

## Enfermedades causadas por *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales

A. PÉREZ-SIERRA, B. MORA-SALA, M. LEÓN, J. GARCÍA-JIMÉNEZ, P. ABAD-CAMPOS

*Phytophthora* es uno de los patógenos de plantas más destructivos en todo el mundo y es responsable de graves pérdidas económicas en viveros de plantas ornamentales. En los últimos 10 años, como consecuencia de la detección de *Phytophthora ramorum*, agente causal de la “muerte súbita del roble”, las inspecciones fitosanitarias en viveros de plantas ornamentales se han intensificado en Europa para evitar la introducción y posterior propagación de este patógeno. Entre las medidas de emergencia adoptadas a nivel europeo se incluyen las inspecciones de todos los viveros en los que se producen hospedantes susceptibles. Estas prospecciones han revelado la presencia en los viveros de otras especies de *Phytophthora*, diferentes de *P. ramorum*. El objetivo de este trabajo fue estudiar las enfermedades causadas por dichas especies. Para ello se prospectaron 23 viveros de plantas ornamentales y se tomaron muestras de plantas con manchas foliares, clorosis, defoliación, muerte de brotes, chancros, gomosis, muerte regresiva y podredumbre radicular. Se realizaron aislamientos directamente de los tejidos afectados en el medio selectivo CMA-PARPBH. *Phytophthora* fue aislada consistentemente de una amplia gama de plantas ornamentales en el 70% de los viveros prospectados. Se detectó *Phytophthora* en 136 plantas pertenecientes a 22 órdenes, 29 familias y 41 géneros diferentes. Sobre la base de sus características morfológicas y mediante la secuenciación directa de la región ITS del ADN ribosomal con los cebadores ITS4-ITS6, trece especies de *Phytophthora* fueron identificadas: *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. hibernalis*, *P. multivora*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. niederhauserii*, *P. plurivora*, *P. syringae* y *P. tentaculata*. Los resultados mostraron la alta incidencia de *Phytophthora* spp. en viveros, observándose las mayores pérdidas económicas en plantas aromáticas afectadas por *P. nicotianae*, que fue a su vez la especie que se aisló con mayor frecuencia en este estudio. En todos los casos, se recomendaron medidas de control fitosanitarias, con el objetivo final de minimizar el daño causado, reducir su propagación dentro de las zonas de producción, y evitar su dispersión fuera de las mismas.

A. PÉREZ-SIERRA, B. MORA SALA, M. LEÓN, J. GARCÍA-JIMÉNEZ, P. ABAD-CAMPOS. Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia. E-mail: [aperesi@eaf.upv.es](mailto:aperesi@eaf.upv.es)

**Palabras clave:** ITS, aromáticas, oomicetos, detección.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos diez años se han intensificado las inspecciones fitosanitarias en viveros de plantas ornamentales debido a la detección de *Phytophthora ramorum* (WERRES *et al.*, 2001), agente causal de la “muerte súbita del roble”. *Phytophthora ramorum* es

uno de los organismos incluido en la lista de alerta de la EPPO (EPPO, 2002) y la Unión Europea tomó medidas de emergencia para evitar su entrada y diseminación en Europa (Decisiones 2002/757/EC, 2004/426/EC y 2007/201/EC). Estas medidas incluían inspecciones anuales de material vegetal susceptible a *P. ramorum* en viveros, jardines y

masas forestales. Aunque este organismo puede afectar a un amplio rango de hospedantes, las inspecciones se centraron principalmente en viveros con *Rhododendron*, *Viburnum* y *Camellia*. Al realizar estas inspecciones, se detectaron otras especies de *Phytophthora*, diferentes a *P. ramorum*, afectando a otros hospedantes, y causando pérdidas importantes. No hay estudios previos realizados en viveros de plantas ornamentales, excepto el realizado por TELLO *et al.* (1995), en el que investigaron la presencia de hongos fitopatógenos en viveros de plantas ornamentales de la Comunidad de Madrid. En dicho estudio, se prospectaron siete viveros de árboles y arbustos ornamentales principalmente en contenedor, y se detectaron organismos de la familia *Pythiaceae* (*Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.) en el 61% de las muestras estudiadas. Se identificaron dos especies de *Phytophthora*, *P. cactorum* en *Crataegus* sp. y *P. nicotianae* en *Lavandula* sp. Anterior a este estudio, PÁEZ *et al.* (1993) detectaron la presencia de *P. palmivora* en plantas de *Lavandula dentata*, *Eleagnus angustifolia* y *Tecomaria capensis* en los jardines de la Exposición Universal de Sevilla (EXPO-92). En este estudio se remarca la complejidad de la taxonomía de *Phytophthora* y se planteaba la importancia de temas como la introducción de nuevos patógenos mediante las importaciones y los posibles riesgos implicados. A partir del año 2002, las detecciones de *Phytophthora* en plantas ornamentales van ampliándose, y en España se detectan: *P. ramorum* en *Rhododendron* en una intercepción en Mallorca (MORALEJO y WERRES, 2002) en *Camellia japonica* (PINTOS-VARELA *et al.*, 2003) y en *Viburnum tinus* (PINTOS-VARELA *et al.*, 2004); *P. tentaculata* en *Verbena* sp. (MORALEJO *et al.*, 2004); *P. hedraiaandra* en *V. tinus* (MORALEJO *et al.*, 2005); *P. tentaculata* en *Santolina chamaecyparissus* (ÁLVAREZ *et al.*, 2006); *P. hibernalis* en *Rhododendron* (ÁLVAREZ *et al.*, 2007a); *P. nicotianae* en *Lavandula* sp. y *Rosmarinus* sp. (ÁLVAREZ *et al.*, 2007b). Recientemente, MORALEJO *et al.* (2009), detectaron 17 especies de *Phyto-*

*phthora* en 37 hospedantes diferentes. Cinco de las especies encontradas eran especies de descripción reciente, incluso algunas de ellas está en proceso de descripción, y se encontraron 37 nuevas combinaciones hospedante-patógeno. Este estudio pone de manifiesto que la presencia de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales es un problema tanto económico como fitosanitario para el sector viverista, y que los riesgos implicados deben estudiarse detenidamente. Por este motivo se realiza el estudio aquí presentado cuyos objetivos fueron: investigar la presencia de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales de la zona mediterránea y del norte de España, identificar las especies de *Phytophthora* detectadas y caracterizar la sintomatología observada en las plantas afectadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Prospección, toma de muestras y procesado

Se realizaron prospecciones entre los años 2004 y 2011 en viveros de plantas ornamentales de Valencia, Castellón y Asturias. Se prospectaron plantas en alveolo, en contenedor o en campo, que presentaban alguno de los siguientes síntomas: manchas foliares, clorosis, defoliación, muerte de brotes, exudación de goma, decaimiento, podredumbre y muerte súbita. Solamente se tomaron muestras de plantas sintomáticas.

