados se confirmó por análisis de secuencias nucleotídicas de las regiones ITS y de los genes nucleares factor de elongación (TEF-1 α) y beta tubulina (β -Tub). Las secuencias, comparadas con la base de datos del NCBI, mostraron alto grado de identidad con *P. nicotianae* (ITS, 98-100 %; TEF-1 α , 99-100 %; β Tub, 98-100 %) y se agruparon filogenéticamente con cepas de referencia. La utilización de oligonucleótidos específicos resultó en una amplificación positiva para los aislados evaluados. Este es uno de los pocos estudios relacionado con enfermedades en plantas ornamentales en áreas urbanas en México.

Palabras clave: Oomicetes, enfermedades de plantas ornamentales, heterotalismo

El género *Phytophthora*, dentro de los oomicetes, incluye un grupo diverso de microorganismos fitopatógenos destructivos que infectan un amplio rango de hospedantes y causan considerables pérdidas económicas en ambientes naturales y agrícolas en todo el mundo (Erwin y Ribeiro, 1996). Más de 100 especies de *Phytophthora* han sido descritas (Martin *et al.*, 2012); algunas especies, son altamente especializadas a un hospedante y otras especies, como por ejemplo *P. nicotianae*, tienen un amplio rango de hospederos en cultivos agrícolas y plantas ornamentales.

Vinca rosea (L.) es una planta herbácea, también identificada como *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Es ornamental, resistente a altas temperaturas, humedad, sequía e infertilidad de suelos (Schubert y Leahy, 1989). Es ampliamente utilizada como planta de jardín y actualmente existen más

clustered with reference strains. The utilization of specific primers resulted in a positive amplification for the isolates tested. This is one of the few studies on plant diseases affecting ornamental plants in urban areas in Mexico.

Keywords: Oomycetes, ornamental plant diseases, heterothallism

The genus *Phytophthora*, within the oomycetes, includes a diverse group of destructive phytopathogenic microorganisms that infect a wide range of hosts and cause considerable economic losses in natural and agricultural environments worldwide (Erwin and Ribeiro, 1996). Over 100 species of *Phytophthora* have been described (Martin *et al.*, 2012); some species are highly specialized to one host and others, such as *P. nicotianae*, have a wide range of hosts in agricultural crops and ornamental plants.

Vinca rosea (L.) is a herbaceous plant, also identified as *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. It is ornamental, resistant to high temperatures, moisture, drought, and soil infertility (Schubert and Leahy, 1989). It is widely used as a garden plant and there are currently more than 100 hybrids developed (McGovern and Begeman, 1996). In addition, vinca plants have been identified as secondary hosts for many pathogenic microorganisms such as viruses, fungi, and oomycetes (Hagan, 2004), which affect fruit and vegetable crops such as papaya, tomato, peppers, and cucumber, among others (Haider *et al.*, 2007).

The disease known as blight and wilting in *V. rosea* plants is caused by *Phytophthora* spp., it progresses quickly and is present in warm and humid climates, particularly in summer, when humidity is high (Hao *et al.*, 2010). The symptoms of the disease begin with a gray color in the tips of infected tissues, which quickly become necrotic.

de 100 híbridos desarrollados (McGovern y Begeman, 1996); adicionalmente, las plantas de vinca se han identificado como hospedantes secundarios para muchos microorganismos fitopatógenos como virus, hongos y oomicetes (Hagan, 2004), los cuales afectan cultivos hortofrutícolas como papaya, tomate, chile y pepino, entre otros (Haider *et al.*, 2007).

La enfermedad conocida como tizón y marchitamiento en plantas de *V. rosea* es causada por *Phytophthora* spp., progresa rápidamente y se presenta en climas cálidos y húmedos especialmente en el verano cuando la humedad es alta (Hao *et al.*, 2010). Los síntomas de la enfermedad inician con una coloración gris en las puntas de los tejidos infectados, los cuales gradualmente se necrosan. Las lesiones progresan rápidamente y ocasionan un marchitamiento general de la planta (McGovern y Begeman, 1996). Varias especies, entre las que se incluyen *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea* y *P. tropicalis*, se han descrito como causantes de tizón y marchitez en plantas de vinca (McGovern y Begeman, 1996; McMillan y Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010).

La identificación y caracterización de *Phytophthora* spp. se basa principalmente en características morfológicas (Waterhouse, 1963): tipo de micelio, forma, tamaño y desarrollo de esporangios, producción de estructuras de reproducción sexual, así como la formación de clamidosporas (Pintos *et al.*, 2004). Debido a la variación morfológica intraespecífica, la identificación exacta de aislados es con frecuencia difícil, incluso para los especialistas. Por esta razón, las técnicas moleculares que analizan secuencias genéticas han ayudado a la identificación y delimitación de especies. En oomicetes, las regiones genómicas más comúnmente utilizadas para la identificación, a nivel de especie, son la región espaciadora interna transcrita (ITS) (Cooke *et al.*, 2000) y algunas regiones codifican-

Lesions progress quickly and cause a general wilting of the plant (McGovern and Begeman, 1996). Various species, including *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, and *P. tropicalis*, have been described as causing blight and wilting in vinca plants (McGovern and Begeman, 1996; McMillan and Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010).

The identification and characterization of *Phytophthora* spp. is based mainly on morphological characteristics (Waterhouse, 1963): type of mycelia, shape, size, and development of sporangia, production of sexual reproduction structures, as well as the formation of clamidospores (Pintos *et al.*, 2004). Due to the intraspecific morphological variation, the exact identification of isolates is frequently difficult, even for specialists. For this reason, the molecular techniques that analyze genetic sequences have helped to identify and demarcate species. In oomycetes, the genomic regions most commonly used for identification at the species level, are the internal transcribed spacer (ITS) (Cooke *et al.*, 2000) and some codifying regions of molecular genes, that include the factor of elongation 1- α (TEF-1 α) and beta tubulin (β -Tub) (Kroon *et al.*, 2004). Another promising region to develop specific oligonucleotides for species of *Phytophthora* is the gene YPT1 related to a RAS protein (Meng and Wang, 2010), since the non-codifying regions of this gene have displayed enough variation support the development of molecular markers for almost all the species of *Phytophthora* (Schena and Cooke, 2006).

