

**ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CONOCIDAS COMO
MARCHITAMIENTO Y NECROSIS BASAL EN CULTIVOS DE *Callistephus*
chinensis UBICADOS EN LA SABANA DE BOGOTÁ**



IRIS KATHERINE RENGIFO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ, D.C.
30 DE NOVIEMBRE, 2010**

**ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CONOCIDAS COMO
MARCHITAMIENTO Y NECROSIS BASAL EN CULTIVOS DE *Callistephus*
chinensis UBICADOS EN LA SABANA DE BOGOTÁ**

IRIS KATHERINE RENGIFO

Dra. INGRID SHULLER

DECANA ACADEMICA

Dra. YANETH ARIAS

DIRECTORA DE LA CARRERA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ D.C.
30 DE NOVIEMBRE, 2010**

**ETIOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES CONOCIDAS COMO
MARCHITAMIENTO VASCULAR Y NECROSIS BASAL EN CULTIVOS DE
Callistephuschinensis UBICADOS EN LA SABANA DE BOGOTÁ**

IRIS KATHERINE RENGIFO

DIRECTORA
M. CLEMENCIA F. DE LA ROTTA
Ing. Agr. M. Sc. Fitopatología

ASESORA
ANDREA MARCELA ASCENCIO
Bióloga, Jardines de Los Andes
S.A.S.

Dr. LUIS DAVID GOMEZ
Pontificia Universidad Javeriana
JURADO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ, D.C.
30 DE NOVIEMBRE, 2010**

DEDICATORIA

“A Dios por darme la vida y mi estudio,

A mi familia,

Especialmente a mis padres y a Julian por ser un apoyo incondicional,

Por su amor y comprensión”

Iris Katherine R

AGRADECIMIENTOS

- A María Clemencia Forero de la Rotta, por su dirección científica, su importante apoyo, interés y dedicación.
- A Fabiola Valcárcel y Andrea Ascencio, por su amable dirección a lo largo de la investigación.
- A la empresa Jardines de los Andes S.A.S, especialmente al departamento de Investigación y Desarrollo por su amabilidad, apoyo y colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Págs
INTRODUCCION	2
JUSTIFICACION	4
1. MARCO TEORICO	5
1.1. <i>Callistephus chinensis</i>	5
1.1.1. Enfermedades	6
1.2. <i>Pythium</i>	7
1.3. <i>Phytophthora</i>	7
1.4. Ciclo de vida Oomicetes	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. METODOLOGIA	9
3.1. Ubicación del proyecto	9
3.2. Aislamiento e identificación	10
3.3. Preparación de inóculo	10
3.4. Patogenicidad "In Vitro"	11
3.5. Patogenicidad "In Vivo"	11
3.6. Evaluación	12

	Págs.
3.7. Recursos estadísticos	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Sintomatología	13
4.2. Aislamiento e identificación de microorganismos	15
4.3. Pruebas de patogenicidad	21
5. CONCLUSIONES	24
6. RECOMENDACIONES	25
7. BIBLIOGRAFIA	25
8. ANEXOS	29

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Inmersión plantas en inóculo.....	12
Figura 2. Síntomas en campo.....	14
Figura 3. Síntomas en los tejidos basales	14
Figura 4. Aislamiento correspondiente a los tejidos provenientes de plántulas.....	15
Figura 5. Aislamientos de <i>Phytophthora</i>	17
Figura 6. Aislamientos de <i>Pythium</i>	19
Figura 7. Características de los esporangios de <i>Pythium</i> :.....	20
Figura 8. Prueba un vitro con <i>Pythium</i>	21
Figura 9. Pruebas de patogenicidad sobre plántulas inoculadas.....	21

LISTA DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1. Distribución de los tratamientos	11
Tabla 2. Microorganismos aislados	16

RESUMEN

Son muy diversas las enfermedades causadas por microorganismos que establecen una asociación parasitaria entre una planta hospedante, que se desarrollan bajo una ambiente favorable para su desarrollo. Estas enfermedades son una causa limitante en el sector agrícola de Colombia y el mundo, es por eso que es importante realizar un correcto diagnóstico e identificación de los patógenos causales de estas. Los cultivos ornamentales son susceptibles al ataque de numerosos microorganismos sobre especies vegetales cultivadas como *Callistephus chinensis*, comúnmente conocida como “Matsumotos”, que produce una variedad de flor de corte incluida en bouquets destinados a exportación. Esta planta ornamental es muy susceptible al ataque de microorganismos pertenecientes a los reinos chromistas, fúngicos y a bacterias, durante todo el ciclo de vida especialmente en los primeros estados de desarrollo y al final de su ciclo productivo.

El objetivo de esta investigación fue identificar los agentes causales de las enfermedades que atacan a los Matsumotos en cultivos de la sabana de Bogotá. Siguiendo los postulados de Koch, se tomaron muestreos de las plantas enfermas, en diferentes edades, posteriormente se realizó la descripción de síntomas y el aislamiento en medios selectivos de los microorganismos responsables de los cambios fisiológicos, para su identificación taxonómica y una vez purificados se inocularon sobre plantas sanas para realizar las pruebas de patogenicidad. Los microorganismos identificados durante la investigación fueron los Oomicetes *Pythium* sp., y *Phytophthora* sp., estos dos géneros estrechamente relacionados con enfermedades que ocasionan pudriciones en la base del tallo, semillas y ahogamiento de plántulas. Las pruebas de patogenicidad se realizaron inoculando en forma separada, cada microorganismo y la mezcla de los dos sobre 90 plantas sanas; se dejaron como testigo 30 para un total de 120 plantas, evaluando la aparición de síntomas en ellas; adicionalmente se adelantaron pruebas “*in vitro*” para confirmar la aparición de los síntomas en sobre tejido sano y posteriormente se realizaron nuevos aislamientos. Finalmente se confirmó como agente causal del

marchitamiento y necrosis basal de las plantas a los microorganismos *Pythium* sp., y *Phytophthora* sp., patógenos responsables de esta sintomatología, en la edad 0-4 semanas el primero de ellos, y el segundo a las 13 semanas de vida de la planta. Conocer la etiología de la enfermedad permite a los exportadores implementar métodos que manejo, para que disminuyan las perdidas en la productividad de las plantas.

PALABRAS CLAVE: *Callistephus chinensis*, *Pythium*, *Phytophthora*, Matsumoto.

INTRODUCCION

El sector floricultor colombiano se destaca por ser un protagonista importante en el mercado mundial que le ha permitido abrir puertas en el desarrollo en el país; desde el ingreso del sector floricultor en las exportaciones ha contribuido no solo en la generación de divisas, sino que también desde el punto de vista social es fuente de empleo tanto directo como indirecto. Sin embargo el sector agrícola se enfrenta a grandes dificultades como son entre otros, las adversidades de clima, temperatura, humedad, plagas y enfermedades que pueden amenazar la comercialización de numerosas especies vegetales exóticas, que por lo general tienen una gran aceptación en los mercados externos, pero que exigen productos de alta calidad fitosanitaria.

De esta manera, las empresas floricultoras se ven en la necesidad de combatir diversas plagas y enfermedades que amenazan la producción, es por eso que es necesario contar con un correcto manejo ya que en la actualidad utilizan diversos productos químicos como, insecticidas, fungicidas y herbicidas, que por su uso indiscriminado pueden llegar a afectar el equilibrio biológico y ambiental promoviendo la aparición de nuevos problemas fitopatológicos, por lo cual es necesario realizar un correcto diagnóstico y asegurar una ruta de soluciones y prevenciones para lograr un manejo integrado de plagas y enfermedades.

Muchas de las enfermedades en las plantas son causadas por bacterias, virus y hongos; Sin embargo, en esta investigación nos centramos en analizar las enfermedades causadas por algunos microorganismos que tienen una asociación parasitaria con sus hospedantes llevándolos a la muerte.