La toma de muestras se realizó siguiendo la siguiente metodología: en el caso de plántulas y plantas pequeñas, se tomaron las plantas completas en sus bandejas o contenedores. En el caso de plantas en contenedores grandes, si presentaban marchitez o decaimiento y no presentaban manchas foliares, se eliminaba la parte aérea y se tomaba la parte basal incluyendo el cuello, raíces y sustrato, y si presentaban lesiones foliares, se tomaban también muestras de la parte aérea. En las muestras de campo, se tomaron muestras de las raíces y del suelo en plantas que mostraban decaimiento generalizado.

Las muestras de suelo se tomaron cercanas a las raíces, seleccionando suelo de cuatro puntos distintos alrededor de la planta y mezclándolo en una única bolsa por planta prospectada. Se tomaron muestras foliares de aquellas plantas que mostraban sintomatología foliar específica (manchas foliares, muerte de brotes, chancros en ramas, etc.).

Se realizaron aislamientos a partir de material vegetal afectado; para ello, las muestras se lavaron con agua del grifo para eliminar restos de materia orgánica o de suelo, se secaron y se sembraron fragmentos de unos tres mm del frente de avance de las lesiones o fragmentos de raíces en el medio selectivo CMA-PARPBH, modificado del PARP descrito por JEFFERS y MARTIN (1986): 17 g de CMA (harina de maíz-agar), 0,4 g de pimáricina, 0,125 g de ampicilina, 0,01 g de rifampicina, 0,02 g de benomilo, 0,101 g de pentacloronitrobenzeno, 0,069 g de himexazol y 1 litro de agua destilada. Los cultivos se incubaron en estufa a 25°C en oscuridad durante 2-3 días. De las colonias obtenidas, se repicaron puntas de hifas a PDA (39 g de patata-dextrosa-agar; 1 litro de agua destilada) para su posterior identificación.

En el caso de las muestras de suelo se utilizaron manzanas Granny Smith o Golden Delicious como trampas vegetales y se procesaron mediante la técnica de HENDRIX y CAMPBELL (1970): las manzanas se lavaron previamente con alcohol; en cada manzana se realizaron 4 agujeros de 10 mm de diámetro y 15 mm de profundidad con la ayuda de un sacabocados desinfectado previamente con alcohol. Se rellenó cada uno de los agujeros con la muestra de suelo o sustrato correspondiente y se saturó con agua destilada, cubriéndose cada uno de ellos con cinta adhesiva. Las manzanas se incubaron a temperatura ambiente hasta la aparición de lesiones (4-7 días). De las lesiones, se extrajeron pequeños fragmentos del frente de avance y se sembraron en medio CMA-PARPBH. Se repicaron puntas de hifas de las colonias resultantes a medio PDA.

### **Caracterización morfológica, fisiológica y cultural de los aislados**

Los cultivos puros obtenidos se identificaron a partir de sus características morfológicas, fisiológicas y culturales utilizando como referencia las claves de ERWIN y RIBEIRO (1996) y las publicaciones más recientes de GALLEGLY y HONG (2008), JUNG y BURGESS (2009) y SCOTT *et al.* (2009). Para la observación de estructuras asexuales, a partir del margen de la colonia de cada aislado crecido en medio agar jugoV8 (200 ml de zumo V8; 2 g de CaCO<sub>3</sub>; 15 g de agar; 800 ml de agua destilada), se extrajeron discos colonizados, que se colocaron en placas Petri con solución de extracto de suelo estéril. Tras 3 ó 4 días de incubación a temperatura ambiente, se observaron las características de los esporangios y otras estructuras asexuales inducidas. La solución extracto de suelo se obtuvo colocando en un erlenmeyer 100 g de suelo agrícola y 900 ml de agua destilada. La solución se agitó y se dejó reposar durante un período de 24 horas. A continuación, se añadieron 50 ml del sobrenadante a 950 ml de agua destilada, esterilizándose posteriormente su contenido.

Se observó la presencia de estructuras sexuales para confirmar su naturaleza homotálica o heterotálica. En los aislados heterotálicos se indujo la producción de gametangios mediante el método de los cultivos duales (ERWIN y RIBEIRO, 1996). En una placa Petri conteniendo medio agar jugo V8 se colocó un disco colonizado con el aislado a identificar y a 3 cm de éste, un disco colonizado con el aislado de referencia de los grupos de apareamiento A1 ó A2. Se utilizaron los aislados de referencia proporcionados por Sabine Werres del JKI (Julius Kühn - Institut), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute of Plant Protection in Horticulture and Forests, Braunschweig (Alemania), pertenecientes a los grupos A1 y A2 de *Phytophthora cryptogea*, aislados respectivamente de *Lewisia* sp. y de *Begonia* sp.. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C y se realizaron observaciones a los 15,

30 y 45 días después de las siembras para comprobar la formación de oosporas. Los aislados que produjeron gametos sexuales con el aislado de referencia A1 se consideraron del tipo de apareamiento A2, y los aislados que los formaron con el A2 se consideraron del tipo de apareamiento A1.

### Conservación de los cultivos

Los cultivos puros de todos los aislados obtenidos a partir de puntas de hifa se conservaron en solución extracto de suelo estéril y en tubos de agar de harina de avena (72,5 g/l de oatmeal agar, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a 15°C en oscuridad en la colección mantenida en el Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València (España).