In Culiacán, Sinaloa, ornamental vinca plants are common in parks and/or boulevard strips, home gardens, and ornamental nurseries. During the rainy season in the summer (June-August), it is common to find in plants symptoms of leaf blight and wilting. A previous report mentions the presence of *P. nicotianae* in vinca causing blight

tes de genes nucleares, que incluyen el factor de elongación 1- α (TEF-1 α) y beta tubulina (β -Tub) (Kroon *et al.*, 2004). Otra región prometedora para desarrollar oligonucleótidos específicos para especies de *Phytophthora* es el gen YPT1 relacionado con una proteína RAS (Meng y Wang, 2010), ya que las regiones no codificantes de este gen han mostrado suficiente variación para fundamentar el desarrollo de marcadores moleculares para casi todas las especies de *Phytophthora* (Schena y Cooke, 2006).

En Culiacán, Sinaloa, las plantas ornamentales de vinca son comunes en parques y/o camellones urbanos, jardines en casas y viveros de plantas ornamentales. Durante la época de lluvia en verano (junio-agosto) es común observar en las plantas síntomas de tizones de hoja y marchitez. Un reporte previo menciona la presencia de *P. nicotianae* en vinca causando tizón (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013); sin embargo, se desconoce si es la única especie por lo que los objetivos de este estudio fueron obtener y caracterizar, mediante técnicas morfológicas y moleculares, las especies de *Phytophthora* asociadas al tizón en plantas de vinca, determinar los tipos de compatibilidad sexual y evaluar la patogenicidad en los aislados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del agente causal de tizón y marchitez en vinca

Se colectaron muestras de plantas enfermas creciendo en jardines urbanos y viveros de plantas ornamentales en Culiacán. Muestras de tejidos infectados se colocaron en bolsas de plástico y se trasladaron al laboratorio para realizar el aislamiento de las especies de *Phytophthora* asociadas a la enfermedad. En el laboratorio, pequeñas porciones

(Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013); however, we are not sure if it is the only species, therefore the aims of this study were to find and characterize, using morphological and molecular techniques, the species of *Phytophthora* related to blight in vinca plants, to determine the types of sexual compatibility, and to evaluate the pathogenicity in the isolations obtained.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the causal agent of blight and wilting in vinca

Samples of diseased plants were taken from urban gardens and ornamental nurseries in Culiacan. Samples of infected tissues were placed in plastic bags and taken to the laboratory to isolate the *Phytophthora* species related to the disease. In the lab, small portions of infected plant tissue were washed with distilled water, disinfected with sodium hypochlorite at 0.5 % for 1 min and finally placed in Petri dishes with a V8 agar culture medium (840 ml distilled water, 163 ml V8 juice, 3 g of CaCO₃ and 18 g bacteriological agar), which were kept at room temperature for 72 h.

Morphological characterization

The isolations were reactivated in a V8 agar culture medium. Once the mycelium developed, permanent preparations were made using lactophenol and placed for observation under a microscope (Carl Zeiss Axiostar Imager A2). Each isolation was purified with the technique of transference of hyphal tips (Donahoo and Lamour, 2008). To induce the growth of sporangia, cuts were made on the colony under growth and the plate was flooded with sterile distilled water. The plates were

de tejido vegetal infectado se lavaron con agua destilada, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5 % por 1 min y finalmente se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo agar V8 (840 ml de agua destilada, 163 ml de jugo V8, 3 g de CaCO_3 y 18 g de agar bacteriológico), las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente por 72 h.

Caracterización morfológica

Los aislados se reactivaron en medio de cultivo agar V8, una vez que se desarrolló el micelio, se realizaron preparaciones permanentes con lactofenol y fueron observadas en un microscopio (Carl Zeiss AxioStar Imager A2). La purificación de cada aislado se realizó mediante la técnica de transferencia de puntas de hifa (Donahoo y Lamour, 2008). Para inducir el desarrollo de esporangios, se realizaron cortes en la colonia en crecimiento y la placa se inundó con agua destilada estéril. Las placas se incubaron por 3 días a temperatura ambiente (Martin *et al.*, 2012). La presencia de esporangios fue revisada en un microscopio biológico adaptado con una cámara, una vez que se produjeron los esporangios se retiró el agua y se agregó a las placas fucsina acida al 2% para teñirlos. Después de 24 h se tomaron muestras y se observaron al microscopio para registrar las medidas de esporangios y otras estructuras.

La presencia de clamidosporas se observó en medio a base de zanahoria (200 g de zanahoria, 20 g de agar bacteriológico y 1 L de agua destilada). Los aislados crecieron en el medio a base de zanahoria y se incubaron por 15 días a 25 °C en la oscuridad (Mirsoleimani y Mostowfizadeh-Ghalemfarsa, 2013); después de este tiempo, las observaciones se realizaron bajo el microscopio para registrar la presencia y tamaño de las clamidosporas.

Para determinar el tipo de compatibilidad y registrar la formación de estructuras de reproducción

incubated for 3 days at room temperature (Martin *et al.*, 2012). The presence of sporangia was observed under a biological microscope adapted with a camera. Once the sporangia were produced, the water was removed and acid fuchsin was added to the plates at 2 % to stain them. Samples were taken after 24 h and observed under the microscope to record the measurements of sporangia and other structures.

Chlamydospores were observed in a carrot-based medium (200 g of carrot, 20 g of bacteriological agar, and 1 L of distilled water). The isolates grew in the carrot-based medium and were incubated for 15 days at 25 °C in the dark (Mirsoleimani and Mostowfizadeh-Ghalemfarsa, 2013); after this time, they were observed under the microscope and the presence and size of chlamydospores were recorded.

To determine the type of compatibility and record the formation of structures of sexual reproduction, each isolate was confronted with reference strains A1 and A2 of *P. nicotianae* in V8 culture medium; an agar disc with mycelia in active growth of each isolate, 0.5 cm in diameter, was placed approximately 1 cm away from agar discs with mycelia in active growth of reference strains A1 and A2 of *P. nicotianae*. The plates were incubated for 15 days at 25 °C and then the presence/absence of oospores was recorded, as well as the characteristics of oogonia and antheridia (Javier-Alva and Mattos, 2006; Waterhouse, 1963).