Los Oomicetos son patógenos que tienen gran importancia en el sector agrícola, se conoce que las enfermedades causadas por este tipo de patógenos son de dos tipos: las que afectan el órgano, semilla o fruto que está en contacto con el suelo y las que además de afectar el sistema basal de las plantas, tienen la capacidad de atacar los órganos aéreos de las plantas (Agrios, 2006). La especie vegetal *Callistephus chinensis*, es una planta susceptible al ataque de enfermedades causadas por hongos, donde cabe resaltar la alta incidencia de microorganismos como: *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., y a *Pythium* sp., entre otros.

En esta investigación se pretende identificar el o los agentes causales de la necrosis basal y muerte de plantas que terminan su ciclo de producción, proceso que en los dos casos se manifiesta con la muerte de las plantas tanto en los primeros estados de desarrollo, como al final de su periodo productivo. La sintomatología relacionada es conocida comúnmente como “mal de pie” (podredumbre de raíces y ennegrecimiento del cuello de las plantas). Los agentes causales relacionados con estos síntomas son: *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Sclerotinia* sp., y *Fusarium* sp.; Los síntomas se presentan en plantas de semillero o en esquejes, y su ataque se desarrolla desde el suelo hacia la raíz y base de los tallos; por lo general el cuello de la raíz oscurece, se pudre y la planta muere (Verdeguer, 2009). Por esta razón en esta investigación nos centramos en el diagnóstico de las causas de daño en las plantas de *C. chinensis*, causantes de pérdidas importantes en cultivos bajo invernadero, con el objetivo de prevenir y evitar su propagación, dentro de la especie y sobre aquellas que potencialmente pueden presentarse en cultivos aledaños.

JUSTIFICACIÓN

Nuestro país es uno de los principales países productores y exportadores de flores del mundo, es por eso que es necesario garantizar la sanidad de cada uno de estos productos, que aseguran una mayor productividad y aumenta la posibilidad de que nuestros productos sean internacionalizados con éxito y reconocidos por su alta calidad. De esta manera se debe contar con estudios que garanticen un diagnóstico acertado a las posibles causas de las enfermedades que se presentan, con el fin conocer su biología y evitar condiciones que favorecen su desarrollo.

La floricultura de nuestro país incluye una gran variedad de productos vegetales de exportación, tales como flores, entre ellas Rosa, Clavel, entre otros; Como también productos verdes que constituyen más de 80% del mercado en Estados Unidos; entre estos productos se encuentra la especie *C. chinensis* que produce una flor de colores vistosos muy apetecida en la elaboración de Bouquets de exportación. Este cultivo tiene un área aproximada de siembra de 23.400 m², divididos en 650 camas cada una con 2.998 plantas, a una densidad de siembra de 83 plantas por m².

C. chinensis se debe cultivar en suelos bien drenados, con un pH que puede oscilar entre 5,8 y 6,2 y bajo condiciones de invernadero, debe contar con alta luminosidad y una temperatura entre 15- 21 °C (Sakata, 2010). Las plantas de matsumoto son sensibles a las exposiciones de luz y necesitan aproximadamente 12 horas o más de luz para su floración. Por lo general las plantas de la familia asterácea, a la cual pertenece *C. chinensis* son propensas a sufrir enfermedades causados por hongos y otros microorganismos en el momento del trasplante; Existen empresas que producen semillas de *C. chinensis* resistentes al ataque de hongos como *Fusarium* sp, aspecto que no garantiza que no sean atacados por este u otros patógenos.

En esta investigación se buscó conocer la etiología del agente causal de una de las enfermedades más frecuentes en la sabana de Bogotá que produce necrosis de la base, marchitamiento y muerte de las plantas.

1. MARCO TEORICO

1.1 *Callistephus chinensis*

Esta planta es una herbácea anual con tallo erecto, cabeza grande, solitaria, con disco de color amarillo y pétalos delgados, hojas alternas toscamente dentadas y por lo general de 20-80 cm de altura.

Nombres comunes: Matsumoto, Áster Chino, Reina margarita

- REINO: Plantae
- FILLUM: Tracheophyta
- DIVISION: Magnoliophyta
- CLASE: Magnoliopsida
- SUBCLASE: Asteridae
- ORDEN: Asterales
- FAMILIA: Asteraceae
- SUBFAMILIA: Asteroideae
- GÉNERO: *Callistephus*
- Especie: *C. chinensis*

La variedad, tiene un ciclo de vida aproximadamente de 12 a 13 semanas para llegar a su floración y posterior cosecha; las flores de *C. chinensis*, Matsumoto o Áster Matsumotos, tienen variedades de diferentes colores como rojo, rosa, blanco, lila, púrpura y azul; se siembran a una distancia aproximada de 15 a 20 cm entre plantas, son cultivadas en épocas de verano con sol persistente o poca sombra y pueden crecer a un pH que oscila entre 5.2 y 6.5 (Gilman *et. al*, 2000)

Las plantas de *C. chinensis*, son trasplantadas con 4 semanas de edad desde la siembra de la semilla. En la sabana de Bogotá las plantas se cultivan bajo invernadero, son sembradas aproximadamente cada 10 o 15 centímetros, en camas de 30x1,50m², incorporando gran cantidad de materia orgánica y manteniendo buena circulación de aire y drenaje adecuado; también mantienen un pH ligeramente ácido a 5.2 Y 6.5 (Sakata, 2010).

Las plantas de *C. chinensis* son sensible a la exposición de luz, requieren como mínimo 13 a 16 horas de iluminación para la floración; Esta condición permite manipular la floración de la planta. En la sabana de Bogotá son cultivadas bajo un esquema de 5 horas de luz con intervalos de 15 minutos sin luz, esquema que se cumple a partir del anochecer para maximizar la elongación del tallo y retardar la etapa de floración desarrollo de los botones (Sakata, 2010)

1.1.1. Enfermedades

Su alta sensibilidad al ataque por ciertos patógenos es un factor limitante para los productores de esta flor, lo que hace necesario realizar continuamente análisis de laboratorio, para dar solución a estos microorganismos como hongos de acción parasitaria (Nečas *Et.al*, 2008.) Un problema persistente en el crecimiento de *C. chinensis* es su alta sensibilidad a los microorganismos del suelo como *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*, *Pythium* sp., y *Phytophthora* sp., entre otros, los cuales causan marchitez en las plantas afectadas y su posterior muerte. Las enfermedades pueden desarrollarse poco después de que la planta se siembra o cuando están completamente desarrollada, en algunos casos las hojas se vuelen amarillentas y puede observarse una necrosis en la base del tallo, se recomienda el uso de variedades resistentes y esterilización del suelo (Gilman *et. al*, 2000)

Enfermedades como la roya provocan manchas de color naranja amarillento en el envés de las hojas, aunque no es muy frecuente; el moho gris causa el tizón de la flor bajo condiciones húmedas, para el control de esta enfermedad, es necesario erradicar las plantas infectadas para evitar la contaminación por contacto (Gilman *et. al*, 2000).

Las enfermedades causadas por Oomicetos se caracterizan por ser de dos tipos, las que afectan a los órganos de la planta que se localizan en el suelo o que se encuentran en contacto con él, como por ejemplo, raíces, tallos cortos, tubérculos, frutos carnosos que están en contacto con el suelo y aquellas que afectan principalmente los órganos aéreos de la planta, en particular las hojas, frutos, y tallos jóvenes (Agrios, 2006).

1.2 *Pythium* sp.

Pythium sp., es la causa del ahogamiento de las plántulas, la pudrición de la semilla, raíz y frutos carnosos, además de otros órganos que se encuentran en contacto con el suelo. *Pythium* sp., al igual que *Phytophthora* sp, es un oomiceto clasificado dentro de la familia *Pythiaceae*, el cual es excluido del grupo de los hongos verdaderos e incluido en el reino Cromista de acuerdo a una nueva clasificación debido a que la mayor parte de su ciclo de vida es diploide mientras que los otros hongos son haploides, y a sus altos contenidos de celulosa, entre otras características (Agrios, 2006).