### Identificación molecular

Para confirmar la identificación morfológica, los cultivos se identificaron a nivel molecular. Para ello, se procedió a la extracción del ADN con el kit comercial EZNA Plant DNA Miniprep (Omega Biotek). El ADN se visualizó en un sistema de documentación de geles en un gel de agarosa de 0.7% mediante la tinción con bromuro de etidio. El ADN se conservó a -20°C hasta su utilización. Mediante la técnica PCR se amplificó la región ITS del ADN ribosómico con los cebadores ITS-4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TATGC 3') e ITS-6 (5' GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG 3') (WHITE *et al.*, 1990; COOKE *et al.*, 2000). Cada reacción contenía 1x tampón PCR, 2.5 MgCl<sub>2</sub> mM, 200 µM de cada dNTP, 0.4 µM de cada cebador, 1 U de ADN *Taq* polimerasa (Dominion MBL, Córdoba, España), y 1 µl de ADN genómico. El volumen final se ajustó a 25 µl con agua (Chromasolv Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). La PCR se realizó en un termociclador programable (PTC 200, MJ Research) con las condiciones siguientes: un primer ciclo de 2 min

a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 45 s a 72°C, seguidos de 10 min a 72°C de extensión final. La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con el kit "High pure PCR product purification" (Roche), siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Los fragmentos purificados fueron secuenciados, utilizando los cebadores ITS4 e ITS6 y el kit ABI PRISM, que utiliza terminadores marcados y como enzima se utilizó la Amplitaq ADN polimerasa (Perkin Elmer). La secuenciación se realizó con el secuenciador automático ABI 373 ADN Sequencer por el Servicio de Secuenciación del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) de la Universitat Politècnica de València.

### Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron dos metodologías, dependiendo si se trataba de inoculación de sustrato o foliar. Las inoculaciones del sustrato se llevaron a cabo utilizando el método descrito por BABADOOST e ISLAM (2003): matraces que contenían 200 g de harina de avena, 120 ml de jugo V8 y 1 l de agua destilada se autoclavaron dos veces, se inocularon con 5 discos de agar colonizados con *Phytophthora* procedentes de colonias de 7 días de edad en V8 y se incubaron en oscuridad a 20°C durante 4 semanas. El inóculo de cada matraz se mezcló con el sustrato de siembra a una concentración del 3% (p/v). Las inoculaciones se realizaron en plantas de 6 a 8 meses de edad en contenedor. Se utilizaron 10 plantas por especie de *Phytophthora* inoculada y 10 plantas como control (inoculadas con medio estéril). Las plantas se inundaron durante 48 horas y posteriormente fueron regadas dos veces por semana manteniéndose en invernadero a una temperatura de 24 ± 5°C. En el caso de inoculaciones foliares, se inocularon 5 hojas en el envés con una gota de 40 µl de una suspensión de zoosporas (10<sup>4</sup>/ml). Las hojas inoculadas se incubaron en cámara húmeda a 20°C en oscuridad durante 8 días, y

se midió el área necrótica utilizando el software Assess-APS. Las hojas control fueron inoculadas con una gota de 40  $\mu$ l de agua destilada estéril. En ambos casos se realizaron aislamientos para confirmar los postulados de Koch.

## RESULTADOS

### *Prospección y procesado de muestras*

Se prospectaron un total de 23 viveros de plantas ornamentales, 19 en Valencia, 2 en

Castellón y 2 en Asturias analizándose un total de 360 plantas pertenecientes a 56 géneros diferentes. En general se observó una sintomatología muy variada predominando los síntomas de seca parcial o total de la parte aérea. Otros síntomas fueron manchas foliares, clorosis, enrojecimiento de las hojas, defoliación, marchitez, pérdida de vigor, exudaciones y muerte de la planta (Figura 1). En el sistema radicular de las plantas afectadas se observó lesiones localizadas, escaso desarrollo y/o carencia de raíces secundarias y muerte de raíces (Figura 2).



Figura 1. Síntomas observados en viveros de plantas ornamentales: manchas foliares, clorosis, enrojecimiento de hojas (fila superior, de izquierda a derecha), marchitez, muerte de brotes, muerte de ramas (fila central, de izquierda a derecha), muerte de tallos, exudaciones o muerte de la planta (fila inferior, de izquierda a derecha)



Figura 2. Síntomas en el sistema radicular: lesiones localizadas, escaso desarrollo y/o carencia de raíces secundarias y muerte de raíces

Se detectó la presencia de *Phytophthora* en 16 de los viveros prospectados (70%), en 12 de Valencia, 2 de Castellón y 2 de Asturias. Se aisló *Phytophthora* de 136 plantas (37.8%) pertenecientes a 22 órdenes, 29 familias y 41 géneros (Tabla 1). Se observaron principalmente infecciones singulares, aunque en el 13% de las muestras se detectaron infecciones múltiples (Tabla 1).

Tabla 1. Hospedantes, órdenes y familias en las que se han detectado infecciones causadas por *Phytophthora*, especies identificadas y tipo de apareamiento de dichas especies (Ho: homotática, A1: tipo de apareamiento A1, A2: tipo de apareamiento A2)

Hospedantes	Orden/Familia	<i>Phytophthora</i> sp.	Infección múltiple
<i>Abelia grandiflora</i>	Dipsacales/Caprifoliaceae	<i>P. plurivora</i> (Ho)	
<i>Agave</i> sp.	Asparagales/Agavaceae	<i>P. cryptogea</i>	
<i>Arbutus unedo</i>	Ericales/Ericaceae	<i>P. cryptogea</i> (A1), <i>P. nicotianae</i>	
<i>Aucuba japonica</i>	Garryales/Garryaceae	<i>P. cactorum</i> (Ho)	
<i>Azalea japónica</i> var. "Snow"	Ericales/Ericaceae	<i>P. cinnamomi</i>	
<i>Berberis</i> sp.	Ranunculales/Berberidaceae	<i>P. citrophthora</i> (-)	
<i>Buxus sempervirens</i>	Buxales/Buxaceae	<i>P. cryptogea</i>	
<i>Callistemon</i> sp.	Myrtales/Myrtaceae	<i>P. nicotianae</i> (A1)	
<i>Ceanothus</i> sp., <i>C. thyrsiflorus</i> var. <i>repens</i>	Rosales/Rhamnaceae	<i>P. nicotianae</i> (A2), <i>P. plurivora</i> (Ho)	
<i>Chamaerops excelsa</i> , <i>C. humilis</i>	Arecales/Arecaceae	<i>P. nicotianae</i> , <i>P. palmivora</i> (A1)	
<i>Cupressus</i> sp.	Pinales/Cupressaceae	<i>P. nicotianae</i> (A2)	
<i>Dipladenia</i> sp.	Gentianales/Apocynaceae	<i>P. nicotianae</i>	
<i>Enkianthus</i> sp.	Ericales/Ericaceae	<i>P. cactorum</i> (Ho)	
<i>Escallonia</i> sp., <i>E. rubra</i> , <i>E. rubra</i> var. <i>macrantha</i>	Escalloniales/Escalloniaceae	<i>P. drechsleri</i> , <i>P. nicotianae</i> (A1)	<i>P. drechsleri</i> / <i>P. nicotianae</i>
<i>Euonymus</i> sp., <i>E. 'Luna'</i> , <i>E. microphylla variegata</i> , <i>E. pulchellus</i>	Celastrales/Celastraceae	<i>P. citrophthora</i> (A1), <i>P. nicotianae</i> (A2), <i>P. palmivora</i>	<i>P. citrophthora</i> / <i>P. palmivora</i> ( en 3 ocasiones distintas)
<i>Genista</i> sp.	Fabales/Fabaceae	<i>P. multivora</i> (Ho)	
<i>Hebe 'Amy', H. diosmifolia</i>	Lamiales/Scrophulariaceae	<i>P. cactorum</i> (Ho), <i>P. multivora</i> (Ho), <i>P. nicotianae</i> (A1)	
<i>Hedera</i> sp.	Apiales/Araliaceae	<i>P. citrophthora</i> (-), <i>P. palmivora</i> (A1), <i>P. niederhauserii</i> (A1)	<i>P. citrophthora</i> / <i>P. palmivora</i>
<i>Ilex aquifolium</i>	Aquifoliales/Aquifoliaceae	<i>P. cinnamomi</i> (A2), <i>P. nicotianae</i>	
<i>Jasminum</i> sp.	Lamiales/Oleaceae	<i>P. citrophthora</i> , <i>P. cryptogea</i> (A2), <i>P. niederhauserii</i> (A1)	<i>P. cryptogea</i> / <i>P. niederhauserii</i>

