



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO
Pythium ASOCIADO A ENFERMEDADES DE RAÍZ DE CRISANTEMO
(*Chrysanthemum* sp.) Y DALIAS (*Dahlia* sp.) MEDIANTE SECUENCIACIÓN
DE LA REGIÓN ITS Y DE LOS GENES *COX I* Y *COX II***

AUTOR: CARRERA LÓPEZ, DANIEL ALEXIS

DIRECTOR: FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER, PhD.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Pythium* ASOCIADO A ENFERMEDADES DE RAÍZ DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum* sp.) Y DALIAS (*Dahlia* sp.) MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS Y DE LOS GENES *COX I* Y *COX II*” fue realizado por el señor **Carrera López, Daniel Alexis** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.**

Sangolquí, Julio de 2019

Firma:



Flores Flor, Francisco Javier PhD.
C.C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Carrera López, Daniel Alexis**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Pythium* ASOCIADO A ENFERMEDADES DE RAÍZ DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum* sp.) Y DALIAS (*Dahlia* sp.) MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS Y DE LOS GENES *COX I* Y *COX II*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, Julio de 2019

Firma:

.....
Carrera López, Daniel Alexis
C.C. 1723610729



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Carrera López, Daniel Alexis** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Pythium* ASOCIADO A ENFERMEDADES DE RAÍZ DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum* sp.) Y DALIAS (*Dahlia* sp.) MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS Y DE LOS GENES *COX I* Y *COX II*”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, Julio de 2019

Firma:



Carrera López, Daniel Alexis
C.C. 1723610729

DEDICATORIA

A mi familia y amigos, por el apoyo constante e incondicional que me han brindado durante mi formación profesional.

Daniel Alexis Carrera López

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma (OSU), de manera particular a Carla Garzón, PhD. por brindarme la oportunidad de participar en una de sus investigaciones y poder realizar mi proyecto de titulación a partir de esta. Por su guía, preocupación, confianza y constante enseñanza durante mi estancia de investigación. Al Departamento de Fitopatología y Biología de Plantas y Microbios de la Universidad de Cornell y a la M.Sc. Margery Daughtrey, por proporcionar las muestras y financiar el desarrollo del presente estudio.

A la M.Sc. María Fernanda Proaño Cuenca, por su constante apoyo, confianza, sabiduría, paciencia, guía, consejos y amistad durante el desarrollo de mi trabajo de titulación. También a todos los profesionales del Departamento de Entomología y Patología de Plantas de la Universidad Estatal de Oklahoma, quienes mostraron siempre un ambiente de amistad, respeto y confianza.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, al Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura y a las autoridades y docentes del Programa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología; quienes por medio de sus enseñanzas y conocimientos contribuyeron en mi formación académica y personal. De manera especial a mi Director PhD. Francisco Flores y a mi Codirectora M.Sc. Alma Koch, por el apoyo personal y científico durante la realización de mi tesis.

A la M.Sc. Alma Koch, por toda la ayuda proporcionada desde el inicio de mi trabajo de titulación hasta la culminación del mismo. Por haberme permitido expandir mis horizontes y con ello crecer

profesional y personalmente, por confiar en mi capacidad y ayudarme a desarrollar mi potencial. Le estaré siempre agradecido.

A mis padres, por el soporte incondicional, por todos los valores que me han enseñado, por la paciencia y por todos los sacrificios que han hecho por mí para que pueda seguir creciendo como persona. Son mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos y a mi cuñado, por estar conmigo en todo momento, brindándome su apoyo, sus consejos y su tiempo.

A mis sobrinos, por toda la alegría que trajeron a mi vida desde que llegaron a ella y por su confianza y amor incondicional.

A Cristina Cajas, por estar junto a mí en todo momento, por hacerme crecer como persona y apoyarme en cada decisión que he tomado. Por su paciencia, amor, consejos y por todo lo que hemos compartido.

A mis amigos y compañeros, especialmente a Diego, Sofía, Sebastián, Carolina, Marianela, Nadia y Jessica; por el constante apoyo, amistad y confianza que me han brindado.

Finalmente, a la Doctora Kitty Cardwell y a su esposo Joseph Goldberg, por recibirme en su hogar durante la realización experimental de este proyecto, por su hospitalidad y generosidad infinita.