Molecular identification

The mycelia of the isolates was grown in a PD (potato-dextrose) liquid medium, and stored at -20 °C. The DNA was extracted using the protocol proposed by Zelaya-Molina *et al.* (2011), which consists of a series of washings with chloroform-isoamyl alcohol. A group of 10

sexual, cada aislado se confrontó con cepas de referencia A1 y A2 de *P. nicotianae* en medio de cultivo V8; un disco de 0.5 cm de diámetro de agar con micelio en crecimiento activo de cada aislado se colocó a una distancia aproximada de 1 cm de distancia de discos de agar con micelio en crecimiento activo de las cepas de referencia A1 y A2 de *P. nicotianae*. Las placas se incubaron por 15 días a 25 °C y entonces se registró la presencia/ausencia de oosporas, así como las características de oogonios y anteridios (Javier-Alva y Mattos, 2006; Waterhouse, 1963).

Identificación molecular

El micelio de los aislados se desarrolló en medio líquido PD (papa-dextrosa), y se almacenó a -20 °C. El ADN se extrajo utilizando el protocolo propuesto por Zelaya-Molina *et al.* (2011), el cual consiste en una serie de lavados con cloroformo-alcohol isoamílico. Un grupo de 10 aislados representativos que comparten características morfológicas se utilizaron para amplificar el ADN con los pares de oligonucleótidos ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') y ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGATGACCATG-3') para TEF-1 α , TUBUF2 (5'-CGGTAACAACCTGGGCCAAGG-3') y TUBUR1 (5'-CCTGGTACTGCTGGTACTCAG-3') para beta tubulina (Kroon *et al.*, 2004) y los oligonucleótidos DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para la región ITS (Bonants *et al.*, 1997).

Las condiciones para efectuar la PCR usando los oligonucleótidos para TEF-1 α y β -Tub consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, después 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 1 min, elongación a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min. Las condiciones de amplificación con los oligonucleótidos para ITS fueron

representative isolates that share morphological characteristics were used to amplify the DNA with the pairs of oligonucleotides ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') and ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGATGACCATG-3') for TEF-1 α , TUBUF2 (5'-CGGTAACAACCTGGGCCAAGG-3') and TUBUR1 (5'-CCTGGTACTGCTGGTACTCAG-3') for beta tubuline (Kroon *et al.*, 2004) and the oligonucleotides DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for the region ITS (Bonants *et al.*, 1997).

The conditions to carry out the PCR using the oligonucleotides for TEF-1 α and β -Tub consisted of an initial denaturalization at 95 °C for 2 min, followed by 35 denaturalization cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 60 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The conditions of amplification with the oligonucleotides for ITS were 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

The specific oligonucleotides for the species *P. nicotianae*, Pn1 (5'-GACTTTGTAAAGTGCCACCATAC-3') and Pn2 (5'-CTCAGCTCTTTTCCTTGGATCT-3') (Meng and Wang, 2010), were used under the following conditions of PCR: 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 1 min, alignment at 58 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

Phylogenetic analysis and sequencing

The PCR products obtained from the genes ITS, TEF-1 α and β -Tub were purified using the kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), following the specifications described

94 °C por 3 min, después 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Los oligonucleótidos específicos para la especie *P. nicotianae*, Pn1 (5'-GACTTTGTAAGTGCCAC-CATAC-3') y Pn2 (5'-CTCAGCTCTTTTCCTT-GGATCT-3') (Meng y Wang, 2010), se utilizaron bajo las siguientes condiciones de PCR: 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, alineamiento a 58 °C por 1 min, elongación a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR obtenidos de los genes ITS, TEF-1 α y β -Tub se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las especificaciones descritas por el proveedor. La secuenciación se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias fueron editadas con el programa CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Qld, Australia), y comparadas con secuencias del Banco de Genes (GenBank, siglas en inglés) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, siglas en inglés) utilizando el software alineamiento local básico de nucleótidos (BLAST-N, siglas en inglés) y el algoritmo Megablast. Para el alineamiento múltiple y análisis filogenético de cuatro secuencias de aislados representativos se utilizó el software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias fueron alineadas con otras 22 pertenecientes a diferentes especies de *Phytophthora* (Cuadro 1) utilizando el programa MUSCLE integrado en MEGA (Edgar, 2004), usando los valores por default para la penalización por apertura y extensión de gaps y con posterior co-

by the supplier. Sequencing was carried out by capillary electrophoresis with an automatic sequencer ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), in the Unit of Molecular Biology of the Cell Physiology Institute of the UNAM. The sequences were edited using the program CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Qld, Australia), and compared with sequences of the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST-N) and the Megablast algorithm. For the multiple alignment and phylogenetic analysis of four sequences of representative isolations, we used the software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). The sequences were aligned with another 22 belonging to different species of *Phytophthora* (Table 1) using the program MUSCLE integrated in MEGA (Edgar, 2004), using the default values for the penalization for opening and extension of gaps and with the later manual correction of the alignment. The alignments underwent the nucleotide substitution model selection program in order to select the evolutionary model that best fit the data. For the phylogenetic reconstruction we used the maximum verisimilitude model and the Tamura-Nei model. The variation of rates between sites was modeled by a gamma distribution plus invariable sites (4 categories). The support of the internal topology of the dendrograms was determined by bootstrap analysis with 1000 re-sampling (Felsenstein, 1985). Linked alignments were carried out on the 3 markers using the software DAMBE 6.1.23 (Xia, 2013) and a phylogenetic tree was constructed as described earlier.

Pathogenicity evaluation

Ten-week old vinca plants were inoculated by spraying a suspension of zoospores of 1×10^4

Cuadro 1. Especies, cepas y número de accesoión de secuencias utilizadas para el análisis filogenético.**Table 1.** Species, strains, and accession numbers of sequences used for the phylogenetic analysis.