Tabla 1. Hospedantes, órdenes y familias en las que se han detectado infecciones causadas por *Phytophthora*, especies identificadas y tipo de apareamiento de dichas especies (Ho: homotática, A1: tipo de apareamiento A1, A2: tipo de apareamiento A2) (Continuación)

Hospedantes	Orden/Familia	<i>Phytophthora</i> sp.	Infección múltiple
<i>Laurus nobilis</i>	Lurales/Lauraceae	<i>P. inundata</i> , <i>P. nicotianae</i> , <i>P. palmivora</i> ,	
<i>Lavandula</i> sp., <i>L. dentata</i> <i>L. angustifolia</i>	Lamiales/Lamiaceae	<i>P. cryptogea</i> , <i>P. nicotianae</i> (A1, A2), <i>P. palmivora</i> (A1)	<i>P. nicotianae</i> / <i>P. palmivora</i>
<i>Myrtus</i> sp., <i>M. communis</i>	Myrtales/Myrtaceae	<i>P. nicotianae</i> (A1), <i>P. palmivora</i>	<i>P. nicotianae</i> / <i>P. palmivora</i>
<i>Photinia</i> sp.	Rosales/Rosaceae	<i>P. cactorum</i> (Ho)	
<i>Pistacia lentiscus</i>	Sapindales/Anacardiaceae	<i>P. cryptogea</i> (A1), <i>P. nicotianae</i> (A1), <i>P. palmivora</i> (A1), <i>P. plurivora</i> (Ho)	<i>P. cryptogea</i> / <i>P. nicotianae</i> / <i>P. palmivora</i> , <i>P. citrophthora</i> / <i>P. cryptogea</i> / <i>P. nicotianae</i> / <i>P. plurivora</i>
<i>Pittosporum tobira</i>	Apiales/Pittosporaceae	<i>P. citrophthora</i> (-), <i>P. inundata</i> , <i>P. multivora</i> (Ho), <i>P. palmivora</i> (A1)	<i>P. citrophthora</i> / <i>P. inundata</i> / <i>P. multivora</i> / <i>P. palmivora</i>
<i>Plumbago</i> sp.	Caryophyllales/Plumbaginaceae	<i>P. nicotianae</i> (A2)	
<i>Polygala myrtifolia</i>	Fabales/Polygalaceae	<i>P. nicotianae</i> (Ho)	
<i>Punica granatum</i>	Myrtales/Punicaceae	<i>P. nicotianae</i> , <i>P. niederhauserii</i> (A1), <i>P. palmivora</i> (A1)	<i>P. nicotianae</i> / <i>P. niederhauserii</i> / <i>P. palmivora</i>
<i>Pyracantha</i> sp.	Rosales/Rosaceae	<i>P. cactorum</i> (Ho)	
<i>Rhododendron</i> sp.	Ericales/Ericaceae	<i>P. hibernalis</i> (Ho), <i>P. nicotianae</i>	
<i>Rosa</i> sp.	Rosales/Rosaceae	<i>P. citrophthora</i> (-)	
<i>Rosamarinus officinalis</i> , <i>R. officinalis</i> 'Postratus'	Lamiales/Lamiaceae	<i>P. citrophthora</i> (-), <i>P. cryptogea</i> (A1), <i>P. nicotianae</i> (A1, A2), <i>P. palmivora</i>	<i>P. citrophthora</i> / <i>P. nicotianae</i>
<i>Salvia officinalis</i>	Lamiales/Lamiaceae	<i>P. citrophthora</i> (-)	
<i>Santolina chamaecyparissus</i>	Asterales/Asteraceae	<i>P. cryptogea</i> , <i>P. nicotianae</i> (A1), <i>P. tentaculata</i> (Ho)	<i>P. nicotianae</i> / <i>P. tentaculata</i> , <i>P. cryptogea</i> / <i>P. nicotianae</i>
<i>Taxus baccata</i>	Pinales/Taxaceae	<i>P. cinnamomi</i> , <i>P. citrophthora</i> (-), <i>P. nicotianae</i> (A1)	<i>P. citrophthora</i> / <i>P. cinnamomi</i> <i>P. cinnamomi</i> / <i>P. nicotianae</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiales/Lamiaceae	<i>P. nicotianae</i> (A1)	
Tiarella sp.	Saxifragales/Saxifragaceae	<i>P. citrophthora</i> (A1)	
<i>Trachycarpus</i> sp.	Arecales/Arecaceae	<i>P. palmivora</i> (A1)	
<i>Viburnum</i> sp., <i>V. tinus</i> , <i>V. lantana</i>	Dipsacales/Caprifoliaceae	<i>P. cactorum</i> (Ho), <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. multivora</i> (Ho)	
<i>Washingtonia robusta</i>	Arecales/Arecaceae	<i>P. palmivora</i> (A1)	

*Caracterización morfológica, cultural y molecular de los aislados*

Se obtuvieron 156 aislados de *Phytophthora* que se pudieron agrupar por su patrón de crecimiento y por la morfología de su colonia en PDA en 13 grupos diferentes, 10 de las cuales se muestran en la Figura 3. Estos grupos se identificaron en base a las características morfológicas de las estructuras asexuales observadas tras la inducción en

solución extracto de suelo. Se identificaron las siguientes especies: *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. hibernalis* (Figura 4), *P. inundata*, *P. multivora*, *P. niederhauserii* (Figura 4), *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. plurivora* y *P. tentaculata* (Figura 4). La identificación de estas especies fue confirmada por la secuenciación de su región ITS y la comparación de dichas secuencias con las depositadas en GenBank.