GRACIAS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
LISTADO DE TABLAS	xi
LISTADO DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Marco teórico	5

1.4.1	Género <i>Pythium</i>	5
1.4.2	Identificación morfológica	11
1.4.3	Identificación molecular	12
1.4.4	Análisis filogenético	17
1.4.5	Análisis de diversidad genética	20
1.4.6	Crisantemos (<i>Chrysanthemum</i> sp.)	21
1.4.7	Dalias (<i>Dahlia</i> sp.)	22
1.5	Hipótesis	24
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		25
2.1	Instituciones participantes	25
2.2	Colaboradores científicos	25
2.3	Área de estudio.....	25
2.4	Metodología.....	25
2.4.1	Muestras analizadas	25
2.4.2	Caracterización molecular	26
2.4.3	Secuenciación	31
2.4.4	Análisis bioinformático	32
2.4.5	Reconstrucción de la filogenia del género <i>Pythium</i>	33
2.4.6	Evaluación de la diversidad genética.....	37

CAPÍTULO 3. RESULTADOS	39
3.1 Caracterización molecular	39
3.1.1 Extracción y cuantificación de ADN	39
3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa	39
3.2 Secuenciación	47
3.2.1 Región ITS	47
3.2.2 Genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>	47
3.3 Análisis bioinformático	47
3.3.1 Región ITS	47
3.3.2 Genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>	49
3.4 Reconstrucción de la filogenia del género <i>Pythium</i>	51
3.4.1 Región ITS	51
3.4.2 Genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>	56
3.4.3 Árbol filogenético concatenado (región ITS y genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>)	60
3.5 Evaluación de la diversidad genética	62
3.5.1 Composición nucleotídica y frecuencia de pares de nucleótidos	62
3.5.2 Estimación de los índices de diversidad genética	64
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	67
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	80

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES.....82

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....83

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	<i>Componentes de 250 mL de buffer de lisis CTAB.</i>	26
Tabla 2	<i>Características de los primers empleados en las reacciones de PCR y secuenciación para la región ITS.</i>	28
Tabla 3	<i>Características de los primers empleados en las reacciones de PCR y secuenciación para los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>.</i>	28
Tabla 4	<i>Volúmenes de los reactivos empleados en el desarrollo de la PCR para la amplificación de la región ITS y genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> en un volumen de reacción de 25μL.</i>	29
Tabla 5	<i>Configuración del termociclador para la amplificación de la región ITS empleando los primers ITS5 e ITS4.</i>	29
Tabla 6	<i>Configuración del termociclador para la amplificación de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> empleando los primers FM35 y FM52.</i>	30
Tabla 7	<i>Número de accesión de las secuencias referencia de la región ITS y de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>, empleadas en el análisis filogenético del género <i>Pythium</i>.</i>	33
Tabla 8	<i>Especies del género <i>Pythium</i> en crisantemos y dalias identificadas con base enl análisis de similitudde la región ITS.</i>	49
Tabla 9	<i>Diversidad de especies dentro del complejo <i>Pythium irregulare</i> s.l. mediante análisis de similitudde los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>.</i>	51
Tabla 10	<i>Resumen de la composición nucleotídica y longitud de las secuencias de la región ITS del complejo <i>Pythium irregulare</i>.</i>	62
Tabla 11	<i>Frecuencias de pares de nucleótidos, transversiones, transiciones y relación transición/transversión (R) para la región ITS y para los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>.</i>	63

Tabla 12 <i>Dinucleótidos y su frecuencia en secuencias de la región ITS y de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>.</i>	63
Tabla 13 <i>Estimadores de diversidad genética intra e interpoblacional de la región ITS y de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> (región COX) de <i>Pythium irregulare</i> s.l. aislado de crisantemos y dalias.</i>	65
Tabla 14 <i>Estimadores de diversidad genética intra e interpoblacional de la región ITS y de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> (región COX) de las especies pertenecientes al complejo <i>Pythium irregulare</i>.</i>	66

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo del ciclo reproductivo sexual y asexual del género <i>Pythium</i> en el desarrollo del ahogamiento y pudrición de raíz/semillas.....	7
Figura 2. Estructura de la región ITS.....	15
Figura 3. Estructura de la región COX (genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>) y localización de los cebadores más utilizados para su amplificación.....	16
Figura 4. Marcador de peso molecular tipo escalera de 100 pares de bases, se indica el tamaño y concentración de cada banda.....	40
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: A002; 3: A003; 4: A004; 5: A005; 6: A006; 7: A007; 8: B001; 9: B002; 10: B003; 11: B004; 12: Control negativo.	40
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	41
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	41
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	41
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	42
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	42
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	42
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	43
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	43
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS. ...	43
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i>	44