Especie	Identificación del aislado	No. de acceso en GeneBank		
		ITS	β -Tub	TEF <i>I</i> - α
<i>P. alni</i>	P10568	FJ801456	EU080606	EU080607
<i>P. brassicae</i>	CBS 179.87	AF380148	EU080790	EU080791
<i>P. cambivora</i>	ATCC46719	HQ261516	EU080551	EU080552
<i>P. capsici</i>	P1319	HQ261519	EU079737	EU079738
<i>P. cinnamomi</i>	P3232	HQ261526	EU079798	EU079799
<i>P. citricola</i>	P10458	FJ802050	EU079582	EU079583
<i>P. citrophthora</i>	P6310	JN618789	EU080538	EU080539
<i>P. cryptogea</i>	CBS 290.35	HQ6432126	EU080447	EU080448
<i>P. erythroseptica</i>	CBS 956.87	HQ643224	EU079828	EU079829
<i>P. fragariae</i>	P1435	HQ261564	EU079744	EU079745
<i>P. ilicis</i>	P6860	HQ261580	EU080137	EU080138
<i>P. insolita</i>	P6195	HQ261591	EU080176	EU080177
<i>P. katsurae</i>	P3389	HQ261600	EU079815	EU079816
<i>P. sp. "kelmania"</i>	P10613	HQ261692	EU079606	EU079607
<i>P. lateralis</i>	P1728	FJ802092	EU080090	EU080091
<i>P. meadii</i>	CBS 219.88	HQ643268	AY564077	AY564133
<i>P. nemorosa</i>	P10288	HQ261628	EU079475	EU079476
<i>P. nicotianae</i>	P7146	HQ261629	EU079556	EU079557
<i>P. nicotianae</i>	P10116	FJ801280	EU079963	EU079964
<i>P. nicotianae</i> *	OVH	KF147897	KF290380	KF290387
<i>P. nicotianae</i> *	OV2R	KF147895	KF290383	KF290391
<i>P. nicotianae</i> *	OV5N	KF147901	KF290386	KF290393
<i>P. nicotianae</i> *	OV11	KC248201	KC248203	KC248205
<i>P. palmivora</i>	P0255	HQ261635	EU080339	EU080340
<i>P. primulae</i>	P10333	HQ261650	EU080399	EU080400
<i>P. syringae</i>	P10332	HQ261715	EU079764	EU079765

* aislados de este estudio / * isolates of this study.

rección manual del alineamiento. Los alineamientos fueron sometidos al programa de selección del modelo de sustitución nucleotídica, para seleccionar el modelo evolutivo que mejor se ajustara a los datos. Para la reconstrucción filogenética se utilizó el método de máxima verosimilitud y el modelo Tamura-Nei. La variación de tasas entre sitios fue modelada por una distribución gamma más sitios invariables (4 categorías). El soporte de la topología interna de los dendrogramas fue determinado por análisis de bootstrap con 1000 remuestreos (Felsenstein, 1985). Se realizaron alineamientos conca-

zoospores/ml of 10 representative isolates from different sampling sites. Three pots containing 5 plants each were inoculated with isolate. Plants inoculated with only sterile distilled water were used as a control treatment. All plants were kept in a shade mesh area at 25 °C and 80-90 % relative humidity. Once the symptoms developed in the inoculated plants, the pathogen was reisolated and the incidence of the disease was quantified.

RESULTS AND DISCUSSION

tenados de los 3 marcadores utilizando el software DAMBE 6.1.23 (Xia, 2013) y un árbol filogenético fue construido como se describió previamente.

Evaluación de patogenicidad

Plantas de vinca de 10 semanas de edad se inocularon al asperjar una suspensión de zoosporas de 1×10^4 zoosporas/ml de 10 aislados representativos provenientes de distintos sitios de colecta. Tres macetas que contenían 5 plantas cada una, se inocularon con cada aislado. Plantas inoculadas sólo con agua destilada estéril se utilizaron como un tratamiento testigo. Todas las plantas se mantuvieron en un área de malla sombra a 25 °C y 80-90 % de humedad relativa. Una vez que se desarrollaron los síntomas en las plantas inoculadas, se realizó el reaislamiento del patógeno y se cuantificó la incidencia de la enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

Se obtuvieron 39 aislados de *Phytophthora* sp. provenientes de plantas de vinca con síntomas de tizón y marchitez (Figura 1A); 77 % provinieron de viveros de plantas ornamentales y 23 % de plantas en jardines y áreas urbanas. Los aislados produjeron micelio cenocítico y colonias algodonosas de color blanco en agar V8; crecieron entre 7 y 30 °C (temperatura óptima 25 °C); desarrollaron esporangios persistentes, terminales de forma oval o alimonada, principalmente papilados (Figura 1B) que midieron en promedio 34.16 µm de longitud y 26.35 µm de ancho (n=24). Waterhouse (1963) menciona que el rango del tamaño de esporangios de *P. nicotianae* se encuentra alrededor de 25-50 x 20-40 µm; mientras que, Erwin y Ribeiro (1996)

Morphological identification

Thirty-nine *Phytophthora* sp. isolates were obtained from vinca plants with symptoms of blight and wilting (Figure 1A); 77 % came from ornamental nurseries and 23 % came from urban areas. The isolations produced coenocytic mycelia and white cotton-like colonies in V8 agar; they grew between 7 and 30 °C (optimum temperature 25 °C); they developed persistent sporangia, oval or lemon shaped terminals, mainly papillate (Figure 1B) with a average of 34.16 µm in length and 26.35 µm in width (n=24). Waterhouse (1963) mentions that the range of the size of *P. nicotianae* sporangia is around 25-50 x 20-40 µm; meanwhile, Erwin and Ribeiro (1996) reported ranges of 11-60 x 20-45 µm. A proportion in length/width of 1.29 µm (n=24) was observed in the sporangia, similar to the proportion of 1.3 described by Erwin and Ribeiro (1996) for *P. nicotianae*. All isolations displayed intercalary and terminal chlamydospores (Figure 1D), which is a characteristic of *P. nicotianae* (Waterhouse, 1963; Erwin and Ribeiro, 1996).

Sexual compatibility

The isolations were heterothallic, 21 of a compatibility type A1 and 18 of compatibility type A2 (Table 2). The interaction between compatibility types A1 and A2 produced anaplerotic oospores (Figure 1C), with spherical and flat oogonia, and amphiginous antheridia. These characteristics are consistent with *P. nicotianae* according to Waterhouse (1963), and Erwin and Ribeiro (1996). In some sampling sites, both types of compatibility were found, which suggests the presence of sexual recombination; this would increase the genetic variability of the population and could cause the appearance of highly pathogenic isolates (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004; Blaya

reportaron rangos de 11-60 x 20-45 μm . Una proporción largo/ancho de 1.29 μm (n=24) se observó en los esporangios, similar a la proporción de 1.3 descrita por Erwin y Ribeiro (1996) para *P. nicotianae*. Todos los aislados mostraron la presencia de clamidosporas intercalares y terminales (Figura 1D), lo cual es una característica de *P. nicotianae* (Waterhouse, 1963; Erwin y Ribeiro, 1996).