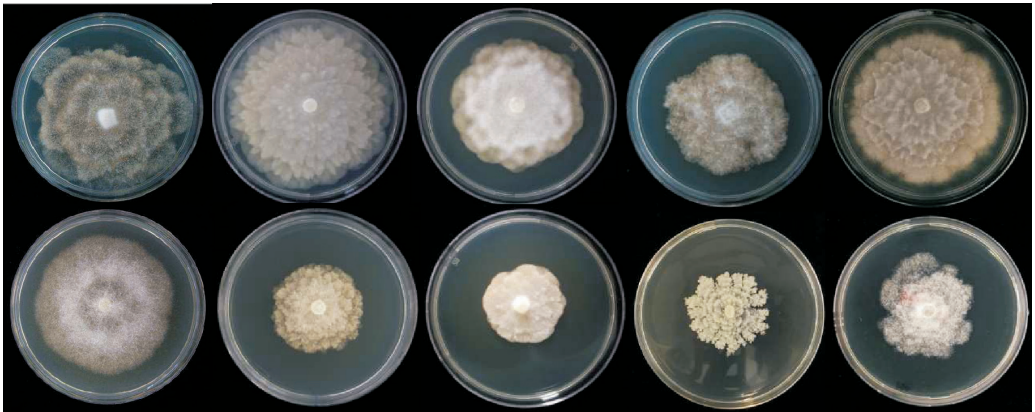


Figura 3. Morfología de colonias en medio PDA de diez de las *Phytophthora* spp. aisladas: *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. multivora* (fila superior, de izquierda a derecha), *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora*, *P. syringae* y *P. tentaculata* (fila inferior, de izquierda a derecha)



Figura 4. Morfología de los esporangios de las especies de *Phytophthora*: *P. hibernalis* (a), *P. niederhauserii* (b), *P. tentaculata* (c)



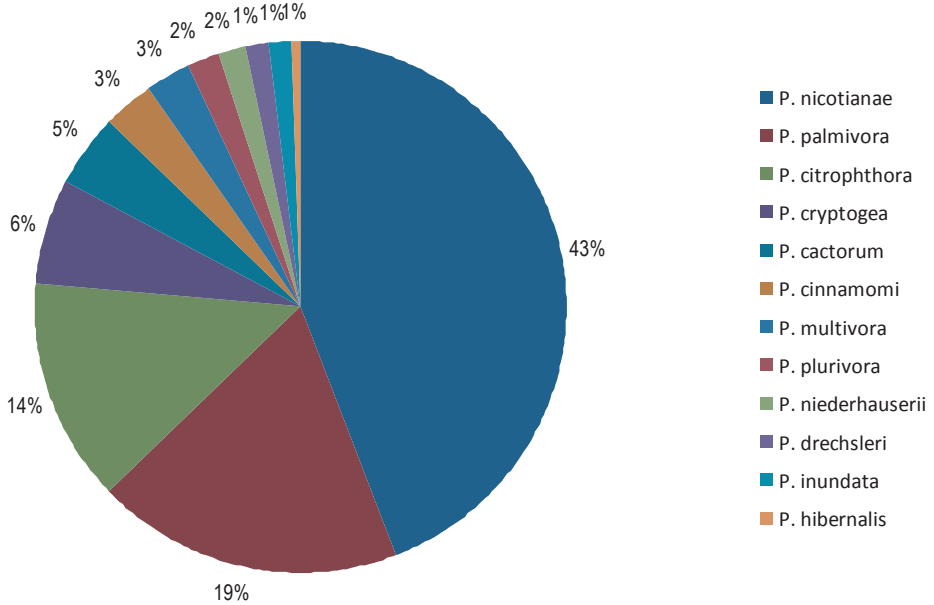


Figura 5. Frecuencia de aislamiento de las diferentes especies de *Phytophthora* en los viveros de plantas ornamentales prospectados

La frecuencia de aislamiento de cada una de las especies de *Phytophthora* se muestra en la Figura 5. Todas estas especies se detectaron en suelo, en sustrato o en las raíces de las plantas afectadas, excepto *P. hibernalis*, que se aisló sólo de manchas foliares en plantas de *Rhododendron* en Asturias. Algunas especies además de detectarse en suelo o raíces, también se aislaron de la parte aérea: *P. cactorum* se aisló de manchas foliares en *Aucuba* y *Photinia*, y *P. nicotianae* se aisló de brotes necróticos de *Lavandula*. La única especie que se aisló de muestras de suelo en cultivos en campo fue *P. cinnamomi*.

El tipo de apareamiento se determinó para las especies heterotálicas (Tabla 1). Algunos aislados de *P. citrophthora* resultaron estériles y de algunos de los aislados no se pudo identificar el tipo de apareamiento.

### Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron para las siguientes combinaciones hospedante-patógeno: *Santolina chamaecyparissus*-*P. tentaculata* y *Rhododendron*-*P. hibernalis*. En la primera combinación, se realizaron inoculaciones del sustrato y las plantas inoculadas mostraron marchitez de la parte aérea, correspondiéndose con necrosis en el sistema radicular y muerte de la planta a los dos meses de la inoculación (Figura 6). En todos los casos se reaisló la especie de *Phytophthora* inoculada de las raíces de las plantas. Las plantas control no mostraron ningún síntoma de la enfermedad. En el caso de las inoculaciones aéreas, se utilizaron hojas de *Rhododendron* híbrido “Brigitte”. Todas las hojas inoculadas con *P. hibernalis* desarrollaron lesiones necróticas que midieron desde



Figura 6. Muerte de plantas de *Santolina chamaecyparissus* crecidas en sustrato inoculado con *Phytophthora tentaculata*

0,25 hasta 1,5 cm<sup>2</sup>. *P. hibernalis* se reaisló del tejido infectado en todos los casos. Las hojas inoculadas con agua destilada estéril no mostraron ningún tipo de lesión.