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> .	45
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> .	45
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> .	45
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> .	46
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> .	46
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> .	46
Figura 22. Interfaz del programa CodonCode Aligner.	48
Figura 23. Interfaz del programa CodonCode Aligner.	50
Figura 24. Interfaz del software MEGA7 que muestra el alineamiento múltiple de la región ITS (residuo 245-331) resultante tras la aplicación del algoritmo ClustalW.	53
Figura 25. Árbol filogenético del género <i>Pythium</i> generado con base en secuencias de la región ITS mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY +G +I) y empleando como grupo externo a <i>Saprolegnia parasitica</i> . El soporte bootstrap se muestra en la parte superior de los nodos y en la parte inferior se indica la probabilidad posterior.	55
Figura 26. Interfaz del software MEGA7 que muestra el alineamiento múltiple de los genes <i>cox I</i> y <i>cox II</i> (residuo 375-462) resultante tras la aplicación del algoritmo ClustalW.	57

- Figura 27.** Árbol filogenético de *Pythium irregulare* s.l. generado a partir de secuencias de los genes *cox I* y *cox II* por medio del método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura 3-parámetros (T92) y empleando como grupo externo a *Pythium aphanidermatum*. El soporte bootstrap se muestra en la parte superior de los nodos y en la parte inferior se indica la probabilidad posterior.59
- Figura 28.** Árbol filogenético de *Pythium irregulare* s.l. generado a partir de la concatenación de las secuencias de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II* por medio de inferencia Bayesiana. Se empleó como grupo externo a *Pythium aphanidermatum*. El soporte bootstrap se muestra en la parte superior de los nodos y en la parte inferior se indica la probabilidad posterior.61

RESUMEN

Pythium spp., uno de los principales fitopatógenos a nivel mundial, afecta cultivos ornamentales y alimenticios. En Estados Unidos la producción de crisantemos y dalias se encuentra en crecimiento, sin embargo, son cultivos susceptibles a enfermedades y plagas. La identificación de *Pythium* spp. se realiza mediante morfología, no obstante, durante las últimas décadas se han empleado técnicas moleculares como la secuenciación, que además de identificar al organismo proporcionan información filogenética y de estructura poblacional. Durante el presente proyecto se secuenció la región ITS y la región COX de 116 aislados de *Pythium* procedentes de crisantemos y dalias, de tres invernaderos de Long Island – Nueva York, identificándose diez especies. Las especies más comunes fueron las que conforman *P. irregulare* sensu lato (s.l.) (74.14%) y *P. aphanidermatum* (9.48%). Dentro de *P. irregulare* s.l., la especie con mayor prevalencia fue *P. cryptoirregulare* (41.86%). Se observó una mayor diversidad de especies de *Pythium* en crisantemos que en dalias, debido al manejo en su cultivo. La reconstrucción filogenética de *Pythium* spp. se realizó mediante el método de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, formándose grupos monofiléticos con soporte *bootstrap* y probabilidad posterior elevadas. La topología en cada árbol (análisis por región y concatenado) mostró una clara separación entre las especies de *Pythium* y fue congruente con la morfología de los esporangios. Finalmente, el análisis de diversidad genética de *P. irregulare* s.l. mostró una estructura poblacional alta con posibilidad de flujo génico entre cultivos; sin embargo, el flujo génico entre cada especie de *P. irregulare* s.l. fue nula.

PALABRAS CLAVE:

- *Pythium irregulare* s.l.
- ESTRUCTURA POBLACIONAL
- FLUJO GENÉTICO
- FILOGENÉTICA