Cuando una planta es atacada por *Pythium*, las hifas penetran los tejidos por medio de celulasas, y una vez que logran colonizar el tejido, forman estructuras reproductivas para generar oosporas. Las oosporas se consideran estructuras de resistencia, que le permiten sobrevivir en el suelo hasta volver a infectar una nueva planta. Se ha reportado que la presencia de fitoesteroles promueve el desarrollo de oosporas por lo que son empleados para el aislamiento y cultivo de este microorganismo en laboratorio. Las oosporas es el producto sexual de la fusión de un oogonio y uno o varios anteridios (Urrutia *et al*, 2004); *Pythium* sp., forma un micelio blanco filamentoso, profusamente ramificado y rápido crecimiento el micelio produce esporangios terminales que pueden ser de forma esférica (Agrios, 2006).

1.3 *Phytophthora* sp.

Phytophthora sp., es uno de los Oomicetos patógenos de más importancia junto con *Pythium* sp. Es el responsable de pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tubérculos (Agrios, 2006), todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo, de paredes paralelas o irregularmente calibradas, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. El micelio es cenocítico, observándose solo raramente la presencia de algunos tabiques que normalmente se encuentran separando las partes viejas carentes de protoplasma (Echemendia, 2002).

Uno de los principales síntomas causados por *Phytophthora* es la pudrición del cuello de la raíz y parte basal del tallo, que produce la deshidratación y muerte de la corteza; la lesión frecuentemente es visible en el tejido localizado junto a la superficie del suelo. Cuando las afectaciones en la base del tallo son considerables las plantas enfermas comienzan a mostrar en su parte aérea los efectos de la alteración, observándose hojas de color verde pálido, con nervaduras que presentan una coloración amarillenta (Echemendia, 2002).

1.4 Ciclo De Vida Oomicetes

Los Oomicetes producen zoosporas biflageladas, con un flagelo en forma de látigo dirigido hacia atrás y un flagelo en forma de “hisopo” con numerosas proyecciones llamadas mastigonemas, dirigido hacia delante. Las zoosporas son diploides y son producidos dentro de los esporangios los cuales se desarrollan sobre hifas especializadas llamadas esporangioforos. Una vez liberadas las zoosporas nadan hasta la superficie del hospedante donde se enquistan y germinan. El tubo germinativo penetra los tejidos del hospedante, y forma un micelio cenocítico el cual eventualmente dará origen a una nueva generación de esporangios sobre la superficie de la planta. Este ciclo asexual se puede repetir varias veces durante el desarrollo del hospedante; el ciclo sexual involucra la formación de estructuras sexuales o gametangios, los masculinos se denominan anteridios y los femeninos se llaman oogonios, que se pueden producir en la misma hifa o requerir hifas de diferente tipo de compatibilidad según la especie. Tanto la formación del anteridio como el oogonio se da por meiosis, pero típicamente la mayoría de los núcleos así originados se desintegran y solo queda un núcleo funcional por gametangios. Luego de la unión del anteridio con el oogonio se produce la plasmogamia y la cariogamia, y dentro del oogonio fertilizado se forma una espora llamada oóspora, la cual actúa como estructura de resistencia. En condiciones favorables la oóspora germina dando lugar a un esporangio iniciándose de nuevo el ciclo del microorganismo (Cavallini, 1998) ver ciclo en Anexo 1.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo General:*

- Determinar la etiología de las enfermedades conocidas como necrosis de la base del tallo y del marchitamiento en plantas de “Matsumoto” *Callistepus chinensis*.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Aislar e identificar los microorganismos asociados a los síntomas de marchitamiento y necrosis de la base de las plantas a lo largo del ciclo de vida de las plantas de Matsumoto.
- Describir en forma detallada los síntomas asociados con cada una de las enfermedades estudiadas.
- Determinar la relación entre la edad de las plantas y la presencia de los patógenos
- Demostrar la patogenicidad de los microorganismos encontrados.

3. METODOLOGIA

3.1. *Ubicación del proyecto*

El proyecto se realizó en dos etapas, la primera relacionada con los aislamientos, caracterización e identificación de los microorganismos aislados, se adelantó en los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana y la segunda en los invernaderos de uno de los cultivos de flor cortada para exportación.

3.2. *Aislamiento e identificación*

Para realizar el aislamiento de los Fitopatógenos se realizó la recolección de muestras en las instalaciones de una empresa exportadora de flores en la sabana de Bogotá, durante todo el ciclo de vida de la planta se tomaron plantas con síntomas de las enfermedades evaluadas, que se agruparon según su edad, de la siguiente manera:

Etapas 1: 0-4 semanas de edad

Etapas 2: 5-9 semanas de edad

Etapas 3: 10-13 semanas de edad.

Los tejidos seleccionados se procesaron en el laboratorio siguiendo el siguiente protocolo: lavado abundante con agua y jabón, para eliminar suelo y residuos orgánicos, luego se realizaron cortes del tejido enfermo junto a tejido sano, se desinfectaron de la siguiente forma: 1 minuto en hipoclorito de sodio al 2,5 %, se enjuagaron en agua destilada estéril y finalmente se secaron sobre en papel absorbente estéril y se cultivaron sobre el medio de cultivo PDA, al que se le adiciono ácido láctico y 0.01 gr de rifampicina (Jeffers, 2006); posteriormente se incubaron a una temperatura de 22°C.

Una vez obtenidas las colonias de los microorganismos aislados, se identificaron siguiendo las características descritas en claves taxonómicas especializadas en microorganismos de origen fungoso y chromistas

3.3. Preparación de inóculo

Para la preparación del inóculo se prepararon 15 cajas de PDA con cada uno de los microorganismos, luego se realizaron pases a medio V8, para inducir la esporulación; posteriormente se realizó un raspado del micelio y estructuras reproductivas, que se depositaron en un Litro de agua destilada estéril hasta llevar la solución a una concentración de 10^6 esporas por mililitro (Nečas *Et. al*, 2008).

3.4. Patogenicidad “in vitro”

En cajas de Petri estériles, se colocaron fragmentos de la base del tallos de 24 plántulas tomadas directamente de la bodega de almacenamiento, y se inocularon directamente con bloques con crecimiento micelial, que se colocaron sobre las superficie de los tejidos, realizando en algunos casos heridas y en otros no. Adicionalmente se inocularon 3 plantas completas con cada uno de los microorganismos, dejando 3 como testigo.

3.5. Patogenicidad “In vivo”

Se utilizaron 120 plántulas de *C. chinensis* de 4 semanas de edad, las cuales se distribuyeron en 4 tratamientos como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los tratamientos

TRATAMIENTO	No. DE PLANTAS	MICROORGANISMO INOCULADO
1	30	Microorganismo 1
2	30	Microorganismo 2
3	30	M1 +M2
4	30	Ninguno (Testigo)

Previamente al momento de la siembra las raíces de las plántulas permanecieron sumergidas por espacio de una hora, en agua destilada con el inóculo de cada microorganismo, tal como se presenta en la Figura 1, transcurrido este tiempo fueron trasplantadas en macetas con suelo estéril; el inóculo sobrante fue regado junto a las coronas de las plántulas (Martínez, et al, 2006).



Figura No 1. Inmersión de las plántulas en inoculo de los microorganismos aislados.

Las materas se mantuvieron en condiciones semejantes a las que tiene un invernadero en producción; tanto las prácticas de riego como manejo cultural se hicieron de manera similar al dado en el cultivo de la especie vegetal. Posteriormente las materas se ubicaron en bancos de uno de los invernaderos en producción.