## DISCUSIÓN

Los estudios centrados en las enfermedades causadas por *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales en España son escasos, y los resultados obtenidos han constatado que las afecciones causadas por estos patógenos son frecuentes y que pueden afectar a un amplio rango de hospedantes, causando una sintomatología muy diversa. En este trabajo se ha confirmado su presencia en el 70% de los viveros prospectados con pérdidas en ocasiones muy importantes. Este ha sido el caso de la pérdida de toda la producción de plantas de *Santolina chamaecyparissus* causada por *P. tentaculata* (ÁLVAREZ *et al.*, 2006) o la pérdida de toda la producción de *Rosmarinus* sp. o *Lavandula* sp. causada por *P. nicotianae* (ÁLVAREZ *et al.*, 2007b) en uno de los viveros estudiados.

Las especies *P. hibernalis*, *P. niederhauerii* y *P. tentaculata* han constituido nuevas citas en España en sus hospedantes correspondientes; *P. multivora* y *P. plurivora* son especies de reciente descripción, que se en-

contraban dentro del “complejo *P. citricola*” y que han sido separadas como nuevas especies por JUNG y BURGESS (2009) y SCOTT *et al.* (2009); y *P. inundata* fue descrita por BRASIER *et al.* (2003) como patógena de plantas leñosas en vegetación de ribera y en ornamentales como *Aesculus* y *Salix* o plantas cultivadas como *Olea* y *Prunus* en zonas encharcadas o inundadas. Esta sería la primera cita de *P. inundata* en *Laurus nobilis* y *Pittosporum tobira*.

Aunque en la mayoría de los casos se han detectado infecciones singulares, también se han detectado infecciones múltiples. Este hecho hace plantear una serie de preguntas que necesitan ser estudiadas como pueden ser entre otras, la posible predilección entre hospedante-patógeno, la competencia entre dichas especies, la patogenicidad de las mismas y las condiciones que favorecen dichas infecciones.

Estudios similares destacando la importancia de *Phytophthora* en viveros de plantas ornamentales se han llevado a cabo en otros países como Australia (HARDY y SIVASITHAMPARAM, 1988) y EEUU (DANAHOO y LAMOUR, 2008; FERGUSON y JEFFERS, 1999; LINDERMAN *et al.*, 2006; SCHWINGLE *et al.*, 2007; SCHWINGLE y BLANCHETTE, 2008; YAKABE *et al.*, 2009). En Europa, no hay estudios similares excepto el realizado en

España por MORALEJO *et al.* (2009), pero sí hay numerosas citas de especies de *Phytophthora* específicas en hospedantes concretos: *P. nicotianae* en *Skimmia japonica* en Italia (GARIBALDI *et al.*, 2004), *P. syringae* en *Pyracantha* en el Reino Unido (HENRICOT *et al.*, 2004), *P. citricola* en *Laurus nobilis* en Bélgica (CREPEL *et al.*, 2005), *P. cryptogea* en *Lantana* en Italia (CACCIOLA *et al.*, 2005), *P. cactorum* en *Photinia fraseri* en Italia (VETTRAINO *et al.*, 2005), *P. hedraiaandra* en *Rhododendron* en Eslovenia (MUNDA *et al.*, 2006), *P. ramorum* en *Rhododendron* en Francia (HUSSON *et al.*, 2007), *P. citricola* en *Rhododendron* en la República Checa (MRAZKOVA *et al.*, 2007), *P. niederhauserii* en plantas de invernadero en Noruega (HERRERO *et al.*, 2008), *P. citrophthora* en *Syringa vulgaris* en Polonia (ORLIKOWSKI y PTASZEK, 2010), *P. ramorum* en ornamentales en Serbia (BULAJIĆ *et al.*, 2010), *P. nicotianae* en *Rhododendron* en Grecia (TSOPELAS *et al.*, 2011), *P. citrophthora* en ornamentales leñosas en Hungría (JÓZSA *et al.*, 2011) y *P. lateralis* en *Thuja occidentalis* en Escocia (SCHLENZIG *et al.*, 2011). El elevado número de publicaciones de *Phytophthora* en plantas ornamentales a partir del año 2002 se debe, por un lado a la descripción de *P. ramorum* en Europa y a la legislación referente a este patógeno, a la mayor especialización del personal técnico que trabaja con oomicetos y a las nuevas técnicas de detección de los mismos.

*Phytophthora* puede ser introducida en los viveros con material vegetal infectado, con sustrato contaminado o con el agua de riego. En algunas ocasiones los viveros se establecen en antiguas zonas agrícolas, y las plantas están en contacto directo con el suelo, que podría estar contaminado con *Phytophthora*. La reutilización de sustratos, bandejas o contenedores pueden ser también foco de infección si no son desinfectados adecuadamente. Una vez que *Phytophthora* se ha establecido en el vivero, su diseminación es principalmente por agua de riego y por las prácticas culturales, intensidad del cultivo, movimiento de plantas, manejo de restos vegetales,

incluso el propio personal o los vehículos utilizados (DANAHOO y LAMOUR, 2008; GHIMIRE *et al.*, 2011; HONG *et al.*, 2008; 2010; LINDERMAN y DAVIS, 2006; MACDONALD *et al.*, 1994). Por último, algunas de las especies de *Phytophthora* pueden representar un riesgo para los ecosistemas semi-naturales y naturales y hay que tener en cuenta que el movimiento de material vegetal puede ser un catalizador de estos problemas.

Durante este estudio sólo se prospectaron plantas sintomáticas; por ello, no se han detectado posibles infecciones latentes que pueden afectar a otros hospedantes, y que al no mostrar síntomas, pasan desapercibidas durante las inspecciones. Es importante identificar estas infecciones asintomáticas puesto que son fuente de inóculo para futuras infecciones. Otra de las dificultades encontrada durante las inspecciones es la aplicación de fungicidas para enmascarar la sintomatología causada por *Phytophthora*. De acuerdo con la decisión de la Comisión Europea, el tratamiento con fungicidas en viveros con hospedantes susceptibles a *P. ramorum* está prohibido. Sin embargo, en numerosas ocasiones se ha observado la sintomatología característica de *Phytophthora* en plantas ornamentales y no ha sido posible el aislamiento de dichos organismos.

La situación detectada en España parece similar a la encontrada en otros países; sin embargo, es un tema muy delicado para el sector viverista, al tratarse de plantas dedicadas, en muchas ocasiones, a la exportación. Por ello, sería recomendable trabajar de forma conjunta para intentar reducir las afecciones causadas por *Phytophthora* en los viveros y minimizar su diseminación. Para ello recomendamos establecer formas de trabajo coordinadas, con el objetivo final de producir planta libre de estos patógenos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con financiación del Proyecto AGL2007-64690 (Minis-

terio de Educación y Ciencia, Fondos FEDER). Agradecemos el apoyo de E. Landeras de Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado de Asturias, a L.