Compatibilidad sexual

Los aislados fueron heterotáticos, 21 de tipo de compatibilidad A1 y 18 tipo de compatibilidad A2 (Cuadro 2). La interacción entre los tipos de compatibilidad A1 y A2 produjeron oosporas apaléroticas (Figura 1C), con oogonios esféricos y lisos, y anteridios anfiginos. Estas características son consistentes con *P. nicotianae* según Waterhouse (1963) y Erwin y Ribeiro (1996).

En algunos sitios de muestreo se encontraron los dos tipos de compatibilidad, lo cual sugiere que existe recombinación sexual; esto incrementaría la variabilidad genética de la población y podría cau-

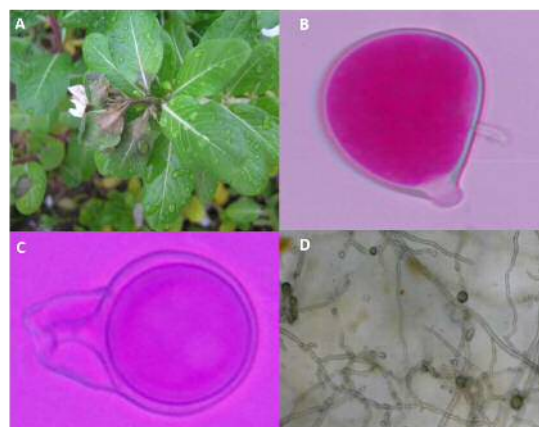


Figura 1. Síntomas de tizón en vinca y estructuras reproductivas de *P. nicotianae*. A. Tizón en planta de vinca, B. Esporangio papilado, C. Oospora, D. Clamidosporas.

Figure 1. Blight symptoms in vinca and *P. nicotianae* reproductive structures. A. Blight in a vinca plant, B. Papillate sporangium, C. Oospore, D. Chlamydospores.

et al., 2015). An important observation was the presence of both types of compatibility in three out of the four nurseries observed, which means that recombination could take place in this site, and that

Cuadro 2. Sitios de muestreo y tipo de compatibilidad en aislados de *P. nicotianae* causante de tizón y marchitez en plantas de *Vinca rosea* en Culiacán.

Table 2. Sampling sites and type of compatibility in *P. nicotianae* isolates, source of blight and wilting in *Vinca rosea* plants in Culiacan.

Sitio de muestreo	Aislados	Tipo de compatibilidad
Vivero 3 Ríos	OV-A, OV-B, OV-E, OV-F, OV-G	A1
Vivero 3 Ríos	OV-C, OV-D, OV-5N	A2
Vivero tienda comercial	OV-H	A2
Vivero Lomas	OV-I, OV-J, OV-N	A2
Vivero Lomas	OV-K, OV-M	A1
Vivero Chinchorro	OV-P, OV-R, OV-S, OV-T, OV-W, OV-Z	A1
Vivero Chinchorro	OV-U, OV-V, OV-X, OV-Y	A2
Colonia Bugambilias	OV-4	A2
Colonia Bugambilias	OV-11	A1
Vivero Pedro Infante	OV-2F, OV-2G, OV-2H, OV-2I, OV-2J, OV-2R	A1
Colonia Aguaruto	OV-3B	A1
Colonia Obrero Campesina	OV-3T, OV-3U, OV-3W	A2
Colonia Villa Universidad	OV-4X, OV-4Y, OV-5A	A2

sar la aparición de aislados altamente patogénicos (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004; Blaya *et al.*, 2015). Una observación importante fue la presencia de los dos tipos de compatibilidad en tres de los cuatro viveros muestreados, lo que significa que podría ocurrir recombinación en este sitio y que al venderse algunas plantas con infecciones iniciales, éstas representarían un factor de dispersión en la región.

Identificación molecular

Un fragmento de aproximadamente 1300 pb se obtuvo cuando se utilizaron los oligonucleótidos DC6/ITS4 en los diez aislados seleccionados. Los productos se secuenciaron y se compararon con secuencias depositadas en el NCBI. Los porcentajes de homología fluctuaron entre 98-100 % con la especie *P. nicotianae*. Los oligonucleótidos ELONGF1/ELONGR1 generaron un fragmento de aproximadamente 1000 pb, los productos se secuenciaron y cuando se compararon las secuencias se obtuvo una homología entre 99-100 % con *P. nicotianae*. Los oligonucleótidos TUBUF2/TUBUR1 generaron un fragmento de aproximadamente 1000 pb, y sus secuencias mostraron una homología entre 98-100 % con *P. nicotianae*. Las secuencias de las distintas regiones amplificadas fueron depositadas en el NCBI (Cuadro 3).

Los oligonucleótidos Pn1/Pn2 específicos para *P. nicotianae* amplificaron un fragmento de aproximadamente 400 pb en todos los aislados (Figura 2). Estos resultados fueron los esperados para *P. nicotianae* (Meng y Wang, 2010). La utilización de estos oligonucleótidos específicos puede ser una estrategia rápida para identificar esta especie.

La reconstrucción filogenética resultante de la concatenación de los tres marcadores mostró que los cuatro aislados analizados en el presente estudio se agruparon en el mismo clado que las cepas de referencia de *P. nicotianae* (Figura 3; 100 % de

if plants with initial infections were to be sold, they would be a factor of dispersion in the region.

Molecular identification

A fragment of approximately 1300 pb was obtained when oligonucleotides DC6/ITS4 were used in the ten isolates selected. The products were sequenced and compared with sequences deposited in the NCBI. Homology percentages ranged between 98 and 100 % with the species *P. nicotianae*. Oligonucleotides ELONGF1/ELONGR1 generated a fragment of approximately 1000 pb; the products were sequenced and when the sequences were compared, a homology was obtained between 99 and 100 % with *P. nicotianae*. Oligonucleotides TUBUF2/TUBUR1 generated a fragment of approximately 1000 pb, and its sequences displayed a homology between 98 and 100 % with *P. nicotianae*. The sequences of the different amplified regions were deposited in the NCBI (Table 3).

The oligonucleotides Pn1/Pn2 specific to *P. nicotianae* amplified a fragment of approximately 400 pb in all the isolates (Figure 2). These results were expected for *P. nicotianae* (Meng and Wang, 2010). The use of these oligonucleotides can be a quick strategy to identify this species.