Adicionalmente se realizaron aislamientos de plantas asintomáticas almacenadas en bodega, con el fin de verificar su estado sanitario.

3.6. Evaluación

Durante la investigación se evaluó el efecto de los microorganismos aislados e inoculados sobre las plantas, observando semanalmente, la aparición de los síntomas de marchitamiento y necrosis de la base de las plantas; teniendo en cuenta que el ciclo de vida de la especie es de 13 semanas, solo se realizaron aislamientos semanales; sin embargo a partir de la primera semana, se adelantó un muestreo destructivo en cada uno de los tratamientos, con el fin de conocer los síntomas secundarios y primarios de la enfermedad. Para su evaluación se tuvo en cuenta la edad de las plantas en el momento de la aparición de los primeros síntomas. Finalmente se determinó la tasa de mortalidad de las plantas frente a los microorganismos inoculados.

3.7. Recursos estadísticos

Para la organización de los datos se utilizó estadística descriptiva, utilizando la clasificación de variables categóricas o cualitativas, clasificándolas como variables cualitativas nominales donde se determina la presencia o ausencia de síntomas siendo 0 = Ausencia y 1 = presencia. Finalmente se proyectó determinar el porcentaje de mortalidad al final de las 13 semanas de ciclo de vida de la planta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Sintomatología.

La sintomatología observada a lo largo de los muestreos estuvo acompañada de marchitamiento, falta de rigidez, muerte de las hojas en general, necrosis de la base del tallo y muerte de la planta, lesiones que se presentan en la Figura 2. Uno de los síntomas que ayudaron a la identificación de la enfermedad conocida comúnmente como “mal de pie” (podredumbre de raíces y ennegrecimiento del cuello de las plantas), es que los síntomas se presentan en plantas de semillero o en esquejes; por lo general el ataque se desarrolla de forma ascendente, iniciando desde los tejidos localizados a nivel del suelo hacia la raíz y ascendiendo hacia la base del tallo.

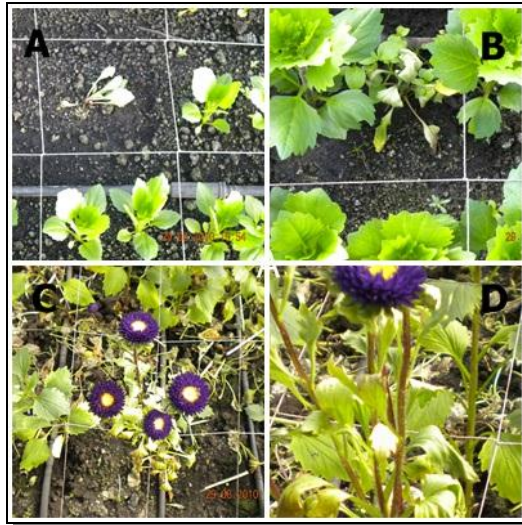


Figura 2. Síntomas en campo: **(A)**. Plántulas de 0-4 semanas de edad: se observa clorosis y amarillamiento; **(B)** Plántulas de 5-10 semanas de edad: deshidratación y enanismo. **(C y D)**. Plantas de 10-13 semanas de edad: amarillamiento, marchitamiento y necrosis de tallos.

Como aparece en la Figura 3 , el cuello de la raíz se oscurece, se pudre y finalmente se evidencia la marchitez de la planta Verdeguer (2009), menciona que estos cambios en la fisiología de las plantas están asociados con microorganismos que son habitantes del suelo, con características similares a los encontrados en este estudio, también descritas por Agrios (2006).



Figura No. 3. Síntomas en los tejidos basales: **(A)**. Pudriciones de la corona y sistema radical. **(B)**. Estrangulamiento y necrosis en plantas de 5-10 semanas de edad. **(C)**. Pudrición húmeda de la base de los tallos en plantas de 5-10 semanas. **(D)**. Necrosis en plantas de 10-13 semanas

De acuerdo con las observaciones realizadas en los sitios de producción, la enfermedad se dispersa rápidamente, que puede ser atribuida al contacto directo del microorganismo con los tejidos radicales de la planta mediante estímulos conocidos como quimiotaxis; la sobrevivencia del microorganismo en el suelo se debe a estructuras de resistencia o clamidosporas que constan de una doble pared o paredes engrosadas, permitiéndole la capacidad de vivir latente durante muchos días. Este comportamiento es similar para varios microorganismos, tal como lo describen los autores Jones (2001) y Agrios (2006).

4.2. Aislamiento e identificación de microorganismos.

Las colonias de los microorganismos obtenidas sobre PDA, se observaron a partir de los cinco días de aisladas; los crecimientos obtenidos presentaron características uniformes en su desarrollo, como alto crecimiento micelial de apariencia algodonosa, colonias arrosetadas o en forma de pétalos. Estas características coinciden con las descritas por Alva (2006), para microorganismos de la familia Pythiaceae.

De acuerdo con las características tanto macroscópicas como microscópicas los microorganismos se ubicaron en los géneros *Pythium* sp., y *Phytophthora* sp., mencionados por Verdeguer (2009) como agentes asociados con los síntomas de enfermedades como los descritos anteriormente, en la Figura 4 se observan algunas de las características de los dos géneros identificados.

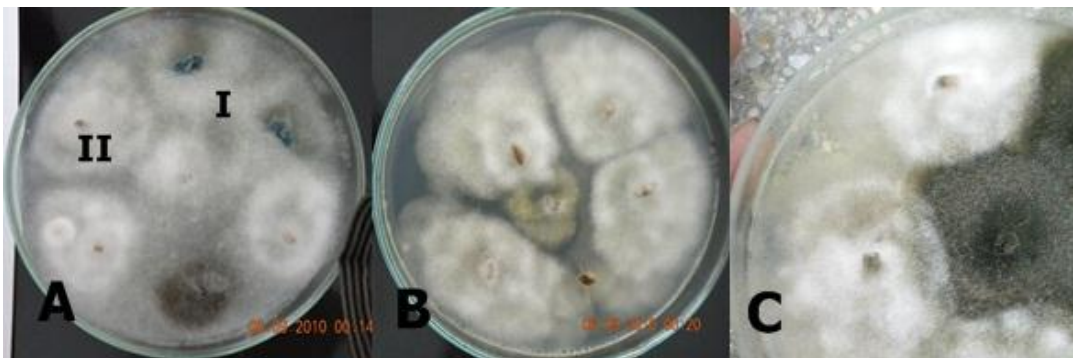


Figura 4. Aislamiento correspondiente a los tejidos provenientes de plántulas: **(A).** Colonias obtenidas de 0-4 semanas: I. Crecimiento micelial de *Pythium* sp. II. Crecimiento micelial de *Phytophthora* sp. **(B).** Colonias obtenidas de plantas de 5-10 semanas. **(C).** Colonias obtenidas de plantas de 10-13 semanas.

De acuerdo con la edad de las plantas, se logró identificar que en la etapa 1 (0-4 semanas), es frecuente la presencia de *Pythium* sp., y *Phytophthora* sp, como los agentes que ocasionan la necrosis y pudrición en la base de las plántulas, en la etapa 2 (5-10 semanas) se aisló en forma consistente al microorganismo del género *Phytophthora* y en forma similar se encontró durante la etapa 3 (10-13 semanas).

Tabla 2. Microorganismos aislados

Edad	Edad de la planta	Microorganismo encontrado
1	0-4 semanas	<i>Pythium</i> sp, <i>Phytophthora</i> sp.
2	5-10 semanas	<i>Phytophthora</i> sp.
3	10-13 semanas	<i>Phytophthora</i> sp.

Los microorganismos fueron purificados en los medios selectivos PDA + Ácido láctico y PDA+Rifampicina; las colonias de *Phytophthora* sp., tienen un crecimiento óptimo en el medio selectivo PDA+ Ácido Láctico, mientras que *Pythium* lo hace mejor en el medio PDA+ Rifampicina. Este antibiótico es utilizado para inhibir el crecimiento bacteriano pertenece a la familia de las rifampicinas, es un antibacteriano macro cíclico. Jeffers y Martin (1986) y por Jiménez (2008).