ABSTRACT

Pythium spp., one of the most important phytopathogens worldwide, affects ornamental and food crops. In the United States, the production of chrysanthemum and dahlia is growing, however, they are susceptible to diseases and pests. The identification of *Pythium* spp. is made by morphological characteristics; nevertheless, during the last decade molecular techniques such as sequencing, have been used for the identification of the organism and to provide information on their phylogenetic relationship and population structure. During this project the ITS region and the COX region of 116 isolates from chrysanthemum and dahlias of three greenhouses of Long Island – New York were sequenced, identifying 10 species. The most common species were the ones that belong to *P. irregulare* s.l. (74.14%) and *P. aphanidermatum* (9.48%). Within *P. irregulare* s.l., the specie with the highest prevalence was *P. cryptoirregulare* (41.86%). A greater diversity of *Pythium* species was observed in chrysanthemums than in dahlias, due to the management in their cultivation. The phylogenetic reconstruction of *Pythium* spp. was carried out using maximum likelihood and Bayesian inference, forming monophyletic groups with high bootstrap support and posterior probability. The topology in each tree (analysis by region and concatenated) showed a clear separation between *Pythium* species and was consistent with the morphology of the sporangium. Finally, the genetic diversity analysis of the *P. irregulare* complex showed a high population structure with possibility of gene flow between crops; however, the gene flow between each species of *P. irregulare* s.l. was almost null.

Keywords:

- *Pythium irregulare* s.l.
- POPULATION STRUCTURE
- GENE FLOW
- PHYLOGENETICS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Los oomicetos o también conocidos como mohos de agua, debido a su preferencia por ambientes altamente húmedos, son un grupo importante de fitopatógenos eucariontes considerado uno de los más exitosos por su distribución global y facilidad de transporte (Thines, 2014; Derevnina et al., 2016).

Pythium es un género de oomicetos saprófitos que habita en el suelo e infecta a una gran variedad de huéspedes. Es el agente causal más común de la podredumbre de semillas y raíces, lesiones de tallo, podredumbre de tubérculos y frutos en contacto con el suelo y además desencadena el mal de almaciguera (*damping-off*) pre y post emergencia de plantas (Agrios, 2005).

La identificación de las especies de *Pythium* tradicionalmente se realiza con base en características morfológicas; sin embargo, es complicada debido a la semejanza morfológica y variaciones intraespecíficas entre aislados individuales (Villa, Kageyama, Asano, & Suga, 2006). En los últimos años se ha optado por emplear herramientas moleculares para facilitar la identificación y caracterización de especies morfológicamente similares (Garzón, Geiser, & Moorman, 2005).

En Estados Unidos, la producción de plantas ornamentales se encuentra en constante crecimiento y al igual que cualquier otro tipo de cultivo se ve afectado por diversas enfermedades. Sin embargo, el impacto de una enfermedad sobre un cultivo ornamental es incalculable dado que su facilidad de comercialización y precio es directamente proporcional al atractivo de sus flores, tallos y hojas (Daughtrey & Benson, 2005). Por lo cual, este tipo de industria es rentable

únicamente si presenta un plan de manejo adecuado (Del Castillo-Munera, 2015) y para poder establecerlo es necesario identificar correctamente al agente causal de la enfermedad (Garzón et al., 2005).

1.2 Justificación del problema

Los oomicetos representan un grupo relevante de fitopatógenos que ocasionan millonarias pérdidas económicas anualmente mermando la calidad de los cultivos y por ende reduciendo su producción (Meng, Torto-Alalibo, Chibucos, Tyler, & Dean, 2009).

Las especies pertenecientes al género *Pythium* establecen infecciones rápidas devastadoras en cultivos alimenticios y ornamentales, plantas silvestres y bosques; impactando negativamente la economía de los productores y ocasionando daño en el ecosistema (Derevnina et al., 2016).

Durante las últimas décadas, la importancia económica del cultivo de plantas ornamentales se ha incrementado rápidamente y con ello su comercialización internacional (Lawson, 1996; Elsadek, 2018). El mercado de flores y plantas ornamentales tiene un valor estimado de más de 15 mil millones de dólares, lo que denota la importancia de este sector económico (Jiménez, 2015).

En Estados Unidos el mercado de plantas ornamentales y flores fue valorado en aproximadamente cuatro mil millones de dólares y se calculan más de 6 000 productores, de los cuales 2 600 reportan ventas anuales de más de cien mil dólares. En 2016, Estados Unidos fue el tercer importador de plantas ornamentales del mundo, con un gasto de importación de \$2 160 millones de dólares (Bogash, Ford, Kime, & Harper, 2012; USDA, 2016; Pizano, 2017).

El crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), conocido también como la “Reina de las Flores de Otoño”, es una de las plantas ornamentales más populares en Estados Unidos debido a la diversidad

de colores, formas y facilidad de cultivo. Es ampliamente utilizada en arreglos florares especialmente durante los meses de septiembre y diciembre, comandando el mercado. Es la planta de maceta más cultivada en Estados Unidos y la más comercializada ya que es empleada en adornos florares durante las festividades de Acción de Gracias y Navidad (Smith, 2013; National Chrysanthemum Society, 2015). En 2016, el 99% del crisantemo importado hacia Estados Unidos provino de Colombia y representó cerca de doscientos millones de dólares (Pizano, 2017).

La dalia (*Dahlia* sp.), es una planta ornamental nativa de México introducida a los Estados Unidos por primera vez en 1914. Su cultivo es considerado uno de los más importantes debido a la variedad de colores, formas y tamaños de su flor; adicionalmente presenta un manejo relativamente sencillo y floración constante (Pappu, Wyatt, & Druffel, 2005; Ohno, Hosokawa, Hoshino, Kitamura, & Morita, 2011; Jiménez, 2015; Khuriwal, Kumar, Pandey, Kasera, & Singh, 2018). La dalia es empleada en exhibiciones, concursos y arreglos florales por todo Estados Unidos e involucra a múltiples productores, vendedores, jardineros e incluso centros de investigación; por lo cual, su comercio se avalúa en millones de dólares (Pappu et al., 2005; Khuriwal et al., 2018). Al igual que otras plantas florales, su flor tiene un tiempo de vida post-cosecha corto, dificultando su importación e impulsando la producción local para cubrir la elevada demanda (Bogash et al., 2012; Elsadek, 2018).

Las especies de *Pythium* infectan a una amplia variedad de plantas ornamentales reduciendo su vigor y dificultando su comercialización. Son letales únicamente en estadios tempranos, donde ocasionan la pudrición de semillas, raíces y tallos; y el marchitamiento general de la plántula (Del Castillo-Munera, 2015). Una correcta identificación de las especies del género *Pythium* es

necesaria para el establecimiento de medidas de control y estudios epidemiológicos (Garzón et al., 2005).

Tradicionalmente, la identificación de las especies de *Pythium* se realiza por medio de morfología y fisiología; sin embargo, con el desarrollo de herramientas moleculares se ha logrado obtener un mejor panorama de la filogenética y relación entre individuos. Para ello, se emplean varios tipos de marcadores moleculares (Crawford, Bassam, Drenth, Maclean, & Irwin, 1996), como por ejemplo la región ITS (espaciador transcrito interno) del ADN ribosomal, utilizada ampliamente en estudios filogenéticos del género *Pythium* por su rápida evolución, disponibilidad de primers y secuencias de referencia en bases de datos (Matsumoto, Kogeyama, Suga, & Hyakumachi, 1999; White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).

Según Shen, Geiser, & Royse (2015), analizar un solo gen no representa la evolución del genoma completo de una especie, por lo cual se opta por estudiar genes codificadores de proteínas metabólicas o estructurales, como por ejemplo la enzima citocromo c oxidasa (*cox I* y *coxII*). Para el análisis filogenético de oomicetos, los genes mitocondriales presentan ventajas sobre los genes nucleares, debido a su alta variabilidad interespecífica, recombinación nula, elevado número de copias en la célula y genoma haploide (Bruns, White, & Taylor, 1991; Martin, 2000).

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad genética del género *Pythium* asociado a enfermedades de raíz de crisantemos (*Chrysanthemum* sp.) y dalias (*Dahlia* sp.) mediante secuenciación de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar las especies de *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos (*Chrysanthemum* sp.) y dalias (*Dahlia* sp.) mediante secuenciación de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*.
- Reconstruir la filogenia de las especies de *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos y dalias.
- Analizar la diversidad genética de la población de *Pythium* predominante en cultivos de crisantemos y dalias por medio de análisis bioinformáticos y estadísticos.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Género *Pythium*

1.4.1.1 Generalidades

El género *Pythium* es un género de oomicetos cosmopolita con más de 150 especies (Proaño, Koch, Romero, & Garzon, 2014), es un representante de la familia Pythiaceae, orden Peronosporales, clase Oomycetes, phylum Oomycota y reino Chromista (Nzungize et al., 2011). Los oomicetos pertenecían al reino Fungi, sin embargo, por medio del avance en técnicas genéticas se concluyó que sus semejanzas eran superficiales debidas a un proceso de evolución convergente y transferencia horizontal de genes (Andersson, 2006).