The phylogenetic reconstruction resulting from linking the three markers showed that the four isolates analyzed in this study were grouped in the same clade as the reference strains of *P. nicotianae* (Figure 3; 100 % bootstrap), belonging to clade 1 of species of *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000; Kroon *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2008). The analyses of the individual partial sequences of each marker showed low percentages of support of the internal topology of the dendrograms compared with the values resulting from linking the 3 loci under analysis. With the sequences obtained in this study,

Cuadro 3. Acciones de secuencias de tres loci depositadas en GenBank de aislados de *P. nicotianae* obtenidos de *V. rosea* de zonas urbanas en Culiacán e incidencia de infección en experimento de patogenicidad.

Table 3. Actions of sequences of three loci deposited in the GenBank of *P. nicotianae* isolates obtained from *V. rosea* in urban areas in Culiacán and incidence of infection in pathogenicity experiment.

Aislado	Número de acceso en GenBank			% de incidencia
	β -Tub	TEF <i>I</i> - α	ITS	
OV5N	KF290386	KF290393	KF147901	40
OV4X	KF290382	KF290390	KF147900	46.7
OV3B	KF290384	KF290388	KF147899	40
OVR	KF290381	KF290394	KF147898	53.3
OVH	KF290380	KF290387	KF147897	20
OVF	KF290379	KF290392	KF147896	13.3
OV2R	KF290383	KF290391	KF147895	66.7
OV4	KC248204	KC248206	KC248202	66.7
OV11	KC248203	KC248205	KC248201	66.7
OV3W	KF290385	KF290389	ND	60

B-Tub = beta tubulina, TEF *I*- α = factor de elongación, ITS= región espaciadora interna transcrita ND= no determinado / B-Tub = beta tubulin, TEF *I*- α = elongation factor, ITS= internal transcribed spacer region, ND= not determined.

bootstrap), perteneciente al clado 1 de especies de *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000; Kroon *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2008). Los análisis de las se-

individual alignments were carried out for each marker used (ITS, β Tub and TEF *I*- α). Later, the 3 alignments were linked (1589 pb) and a similarity

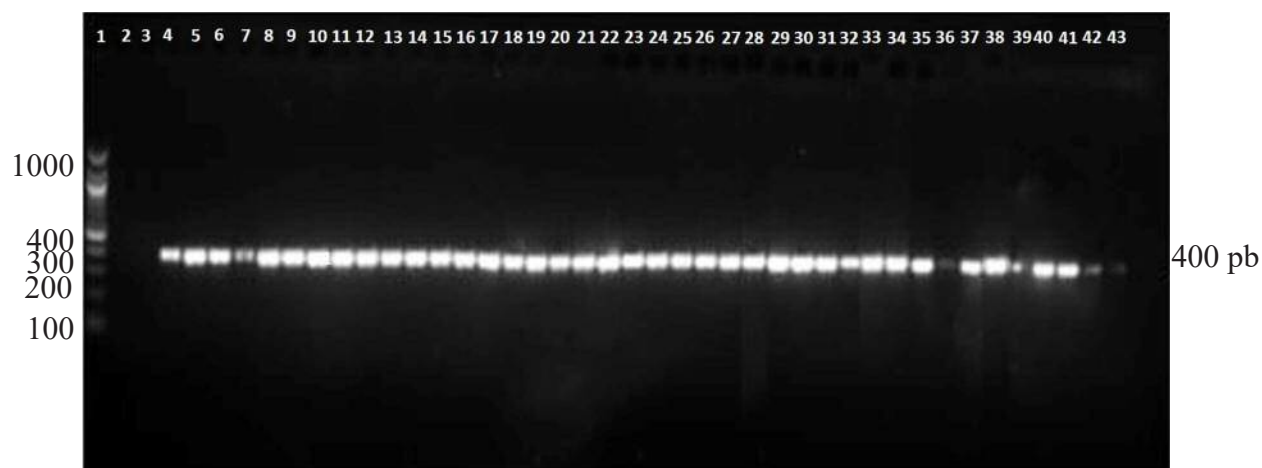


Figura 2. Fragmento amplificado de ADN con los oligonucleótidos Pn1-Pn2 específicos para *P. nicotianae*. Línea 1, Marcador molecular 100 bp; Línea 2, agua; Línea 3, control negativo (*P. capsici*); Línea 4, *P. nicotianae* control positivo, Líneas 5-43 aislados de *P. nicotianae* de *Vinca rosea*.

Figure 2. Amplified DNA fragment with the oligonucleotides Pn1-Pn2 specific to *P. nicotianae*. Line 1, Molecular marker 100 bp; Line 2, water; Line 3, negative control (*P. capsici*); Line 4, *P. nicotianae* positive control, Lines 5-43 *P. nicotianae* isolated from *Vinca rosea*.