Álvarez, A. Román, O. Martínez, V. Garrigues de la Universidad Politécnica de Valencia y a todos los viveristas que han participado en estos estudios.

#### ABSTRACT

PÉREZ-SIERRA, A., B. MORA-SALA, M. LEÓN, J. GARCÍA-JIMÉNEZ, P. ABAD-CAMPOS. 2012. Diseases caused by *Phytophthora* in ornamental plant nurseries. Bol. San. Veg. Plagas, **38**: 143-156.

*Phytophthora* is one of the most destructive plant pathogens worldwide and it is responsible for serious economical losses in woody ornamental nurseries. In the last 10 years, surveys in ornamental nurseries have intensified in Europe as a result of the detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. European emergency measures were taken to avoid further introductions and spread of this pathogen and these included inspections of all nurseries where susceptible hosts were grown. During these surveys it was revealed that other *Phytophthora* spp. were present causing disease in almost all nurseries. Plants showing leaf spots, twig blight, chlorosis, defoliation, stem cankers, gummosis, dieback or root rot symptoms were sampled. Isolations were made directly from affected tissues onto CMA-PARPBH selective media and PDAS. *Phytophthora* was isolated consistently from a wide range of ornamental plants in 70% of the nurseries surveyed. It was detected in 136 plants belonging to 22 orders, 29 families and 41 different genera. Thirteen different *Phytophthora* species were identified based on morphological features and by direct sequencing of the ITS region of ribosomal DNA with the primers ITS4-ITS6: *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. hibernalis*, *P. multivora*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. niederhauserii*, *P. plurivora*, *P. syringae* and *P. tentaculata*. The results showed the high incidence of *Phytophthora* spp. in nurseries, with important economical losses in aromatic plants caused by *P. nicotianae* that was also the most frequently isolated species. Control measures were recommended to minimize the damage caused by these pathogens and to avoid further problems with the ultimate goal of reducing their spread in nurseries.

**Key words:** ITS, aromatic, oomycetes detection.

#### REFERENCIAS

- ÁLVAREZ, L. A., PÉREZ-SIERRA, A., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ J. 2007b. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates causing collar and root rot of lavender and rosemary in Spain. *Journal of Plant Pathology*, **89**: 261-264.
- ÁLVAREZ, L. A., PÉREZ-SIERRA, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ABAD-CAMPOS, P. 2007a. First report of leaf spot and twig blight of *Rhododendron* spp. caused by *Phytophthora hibernalis* in Spain. *Plant Disease* **91**: 909.
- ÁLVAREZ, L. A., PÉREZ-SIERRA, A., LEÓN, M., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2006. Lavender cotton root rot: a new host of *Phytophthora tentaculata* found in Spain. *Plant Disease*, **90**: 523.
- BABADOOST, M., ISLAM, S. Z. 2003. Fungicide seed treatment effects on seedling damping-off of pumpkin caused by *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, **87**: 63-68.
- BRASIER, C. M., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E., KIRK, S. A. 2003. *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological Research*, **107**: 477-484.
- BULAJIĆ, A., DJEKIĆ, I., JOVIĆ, J., KRNJAJIĆ, S., VUČUROVIĆ, A., KRSTIĆ, B. 2010. *Phytophthora ramorum* occurrence in ornamentals in Serbia. *Plant Disease*, **94**: 703-708.
- CACCIOLA, S. O., CHIMENTO, A., PANE, A., COOKE, D. E. L., MAGNANO DI SAN LIO, G. 2005. Root and foot rot of lantana caused by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Disease*, **89**: 909.
- COOKE, D. E. L., DRENTH, A., DUNCAN, J. M., WAGELS, G., BRASIER, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, **30**: 17-32.
- CREPEL, C., INGHELBRECHT, S., BAEYEN, S., MAES, M., BOBEV, S. G. 2005. First Report of leaf spots on *Laurus nobilis* caused by *Phytophthora citricola* in Belgium. *Plant Disease*, **89**: 107.