En la Figura 5 se observan las características que presenta *Phytophthora* sp, al ser aislado en PDA, con ácido láctico o rifampicina.



Figura 5. Aislamientos de *Phytophthora*.: (A). Aislamiento de *Phytophthora* en medio PDA+Rifampicina. (B). Aislamiento de *Phytophthora* en medio PDA+ Ácido Láctico.

Westcott 2001, menciona que *C. chinensis* es susceptible a enfermedades en el sistema radical, asociadas tanto a bacterias como a microorganismos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cryptogea* y *Pythium ultimum*, estos dos últimos que se aislaron en forma persistente en tejidos enfermos provenientes de plantas en diferentes estados fenológicos.

Se logró la identificación de *Phytophthora* sp., caracterizado por tener un micelio cenocítico, hialino con crecimiento arrosetado, con esporangios papilados, anteridios anfígenos; los esporangios de las diferentes especies del microorganismo pueden variar en su forma y tamaño permitiendo así dar una clasificación para las diferentes especies tal como lo describe Reyes (2007).

La sintomatología descrita por Bruma (2004) menciona que la enfermedad causada por *Phytophthora* sp., se manifiesta en dos periodos críticos de infección, el primero ocurre en plantas de tomate recién trasplantados las cuales presentan un alto daño en la base del tallo, daño que está relacionado con el exceso de riego; el segundo periodo crítico se produce cerca de la cosecha, estas características se asimilan mucho con las etapas en donde se manifiesta la enfermedad sobre las plantas de *C. chinensis*.

Según Bruma 2004 Los esporangios de *Phytophthora* sp., se caracterizan por ser de forma piriforme, algunos papilados y algunos no, características que facilitan la clasificación de las diferentes especies.

La sintomatología causada por las especies de *Phytophthora* sp., son muy similares, causan enfermedades en el sistema radical de las plantas, algunas se localizan en la corona y avanzan hacia los tejidos superiores y en otros casos alcanzan a afectar los frutos; Smith (2000) en su libro sobre enfermedades de las plantas describe diferencias entre algunas de las especies de *Phytophthora* sp., donde afirma que *P.cryptogea* se caracteriza por tener esporangios de forma elipsoide no papilados y en algunas de sus hifas presenta sobrecrecimientos o hinchazones, a diferencia de

P.cactorum que se caracteriza por tener anteridios paraginos y esporangios papilados.

Según Engelhrad (1980), en su investigación logra aislar *Phytophthora parasítica* a partir de plantas de *C. chinensis*, microorganismo que posteriormente fue utilizado para realizar pruebas de patogenicidad para identificar posibles huéspedes asociados.

Daughtrey (2001) afirma que: “los síntomas producidos por *P.parasítica* se caracterizan por ocasionar marchitamiento de las hojas y ennegrecimiento del tallo, especialmente en plantas en bandeja o muy jóvenes. *P. parasítica* puede permanecer latente durante mucho tiempo dentro sus hospedantes esperando a condiciones favorables para producir en enfermedad. Estos síntomas son comúnmente confundidos con los producidos por *Pythium*, al igual que *Fusarium* sp., y *Rhizoctonia* sp.”. Alba (2006), asegura que *P. parasítica* se ve beneficiado por altas temperaturas, llegando a producir síntomas letales rápidamente.

Phytophthora sp., es encontrada comúnmente en plantas de maceta y ornamentales, especialmente sobre la familia Asterácea y Verdeguer (2009) menciona que *P.parasítica* tiene la facilidad de crecer a diferentes temperaturas que van desde 24°C hasta los 32°C; de esta manera es posible que no en todas las temperaturas sea visibles los síntomas causados por este microorganismo y que en ciertas ocasiones permanezca en estado de latencia, hasta cuando se presenten las condiciones adecuadas para su desarrollo; de acuerdo con estas apreciaciones es posible que el agente causante del marchitamiento y muerte de plantas de *C. chinensis*, este relacionado con alguna de las especies *cryptogea* o *parasítica*.

En relación con la necrosis de la base de las plántulas, durante la etapa 1 (0-15 días) se identificó como el responsable de la enfermedad, al chromista del género *Pythium*, el cual se caracteriza por presentar un micelio cenocítico-hialino, con un crecimiento blanco sobre el medio de cultivo PDA, sus colonias tienen una apariencia algodonosa en forma de telaraña como aparece en la Figura 6, además tienen un rápido crecimiento y es muy sensible a la contaminación bacteriana.



Figura 6. Aislamiento de *Pythium* en medio PDA +Acido, se observa una colonias blanca de apariencia algodonosa.

En las observaciones realizadas en el microscopio, el microorganismo presenta esporangios de forma esférica (Figura 7), los cuales producen tubos germinales para penetrar directamente los tejidos basales de las plantas susceptibles. La mayoría de las especies son homotalicas, características que son descritas por Agrios (2006) donde describe que produce oogonios esféricos y anteridios en forma de clava en los extremos de hifas cortas la hifa sostiene al anteridio y al oogonio; durante esta investigación se logró la observación de esporangios de *Pythium* sp., después de colocarlos en agua destilada durante 8 días.



Figura 7. Características de los esporangios de *Pythium*: **(A)**. Abundantes esporangios producidos en agua destilada estéril (4x). **(B)**. Micelio cenocítico (10x). **(C)** Formas redondeadas y pared delgada (20x).

Según Lot (2003), *Pythium* sp., origina alteraciones húmedas y blandas que se inician en la base del tallo de las plantas, la infección se inicia a partir del tejido que

está en contacto con el suelo que se oscurecen progresivamente, y ocasiona en los tejidos aéreos amarillamientos y marchitamientos, como consecuencia de su localización en la base de los tallos, impidiendo el paso de nutrimentos y agua.

Este microorganismo se caracteriza por causar pudrición en plantas muy jóvenes e inclusive semillas, pueden sobrevivir largos periodos de tiempo permaneciendo en un estado de latencia como oósporas, clamidosporas y en algunos casos esporangios. Daughtrey (2001), afirma que este microorganismo puede sobrevivir en pequeñas partículas del suelo, polvo, en el suelo de los invernaderos a expensas de materia orgánica, materas sucias, e inclusive se ha informado que las mezclas con turba son fuentes de inóculo. La activación de los propágulos latentes son estimulados por exudados de las raíces o semillas; el tubo germinativo responde por quimiotropismo positivo y penetra el sistema radical.

Estos dos oomicetos se ven favorecidos por los excesos de agua en el suelo, lo cual permite la movilización de las esporas dando paso a nuevas infecciones.

En los medios de cultivo utilizados para incrementar inóculo, se obtuvo abundante crecimiento en el medio PDA+ácido láctico para *Phytophthora* sp., y medio V8 para *Pythium* sp., el cual según Urrutia (2004) presenta un abundante crecimiento micelial e induce la producción de estructuras reproductivas, a pesar que se recomienda utilizar medios líquidos como el JV8 a una temperatura entre 24 y 28 °C y en presencia de alta luminosidad (Urrutia, 2004).

4.3. Pruebas de patogenicidad

En las inoculaciones realizadas sobre fragmentos de tallos provenientes de plántulas sanas, con *Pythium* sp., se observó que después de los tres días de la inoculación, se presentaron síntomas de necrosis de los tejidos (Figura 8 A); en los aislamientos realizados se logró recuperar el microorganismo, que tuvo un crecimiento micelial similar al encontrado en los aislamientos originales (Figura 8 B). Los resultados fueron exitosos cuando previamente a la inoculación, se realizaron cortes en el tercio inferior de las plántulas, sin embargo en esta prueba el ensayo fue exitoso únicamente para *Pythium*; Las pruebas correspondientes a *Phytophthora* y los

testigo no pudieron ser tomadas en cuenta ya que el tejido se oxido y se descompuso en menos de 4 días.