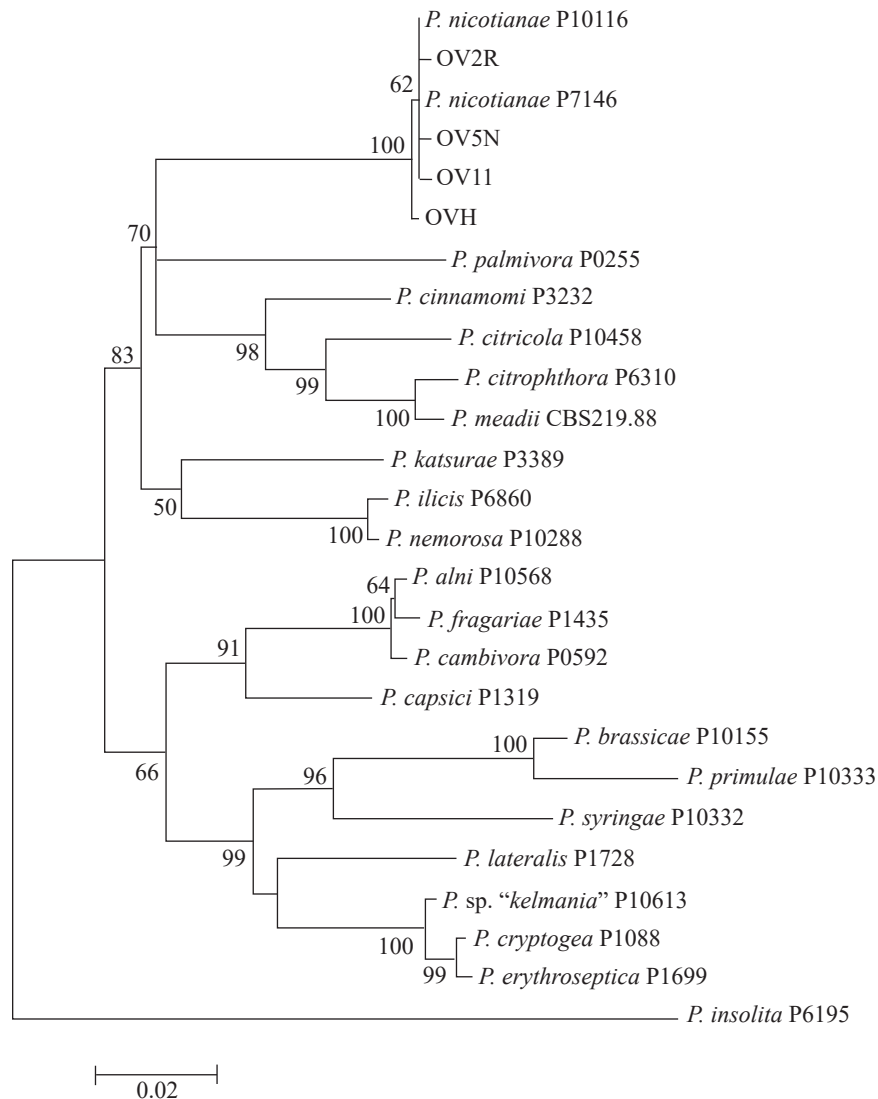


Figura 3. Árbol filogenético de aislamientos representativos del presente estudio (OV2R, OV5N, OV11 y OVH) y 22 cepas de referencia de *Phytophthora* derivado de las secuencias parciales de tres loci (ITS, β Tub y TEF *1- α*). El árbol fue construido con el software MEGA 6.06 (bootstrap=1000), utilizando el modelo de sustitución Tamura-Nei (TN93 G+I). Los valores bootstrap están mostrados sobre las ramas.

Figure 3. Phylogenetic tree diagram of representative isolates of this study (OV2R, OV5N, OV11, and OVH) and 22 reference strains of *Phytophthora* derived from the partial sequences of three loci (ITS, β Tub, and TEF *1- α*). The tree was created using the software MEGA 6.06 (bootstrap=1000), using the Tamura-Nei substitution model (TN93 G+I). The bootstrap values are shown on the branches.

cuencias parciales individuales de cada marcador mostraron bajos porcentajes de soporte de la topología interna de los dendrogramas comparados con los valores resultantes de la concatenación de los

was found of 99.6 to 100 % between sequences, therefore not all sequences are equal; 11 differences were found between nucleotides and 2 gaps per insertions of nucleotides (Data not shown). Future

3 loci bajo análisis. Con las secuencias obtenidas en el presente estudio, se realizó el alineamiento individualmente por cada marcador utilizado (ITS, β Tub y TEF *1- α*), posteriormente se concatenaron los 3 alineamientos (1589 pb) y se encontró una similitud entre el 99.6 y 100 % entre las secuencias, por lo que no todas las secuencias son iguales, se encontraron 11 diferencias entre nucleótidos y 2 gaps por inserciones de nucleótidos (Datos no mostrados). En un estudio futuro se podría estimar la diversidad genética de poblaciones de *Phytophthora nicotianae* al analizar un mayor número de aislados, de diferentes regiones y años de colecta para enriquecer el estudio y correlacionarla con las características fenotípicas del patógeno.

Evaluación de patogenicidad

Los 10 aislados evaluados en los ensayos de patogenicidad causaron los síntomas de la enfermedad en plantas de *V. rosea*. Los síntomas iniciales de la enfermedad se observaron a los 4 días posteriores a la inoculación e incluyeron tizón de hojas. Después, las plantas desarrollaron síntomas de marchitez y murieron a los 12 días posteriores a la inoculación. Todos los aislados fueron virulentos, infectaron plantas sanas de vinca; sin embargo, existió una variación en el nivel de incidencia, ya que el porcentaje de plantas con síntomas fluctuó entre 13 y 66.7 % (Cuadro 3). Las cepas inoculadas fueron reaisladas de plantas inoculadas.

Es importante mencionar que *P. nicotianae* infecta más de 300 hospedantes diferentes entre los que se incluyen *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* (Erwin y Ribeiro 1996). Por ello, no podemos descartar que la especie *P. nicotianae* encontrada en plantas de vinca en el área urbana, también esté causando algunas infecciones en el área hortícola del valle de Culiacán, la cual se basa principalmente en la producción de tomate y chi-

studies could estimate the genetic diversity of *Phytophthora nicotianae* populations by analyzing a greater number of isolates from different regions and years of collection in order to enrich the study and correlate it with the phenotypical characteristics of the pathogen.

Pathogenicity evaluation

The 10 isolates evaluated in the pathogenicity tests caused the symptoms of the disease in *V. rosea* plants. The initial symptoms of the disease were observed 4 days after inoculation and included leaf blight. Afterwards, plants developed symptoms of wilting and died 12 days after inoculation. All isolations were virulent, they infected healthy vinca plants, although there was a variation in the incidence level, since the percentage of plants with symptoms fluctuated between 13 and 66.7 % (Table 3). Inoculated strains were reisolated from inoculated plants.

It is important to mention that *P. nicotianae* infects more than 300 different hosts, including *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annuum* (Erwin and Ribeiro 1996). For this reason, we cannot discard that the species *P. nicotianae* found in vinca plants in urban areas is also causing some infections in the vegetable-growing area of the Culiacan valley, which is based largely on the production of tomatoes and peppers. Although diverse species of *Phytophthora* have been reported as causal agents of blight and wilting in vinca (McGovern and Begeman, 1996; McMillan and Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010), the morphological, phylogenetic, and pathogenic analysis performed in this investigation shows that *P. nicotianae* is responsible for the damages inflicted on this ornamental plant in the samples gathered in the city of Culiacan.

le. Aunque diversas especies de *Phytophthora* han sido reportadas como causantes de tizón y marchitez en vinca (McGovern y Begeman, 1996; McMillan y Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010), el análisis morfológico, filogenético y patogénico realizado en esta investigación demuestra que *P. nicotianae* es la responsable de los daños observados en esta planta ornamental en las muestras colectadas en la ciudad de Culiacán.