- DONAHOO, R. S., LAMOUR, K. H. 2008. Characterization of *Phytophthora* species from leaves of nursery woody ornamentals in Tennessee. *HortScience*, **43**: 1833-1837.
- E.P.P.O. 2002. Alert List- *Phytophthora ramorum* Sudden Oak Death. <http://www.eppo.org>
- ERWIN, D. C., RIBEIRO, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. A.P.S. Press. St. Paul. Minnesota, 55121-2097 USA.
- FERGUSON, A. J., JEFFERS, S. N. 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Disease*, **83**: 1129-1136.
- GALLEGLY, M., HONG, C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprint. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Mn. 158pp.
- GARIBALDI, A., BERTETTI, D., GULLINO, M. L. 2004. First report of *Phytophthora nicotianae* on *Skimmia japonica* in Italy. *Plant Disease*, **88**: 905.
- GHIMIRE, S. R., RICHARDSON, P. A., KONG, P., HU, J., LEA-COX, J. D., ROSS, D. S., MOORMAN, G. W., HONG, C. 2011. Distribution and diversity of *Phytophthora* species in nursery irrigation reservoir adopting water recycling system during winter months. *Journal of Phytopathology*, **159**: 713-719.
- HARDY, G. E., SIVASITHAMPARAM, K. 1988. *Phytophthora* spp. associated with container-grown plants in nurseries in Western Australia. *Plant Disease*, **72**: 432-437.
- HENDRIX, F. F., CAMPBELL, W. A. 1970. Distribution of *Phytophthora* and *Pythium* species in soils in the continental United States. *Canadian Journal of Botany*, **48**: 377-384.
- HENRICOT, B., WAGHORN, I., DENTON, G., PÉREZ SIERRA, A. M. 2004. First report of fruit rot caused by *Phytophthora syringae* on *Pyracantha* in the UK. *New Disease Reports*, **9**: 27.
- HERRERO, M. L., DE COCK, A. M., KLEMSDAL, S., TOPE, B. 2008. *Phytophthora niederhauserii* in greenhouse pot plants in Norway. *Journal of Plant Pathology*, **90**: S2.188.
- HONG, C., GALLEGLY, M. E., RICHARDSON, P. A., KONG, P., MOORMAN, G. W., LEA-COX J. D., ROSS, D. S. 2008. *Phytophthora irrigata* and *Phytophthora hydropathica*, two new species from irrigation water at ornamental plant nurseries. *Phytopathology*, **98**: S68.
- HONG, C., GALLEGLY, M. E., RICHARDSON, P. A., KONG, P., MOORMAN, G. W., LEA-COX J. D., ROSS, D. S. 2010. *Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. *Plant Pathology*, **59**: 913-921.
- HUSSON, C., DELATOUR, C., FREY, P., MARÇAIS, B., SAURAT, C., SCHENCK, N. 2007. First report of *Phytophthora ramorum* on ornamental plants in France. *Plant Disease*, **91**: 1359.
- JEFFERS, S. N., MARTIN, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, **70**: 1038-1043.
- JÓZSA, A., NAGY Z. Á., SZIGETHY, A., FISCHL, G., BAKONYI J. 2011. First report of *Phytophthora citro-*
- phthora* causing root and basal stem rot of woody ornamentals in Hungary. *Plant Disease*, **95**: 1193.
- JUNG, T., BURGESS T. I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, **22**: 95-110.
- LINDERMAN, R. G., DAVIS, E. A. 2006. Survival of *Phytophthora ramorum* compared to other *Phytophthora* in potting media components, compost, and soil. *HorTechnology*, **16**: 502-507.
- LINDERMAN, R. G., DAVIS, E. A., MARLOW J. L. 2006. Response of selected nursery crop plants to inoculation with isolates of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* species. *HorTechnology*, **16**: 216-224.
- MACDONALD, J. D., ALI-SHTAYEH, M. S., KABASHIMA, J., STITES, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Disease*, **78**: 607-611.
- MORALEJO, E., BELBAHRI, L., CALMIN, G., LEFORT, F., GARCÍA, J. A., DESCALS, E. 2005. First report of *Phytophthora hedraiaandra* on *Viburnum tinus* in Spain. *New Disease Reports*, **12**: 28.
- MORALEJO, E., PÉREZ-SIERRA, A., ÁLVAREZ, L. A., BELBAHRI, L., LEFORT, F., DESCALS, E. 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology*, **58**: 100-110.
- MORALEJO, E., PUIG, M., MAN IN'T VELD, W.A. 2004. First report of *Phytophthora tentaculata* on *Verbena* sp. in Spain. *New Disease Reports* **9**: 38.
- MORALEJO, E., WERRES, S. 2002. First Report of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* sp. in Spain. *Plant Disease*, **86**: 1052.
- MRAZKOVA, M., CERNY, K., GABRIELOVA, S., TOMSOVSKY, M. 2007. First report of leaf spot, shoot blight, and stem and collar canker of *Rhododendron* spp. caused by *Phytophthora citricola* in the Czech Republic. *Plant Disease*, **91**: 1515.
- MUNDA, A., ŽERJAV, M., SCHROERS, H.-J. 2006. *Phytophthora hedraiaandra* occurs on rhododendron in Slovenia. *New Disease Reports*, **14**: 16.
- ORLIKOWSKI, L., PTASZEK, M. 2010. First notice of *Phytophthora* stem base rot on *Syringa vulgaris* in a Polish field nursery. *Journal of Plant Protection Research*, **50**: 442-445.
- PAEZ J. I., BERRA D., VEGA J. M. A., TELLO J. 1993. Identificación de *Phytophthora palmivora* Butler en los jardines de la Exposición Universal de Sevilla (EXPO-92). *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, **19**: 633-647.
- PINTOS VARELA, C., MANSILLA-VÁZQUEZ, J. P., AGUÍN-CASAL, O. 2003. First report of *Phytophthora ramorum* on *Camellia japonica* in Spain. *Plant Disease*, **87**: 1396.
- PINTOS VARELA, C., MANSILLA-VÁZQUEZ, J. P., AGUÍN-CASAL, O. 2004. *Phytophthora ramorum* nuevo patógeno en España sobre *Camellia japonica* y *Viburnum tinus*. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, **30**: 97-111.
- SCOTT, P. M., BURGESS, T. I., BARBER, P. A., SHEARER, B. L., STUKELY, M. J. C., HARDY, G. E. ST. J.,

- JUNG, T. 2009. *Phytophthora multivora* sp. nov., a new species recovered from declining *Eucalyptus*, *Banksia*, *Agonis* and other plant species in Western Australia. *Persoonia*, **22**: 1-13.
- SCHWINGLE, B. W., BLANCHETTE, R. A. 2008. Host range investigations of new, undescribed, and common *Phytophthora* spp. isolated from ornamental nurseries in Minnesota. *Plant Disease*, **92**: 642-647.
- SCHWINGLE, B. W., SMITH, J. A., BLANCHETTE, R. A. 2007. *Phytophthora* species associated with diseased woody ornamentals in Minnesota nurseries. *Plant Disease*, **91**: 97-102.
- SCHLENZIG, A., CAMPBELL, R., MULHOLLAND, V. 2011. *Thuja occidentalis*: a new host for *Phytophthora lateralis*. *New Disease Reports*, **24**: 8.
- TELLO MARISCAL, M. L., ALONSO, A., MATEO-SAGASTA AZPEITIA, E. 1995. Algunos hongos patógenos detectados en raíces de diferentes plantas ornamentales en viveros de la Comunidad de Madrid. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, **21**: 517-526.
- TSOPELAS, P., PAPLOMATAS, E. J., TJAMOS, S. E., ELENA, K. 2011. First record of *Phytophthora nicotianae* causing leaf blight on *Rhododendron* in Greece. *Plant Disease*, **95**: 777.
- VETTRAINO, A. M., ANTONACCI, L., FLAMINI, L., NIPOTI, P., ROSSINI, E., RIGHI, M., VANNINI, A. 2005. First report of crown rot of *Photinia fraseri* caused by *Phytophthora cactorum*. *New Disease Reports*, **12**: 32.
- WERRES, S., MARWITZ, R., MAN IN'T VELD, W. A., DE COCK, A. W. A. M., BONANTS, P. J. M., DE WEERDT, M., THEMANN, K., ILIEVA, E., BAAAYEN, R. P. 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendrom* and *Viburnum*. *Mycological Research*, **105**: 1155-1165.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 315-22.
- YAKABE, L. E., BLOMQUIST, C. L., THOMAS, S. L., MACDONALD, J. D. 2009. Identification and frequency of *Phytophthora* species associated with foliar diseases in California ornamental nurseries. *Plant Disease*, **93**: 883-890.

(Recepción: 6 febrero 2012)  
(Aceptación: 20 abril 2012)