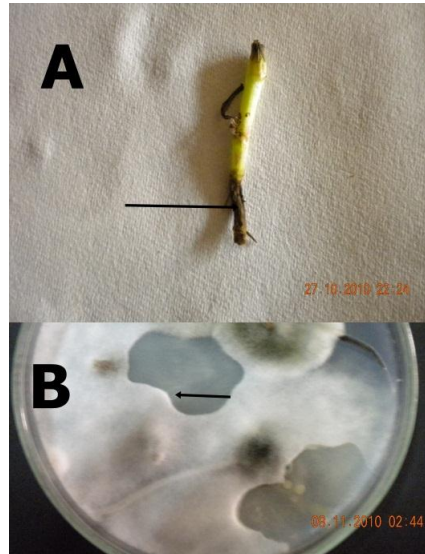


Figura 8. Prueba “in vitro” con *Pythium*.: **(A)**. Necrosis de los fragmentos de tallo inoculados. **(B)**. Colonias obtenidas a partir de los tejidos afectados.

En las pruebas de patogenicidad realizadas colocando la planta completa, los resultados fueron positivos en todos los casos, además los dos microorganismos, tanto *Phytophthora* sp., como *Pythium* sp., se re aislaron sobre medio de cultivo artificial; de esta manera se puede atribuir la muerte de plantas jóvenes y adultas a los dos patógenos que se mencionan en el estudio. En la Figura 9, se observan síntomas de necrosis de la base o cuello de las plántulas, clorosis y amarillamiento de las hojas, como consecuencia de la obstrucción del paso de nutrimentos hacia los tejidos aéreos.

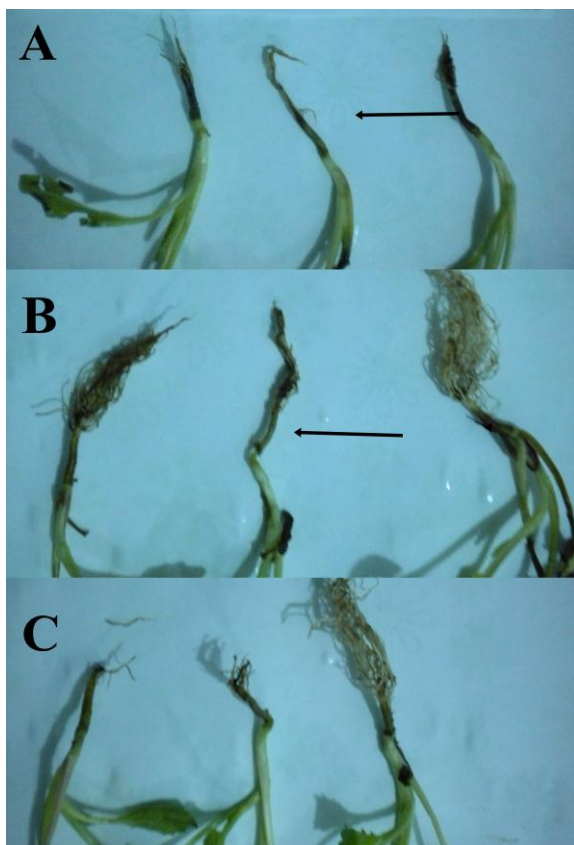


Figura 9. Pruebas de patogenicidad sobre plántulas inoculadas: **(A).** Lesión en raíz causado por *Phytophthora sp* **(B).** Lesión en raíz causado por *Pythium sp*. **(C).** Raíz testigo.

En los muestreos y pruebas de laboratorio realizadas sobre las plantas que a partir de la primera semana de inoculación presentaron los síntomas de alguna enfermedad, se obtuvo crecimiento de los dos microorganismos, tal como se presenta en la Tabla

Tabla 3. Microorganismos re aislados de la plantas en tratamiento

Aislamiento en PDA	<i>Phytophthora sp.</i>	<i>Pythium sp</i>
Tratamiento 1	NO	SI
Tratamiento 2	SI	NO
Tratamiento 3	SI	NO
Tratamiento 4	NO	NO

Después de 8 días de inoculación, las plantas comenzaron a presentar síntomas relacionados con los descritos en campo. A los 17 ddi, los tratamientos que estuvieron en contacto con *Phytophthora* sp, presentaron marchitamiento en la mayoría de sus plantas tal como aparecen en la figura 10. Según el estudio realizado por Engelhrad (1979) estos resultados coinciden con el tiempo de aparición de los síntomas, después de la inoculación de *Phytophthora* sp., en la flor de pascua. Esta planta se asemeja a *C. chinensis*, por pertenecer a la misma clase taxonómica (Magnoliopsida) este mismo autor afirma que, *Phytophthora* sp., es uno de los principales causantes de mal de pie en *C. chinensis*

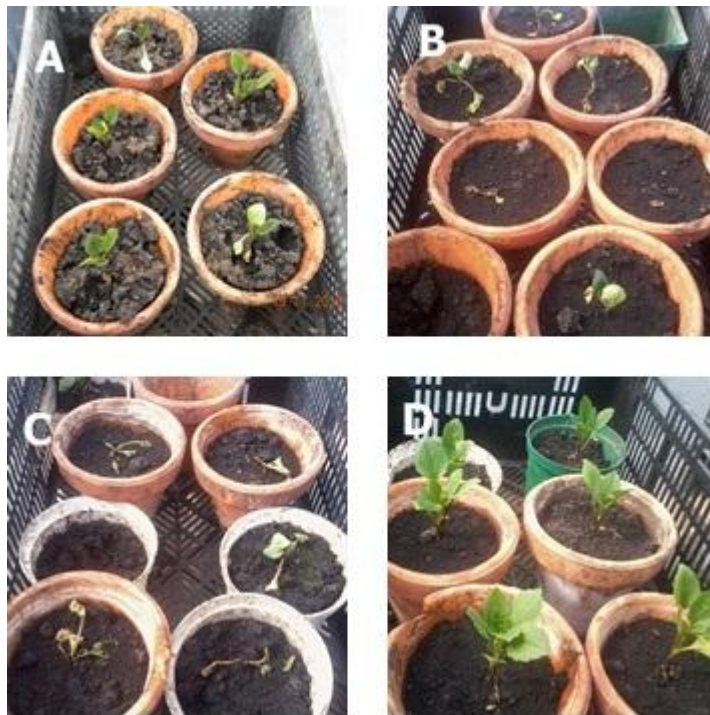
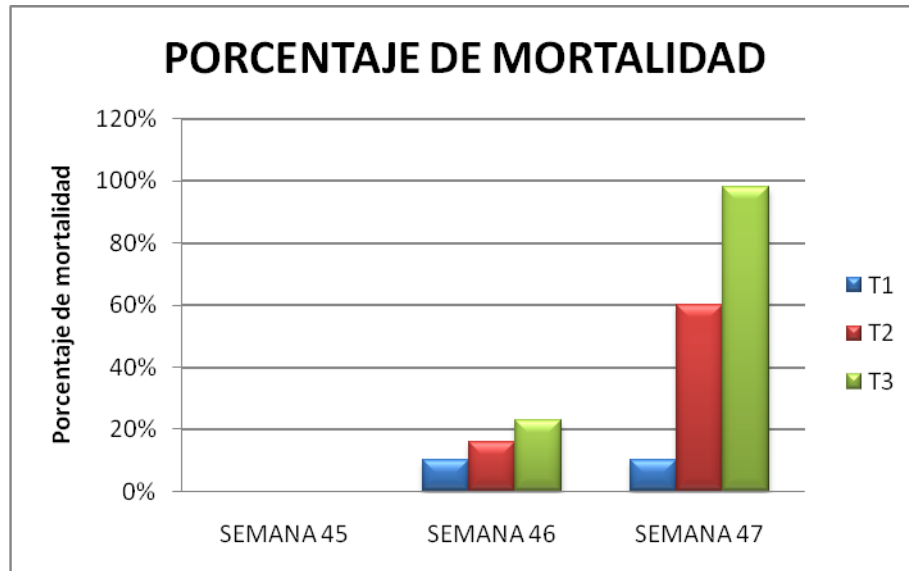


Figura 10. Imágenes de la aparición de síntomas en la semana 47. **(A).** Tratamiento No. 1 *Pythium* sp. **(B)** Tratamiento No. 1 *Phytophthora* sp. **(C)** Tratamiento No. 3 *Pythium* sp. Y *Phytophthora* sp. **(D)** Tratamiento No. 4 Plántulas sin inocular.