CONCLUSIONES

Phytophthora nicotianae fue la única especie asociada al tizón y muerte de plantas de vinca en la ciudad de Culiacán. La caracterización molecular indicó que las secuencias nucleotídicas en las regiones TEF 1- α , β -Tub e ITS mostraron 98-100 % de homología con la especie *P. nicotianae* y se agruparon filogenéticamente con cepas de referencia de esta especie. Todos los aislados fueron detectados por los oligonucleótidos Pn1/Pn2 específicos para *P. nicotianae*. Los postulados de Koch demostraron la patogenicidad de los aislados sobre vinca. Este es uno de los pocos estudios enfocados en enfermedades de plantas ornamentales en áreas urbanas en el Noroeste de México.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento a los estudios de Brando Álvarez Rodríguez

LITERATURA CITADA

- Alvarez-Rodriguez B, Ortiz-Meza JA, Rojo-Baez I, Márquez-Zequera I, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA and Allende-Molar R. 2013. First report of vinca blight caused by *Phytophthora nicotianae* in Northwestern Mexico. Plant Disease 97:1257. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0400-PDN>
- Blair JE, Coffey MD, Park S-Y, Geiser DM and Kang S.

CONCLUSIONS

Phytophthora nicotianae was the only species associated with blight and death of vinca plants in the city of Culiacan. The molecular characterization indicated that the nucleotide sequences in the regions TEF 1- α , β -Tub, and ITS showed a homology of 98-100 % with the species *P. nicotianae* and they were grouped phylogenetically with reference strains of this species. All the isolates were detected by the oligonucleotides Pn1/Pn2 specific to *P. nicotianae*. The Koch postulates showed the pathogenicity of the isolations on vinca. This is one of the few studies focused on ornamental plant diseases in urban areas in Northwestern Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT for funding Brando Álvarez Rodríguez's studies.

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

2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45:266-277. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fgb.2007.10.010>.
- Blaya J, Lacasa C, Lacasa A, Martínez V, Santísima-Trinidad AB, Pascual JA and Ros M. 2015. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates in southeast Spain and their detection and quantification through a real-time TaqMan PCR. Journal of Science Food and Agriculture 95:1243-1251. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/jsfa.6813>.
- Bonants P, Hagenaar-de Weerd M, van Gent-pelzer M, Lacourt I, Cooke D and Duncan J. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 103:345-355. <http://dx.doi.org/doi:10.1023/A:1008640227432>
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G and Brasier CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30:17-32. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Donahoo RS and Lamour KH. 2008. Characterization of *Phytophthora* species from leaves of nursery woody ornamentals in Tennessee. HortScience 43:1833-1837. Disponible en línea: <http://hortsci.ashspublishations.org/content/43/6/1833.full.pdf+html>
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment

- with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Erwin D, and Ribeiro O. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. The American Phytopathological Society. 562 Pp.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. Disponible en línea: <http://statweb.stanford.edu/~nzhang/Stat366/Felsenstein85.pdf>
- Hagan A. 2004. Diseases of annual vinca in the greenhouse and landscape. Alabama Cooperative Extension System ANR-1023 6 pag. Disponible en línea: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1023/ANR-1023.pdf>
- Haider M, Tahir M, Saeed A, Shah A, Rashid N, Javed M and Iqbal J. 2007. *Vinca minor*, another host of a tomato infecting begomovirus in Pakistan. *African Crop Science Conference Proceedings* 8:905-907. Disponible en línea: <http://www.acss.ws/acw/Upload/XML/Research/425.pdf>
- Hao W, Richardson P and Hong C. 2010. Foliar blight of annual vinca (*Catharanthus roseus*) caused by *Phytophthora tropicalis* in Virginia. *Plant Disease* 94:274. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0274A>
- Javier-Alva J y Mattos L. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasitica* Dastur de raicillas de limonero patrón rugoso *Citrus jambhiri* Lush bajo riego por aspersión. *Universalia* 11:23-35. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2916267>
- Kroon LPNM, Bakker FT, Van den Bosch GBM, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41:766-782. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fgb.2004.03.007>
- Martin F, Abad Z, Balci Y and Ivors K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*. 96:1080-1103. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- McGovern R and Begeman J. 1996. Reduction of *Phytophthora* blight of Madagascar periwinkle in the landscape by soil solarization. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 108:58-60. Disponible en línea: [http://fshs.org/proceedings-o/1995-vol-108/58-60%20\(MCGOVERN\).pdf](http://fshs.org/proceedings-o/1995-vol-108/58-60%20(MCGOVERN).pdf)
- McMillan R and Garofalo J. 2004. *Phytophthora parasitica* wilt of new cultivars of *Catharanthus roseus*. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 117:316-317. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/85918/82834>
- Meng J and Wang Y. 2010. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and samples based on its Ypt1 gene. *Journal of Phytopathology*. 158:1-7. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01548.xo>
- Mirsoleimani Z and Mostowfizadeh-Ghahamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology, and ribosomal genome. *Phytopathologia Mediterranea* 52:501-516. [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-11549](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11549)
- Orilowski L, Ptaszek M and Trzewik A. 2011. *Phytophthora* shoot blight of periwinkle in polish hardy ornamental nursery stock. *Journal of Plant Protection Research* 51:1-6. Disponible en línea: [http://www.plantprotection.pl/PDF/51\(4\)/JPPR\\_51\(4\)\\_22\\_Orlikowski.pdf](http://www.plantprotection.pl/PDF/51(4)/JPPR_51(4)_22_Orlikowski.pdf)
- Pintos VC, Mansilla VJ y Aguin CO. 2004. *Phytophthora ramorum* nuevo patógeno en España sobre *Camellia japonica* y *Viburnum tinus*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 30:97-111. Disponible en línea: <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-30-01-01-097-111.pdf>
- Rodríguez-Tovar A, Xoconostle-Cáarez B y Valdés M. 2004. Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:267-278. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/610/61027307.pdf>
- Schena L and Cooke DEL. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* 67:70-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.03.003>
- Schubert T and Leahy R. 1989. *Phytophthora* blight of *Catharanthus roseus*. Florida Department of Agriculture and Consumer Service Division of Plant Industry. Plant Pathology Circular 321. Disponible en línea: <http://www.freshfromflorida.com/content/download/11327/144253/pp321.pdf>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Waterhouse G. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*. No. 92.
- Xia X. 2013. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30:1720-1728. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst064>
- Zelaya-Molina LX, Ortega MA and Dorrance AE. 2011. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnology Letters* 33:715-720. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10529-010-0478-3>