Pythium es uno de los fitopatógenos más comunes e importantes ya que tiene la facilidad de infectar rápidamente una gran diversidad de plantas ocasionando pérdidas en cultivos de múltiples ecosistemas (Agrios, 2005). La mayoría de especies de *Pythium* son saprófitas cuando se encuentran en el suelo, agua y restos vegetales; no obstante, cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés pueden volverse patógenas (Long et al., 2012).

El micelio de *Pythium* es hialino y continuo cuando se encuentra en sus etapas iniciales de desarrollo, sin embargo, al envejecer se forman falsos tabiques. Sus hifas son muy delgadas (diámetro menor que 8 μm) y altamente ramificadas en panículas (Gilman, 1963; Saralosa & Rocca, 1975). Los zoosporangios son filamentosos y tienen forma esférica o de limón; al alcanzar la madurez ocurre la reproducción asexual formándose zoosporas (Gilman, 1963; Walker, 1965).

Las zoosporas (esporas asexuales móviles) son estructuras reproductivas temporales que presentan dos flagelos laterales con movimiento uniforme, su germinación ocurre luego de un proceso de enquistamiento en la superficie del hospedero y la infección se da gracias a un tubo germinativo (Saralosa & Rocca, 1975). Las zoosporas son las responsables de dispersar al patógeno en agua e infectar plantas saludables adyacentes. Se conoce que el micelio albergado en restos vegetales o en el suelo representa una fuente de generación de zoosporas (Agrios, 2005).

Las especies de *Pythium* también presentan reproducción sexual en la cual interviene el oogonio y el anteridio (estructuras sexuales). Se ha determinado que la mayoría de las especies son homotálicas (autofertilización) (Agrios, 2005; Nzungize et al., 2011) y tan solo siete se han reportado como heterotálicas (van der Plaats-Niterink, 1981). El proceso consiste en la fijación y penetración del anteridio al oogonio a través de un tubo de fertilización, por el cual se transfiere el núcleo del anteridio al interior del oogonio. Ambas estructuras haploides se fusionan y forman un cigoto u oospora diploide, la misma que se mantiene en estado de latencia hasta su germinación. La oospora es una estructura resistente debido a su pared celular gruesa, lo que le permite sobrevivir en condiciones extremas y mantenerse viable por un largo periodo de tiempo (Agrios, 2005; Garzón et al., 2005; Nzungize et al., 2011; Proaño et al., 2014). En la Figura 1, se detallan ambos tipos de reproducción del género *Pythium*.

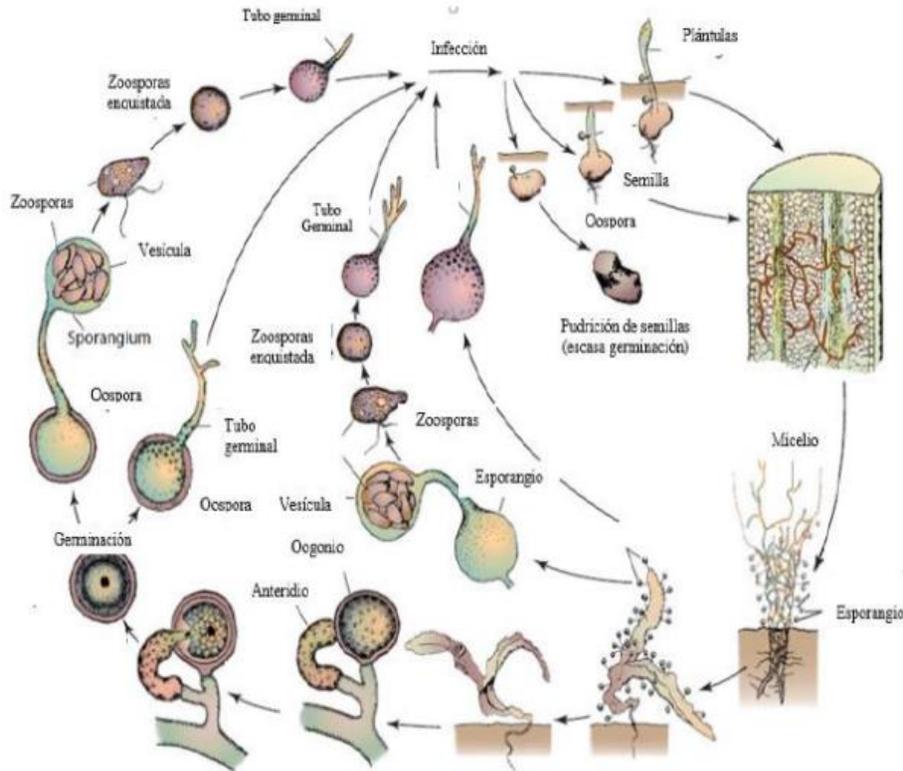


Figura 1. Ejemplo del ciclo reproductivo sexual y asexual del género *Pythium* en el desarrollo del ahogamiento y pudrición de raíz/semillas.