En relación con el efecto de los microorganismos sobre las plantas que llegaron al periodo final de desarrollo, se encontró que a partir de la semana 46 las plantas se necrosan y mueren en forma rápida (Grafica 1) especialmente en los tratamientos 2 y 3,

se considera que de acuerdo a lo reportado por numerosos investigadores la edad de la planta puede explicar la alta incidencia de *Phytophthora* en relación con *Pythium*, especializado en atacar los tejidos más jóvenes de las plantas.



Grafica 1. Porcentaje de mortalidad hasta semana 47.

Según los resultados obtenidos, se confirma que el agente causal de las enfermedades evaluadas corresponden a los microorganismos *Phytophthora* sp., y *Pythium* sp., ya que fueron reaislados a partir de los tejidos afectados de las plantas inoculadas. Esto confirma que la etiología de las enfermedades nombradas se debe a la presencia y desarrollo de estos dos Oomicetes. Los resultados reportados en esta investigación, se asemejan a los obtenidos por Jiménez (2008) en su estudio donde describe la misma sintomatología en plantas de *Quercus*, sometido a una metodología similar, en la cual obtuvo aislamientos de estos dos Oomicetes.

Las pruebas que se realizaron sobre plántulas seleccionadas en los cuartos de almacenamiento, permitieron obtener colonias de *Pythium* sp., es posible que dadas las características de latencia que presentan las estructuras reproductivas, el microorganismo pueda sobrevivir e iniciar el ciclo de la enfermedad cuando

encuentre las condiciones ambientales favorables para su desarrollo de acuerdo como lo describe Agrios (2005), situación que permite tomar medidas de manejo preventivo, como monitoreos continuos sobre el material que es producido fuera de los invernaderos.

De otra manera se considera que para mantener un buen manejo de la enfermedad, es necesario integrar prácticas culturales, como la limpieza de herramientas, adecuadas distancias de siembra, evitar excesos de humedad, selección del material de propagación que provenga de sitios que garanticen la sanidad de los materiales propagados y en lo posible implementar la rotación del cultivo, con especies que no sean susceptibles a los microorganismos identificados.

Agrios (2006) menciona como un buen control de estos microorganismos la esterilización con vapor, o compuestos químicos volátiles como el bromuro de metilo; en algunos de los sitios de producción de flores cortadas para exportación, la primera de las prácticas es aplicada con frecuencia. Sin embargo Daughtrey (2001), afirma que la enfermedad causada por *Pythium* sp, puede ser más agresiva en suelos pasteurizados que en suelo natural debido a la falta de organismos competidores. Siguiendo este parámetro, se debe tener en cuenta enriquecer el suelo previamente a la siembra, con algunos microorganismos que funcionen como controladores para Oomicetes, tales como algunas de las especies de *Trichoderma* sp., y *Clonostachys* sp. Carreño et al (2006) afirma en su investigación realizada sobre plantas de manzano que los dos biocontroladores, son una excelente alternativa para el manejo de Oomicetes.

5. CONCLUSIONES

- Según los resultados obtenidos las plantas en la edad 1 (0-4 semanas) son afectadas por los microorganismos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* agentes causales de las enfermedades conocidas como la necrosis de la base, marchitamiento y muerte de las plantas de *Callistephus chinensis*; es posible que en los primeros estados de desarrollo de las plántulas se

presente una especie de sinergismo, como una forma de ataque de los dos microorganismos identificados

- El cromista del género *Phytophthora*, fue el microorganismo que se detectó durante todo el ciclo vegetativo y productivo de las plantas de *C. chinensis*, y *Pythium* se encontró con frecuencia atacando los tejidos de la corona en jóvenes. Los medios en el que se obtuvo mejor crecimiento micelial fueron PDA+Rifampicina para *Phytophthora* y V8-Agar para el crecimiento de *Pythium*.
- Los resultados de las pruebas in vitro con y sin heridas fueron positivas para la sintomatología causada por *Pythium* después de 5 días de ser inoculadas, y las pruebas de patogenicidad “in vitro” sobre plantas completas fueron positivas para los dos microorganismos *Pythium* y *Phytophthora*
- En los aislamientos realizados sobre plántulas almacenadas en bodega y aparentemente sanos, se obtuvieron colonias del microorganismo *Pythium*, se considera que es posible que dado su comportamiento, es posible que permanezca durante su almacenamiento en estado de latencia y se desarrolle cuando las condiciones del ambiente favorezcan su desarrollo.

Según las características del crecimiento cultural, la forma de los esporangios, y los registros reportados en la literatura, en forma preliminar las especies de los dos microorganismos se pueden ubicar en *ultimum* para *Pythium* y *parasitica* o *cryptogea* para *Phytophthora*.

6. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar periódicamente aislamientos de plantas que se encuentren almacenadas, para asegurar que las cultivadas se encuentren libres de patógenos.
- Realizar aislamientos del sustrato en el que están las plantas para buscar presencia o ausencia de los microorganismos de acción patogénica encontrados.

- Con el fin de contribuir con el estado actual de las enfermedades registradas en el país, realizar estudios taxonómicos sobre las especies de los dos microorganismos encontrados. Capacitar a las personas que están en contacto con el manejo agronómico de las plantas sobre los métodos de prevención de enfermedades de manera que se logre un manejo integrado de los problemas de origen fitosanitario, para evitar su propagación y pérdidas en producción y productividad...

7. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. 2006. PHYTOPATHOLOGY, 2da Edición, Editorial Limusa.
- ALVA JAVIER J. Y MATTOS L. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasítica* Dastur de raicillas de limonero, Patrón rugoso *Citrus jambhiri* Lush bajo riego por aspersión. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Piura
- AMADO REYES C. Y MORALES -GARCÍA L. 2007. Determinación De La Temperatura Óptima De Desarrollo *In Vitro* de *Phytophthora Parasitica* Dastur. En Aguacate “Hass”, En La Zona Aguacatera de Michoacan, Mexico. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007.
- BARDIN S.D, HUANG H.C.,AND MOYER J.R. 2003. Control of Pythium damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a bio control agent Agriculture and Agra-Food Canada, Let bridge Research Centre, P.O. Box 3000, Lethbridge, Alberta, Canada T1J 4B1.
- CAÑEDO, V; AMES, T. 2004. Manual de laboratorio para manejo de hongos entomopatogenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.
- CARREÑO PÉREZ A., BLANCO VALBUENA J., VILLEGAS ESTRADA B. 2006., Selección De Hongos Biocontroladores De *Phytophthora cactorum*, Agente Causal De La Pudrición Radical Y De Corona En Manzano,

COLCIENCIAS-UPTC. Tunja, Boyacá. E-mail: carrenoperez@yahoo.com; Departamento de Fitotecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales. E-mail: bernardo.villegas@ucaldas.edu.co.

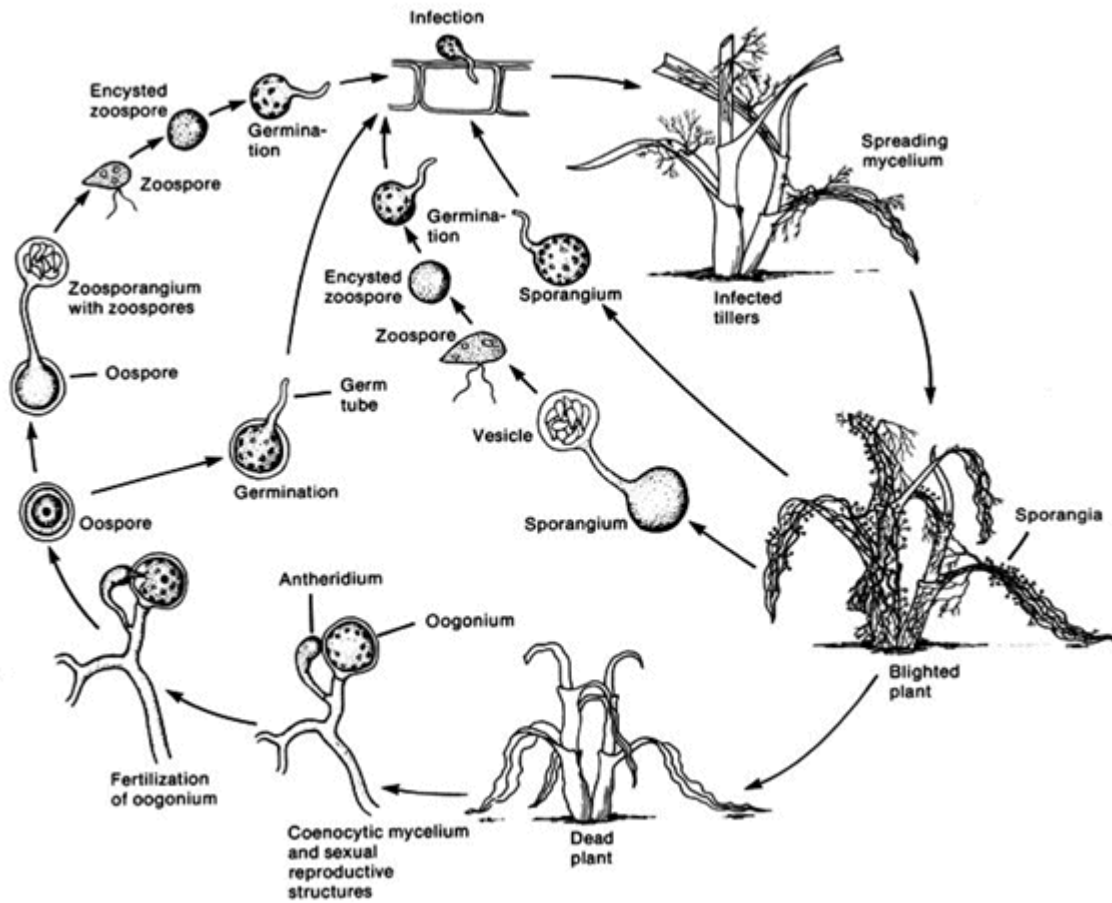
- CAVALLINI, LUIS FELIPE. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 468 p. Año 1998. Editorial San José, Primera Edición Editorial de la Universidad de Costa Rica, CR.
- COURTESY R. W. SMILEY. 2005. Compendium of Turfgrass Diseases, Third Edition página 47.
- DAUGHTREY MARGERY L. 2001. Plagas y enfermedades de las plantas en maceta con flores, *American Patology Society, Paginas 33-40*
- ECHEMENDIA, Y. 2002. Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura
- ENGELHARD, AW, Y PLOETZ. 1979. Phytophthora, corona y la pudrición del tallo, una nueva enfermedad importante de la flor de Nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*). Proc. Florida Hort Estado. Soc. 92:348-350.
- FOLMAN L.B., DE KLEIN M.J.E.M., POSTMA J, AND VEEN J.A. VAN. 2004. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber, Institute of Evolutionary and Ecological Sciences, University of Leiden, P.O. Box 9516, 2300 RA Leiden, The Netherlands Plant Research International
- GILMAN, F; HOWE, T. 2000. , *Callistephus Chinensis*.; University of Florida, Cooperative extension Service; Institute of Food and Agricultural Sciences. Revista *Callistephus Chinensis - China aster*.
- HASHEM AL-SHEIKH., 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field Saudi Journal of Biological Sciences P.O. Box 1078, Riyadh 11431, Saudi Arabia.
- JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E. y ZITTER, T.A. 2001. Plagas y Enfermedades del Tomate. The American Phytopathological Society. Ed. Mundi. Prensa. Madrid. 74p.

- LATORRE B.A. Y VIERTEL S. ., 2004. , Presencia de *Phytophthora cactorum* en frutillas (*Fragaria xananassa*) conservadas en frio, Facultad de Agronomía e ingeniería Forestal, Pontificia Universidad de Chile.
- LOT D. B. H., MAISON B.. NEUVE, 2003. , Enfermedades de las lechugas: Identificar, conocer, controlar. Ediciones mundiprensa.
- MALDONADO, L.Y. ; DELGADO, M.C. ; GARCÍA, C., 2006. ; Estudio De La Estructura Genetica De Las Poblaciones De *Phytophthora Infestans* En Las Regiones Productoras De Papa En Colombia, Universidad Nacional de Colombia
- MARTÍNEZ-RESTOY R. E, DIÁNEZ MARTÍNEZ FERNANDO, . SANTOS M, GARCÍA MIGUEL DE CARA,, FERRÁNDIZ HERNÁNDEZ J., TELLO MARQUINA JULIO CÉSAR, 2006. ; Microbiota Fúngica Asociada A Las Podredumbres Radiculares Del Puerro Cultivado En Villena; Boletín de sanidad vegetal. Plagas, ISSN 0213-6910, Vol. 32, Nº 4, 2, 2006 , pags. 673-684
- NEČAS, T; KOBZA, F. ; 2008. , Resistance of Chinese asters (*Callistephus Chinensis* Nees.) to Fusarium wilts (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Callistephi*(Beach) Snyder and Hansen) evaluated using artificial Inoculations; Faculty of Horticulture, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Lednice, Czech Republic.
- SAKATA ORNAMENTALS. 2010. *Callistephus chinensis*, aster chino.North America PO Box 880. Morgan Hill CA.
- SMITH M., DUNEZ J. PHILLIPS R.A. AND ARCHER S.A. 2000. European handbook of plant diseases, Blackwell scientific publication.
- STEVENSON WALTER R., 2004., The Wisconsin Experience with Phytophthora Fruit Rot of University of Wisconsin, Department of Plant Pathology Tel. No. 608-262-6291 Email: wrs@plantpath.wisc.edu
- TUSET J.I., HINAREJOS C., MIRA J.L., 2002., Podredumbre de los Frutos del peral causada por *Phytophthora cactorum* en el area mediterránea Española.

- URRUTIA, I; PACHECO, J. R. ; 2004.; Aislamiento e identificación de *Pythium sp*, un fitopatógeno de interés agrícola en el estado de Querétaro, Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
- VERDAGUER MONGE, ANTONIO; Enfermedades generales producidas por hongos en las plantas ornamentales, 2009, Horticultura: Revista de frutas, hortalizas, flores, plantas ornamentales y de viveros, ISSN 1132-2950, N° 24, 1985, pags. 25-37.
- WESTCOTT, RALPH CYNTHIA, HORST KENNETH, 2001, Westcott's Plant Disease Handbook, Sexta Edición, Página 560.

ANEXO1

IMAGEN CICLO DE VIDA OOMICETES



(Courtesy R.W. Smiley, P.H. Dernoeden, and B.B. Clarke), Compendium of Turfgrass diseases, 2nd edition, Page 47.)