Fuente: Agrios (2005).

1.4.1.2 Sintomatología

El género *Pythium* alberga especies que se distribuyen entre múltiples nichos ecológicos ocasionando enfermedades y disminuyendo rendimientos y calidad en cultivos de todo tipo (Martin & Loper, 1999). Producen la muerte de semillas y plántulas en pre y post emergencia (*damping-off*) porque afectan al embrión, hipocótilo y radícula. Se ha observado en herbáceas y plantas adultas la disminución del crecimiento, debido a deficiencia de nutrientes y reducción de la biomasa radicular al destruir los pelos radicales y raíces de absorción (Schroeder, Martin, W.A.M De Cock, Okubara, & Paulitz, 2013).

La sintomatología es similar entre plantas infectadas e incluye marchitez, atrofia, clorosis, decaimiento de raíces así como bajas germinación y emergencia de semillas (Proaño, 2014); sin embargo, existen diferencias en los síntomas de acuerdo al estadio de la planta al ser infectada. Si ocurre a nivel de semilla, no germina, presenta un color café, se vuelve suave, frágil y al final se desintegra. En plántulas jóvenes, el patógeno se dispersa rápidamente ocasionando el colapso celular y la planta muere. Finalmente, en plantas maduras el patógeno ataca las raíces y el tallo a nivel del suelo. Las zonas infectadas se tornan húmedas, pierden su color habitual y su fortaleza; ocasionando su desplome en el suelo contaminado y la dispersión del patógeno al resto de la planta (Agrios, 2005; Schroeder et al., 2013).

1.4.1.3 Infección

Las zoosporas y los zoosporangios son considerados el inóculo primario y el tipo de germinación depende de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura. Temperaturas superiores a los 18°C favorecen la germinación mediante tubos germinativos; mientras que entre los 10 y 18 °C ocurre por medio de zoosporas. El proceso de infección empieza con el enquistamiento y adhesión de las zoosporas, la secreción de enzimas hidrolíticas degradadoras de pectina (específicas para cada especie de *Pythium*) y la pérdida de adhesión de las células de la raíz facilitando el ingreso de *Pythium* al interior del tejido, con decoloración en las raíces o necrosis en plantas estresadas (Boudjeko et al., 2006; Champion, Massiot, & Rouxel, 1997). La infección y el desarrollo de *Pythium* mediante la propagación de zoosporas ocurre con mayor facilidad debido al drenaje deficiente del suelo, elevado contenido de arcilla, baja ventilación entre las plantas, alta humedad y presencia de agua libre (Palmucci, 2015).

La resistencia de las estructuras reproductivas de las especies de *Pythium* les permite movilizarse entre invernaderos a través de material vegetal infectado o por medio de herramientas de jardinería, lo cual ocasiona una amplia diseminación incluso a locaciones donde no se ha reportado infecciones con este fitopatógeno en el pasado (Agrios, 2005).

1.4.1.4 Impacto en la floricultura

En Estados Unidos, la floricultura es el sector agrícola con más rápido crecimiento, posicionándolo como uno de los principales productores de flores y plantas de vivero a nivel mundial, generando cerca de \$4.37 billones en 2015 (USDA, 2016; Pizano, 2017). Conjuntamente con la expansión de esta actividad comercial se ha observado el aumento de enfermedades asociadas a la podredumbre de raíz y semillas, así como marchitamiento de plántulas pre y post emergencia (Agrios, 2005).

Las especies pertenecientes al género *Pythium* se encuentran como patógenos en invernaderos y en la mayoría de suelos cultivados debido al riego con agua contaminada y por la introducción de material vegetal infectado, generando grandes pérdidas económicas y productivas (Proaño et al., 2014). Múltiples estudios previos en invernaderos dedicados a la producción de flores han encontrado a *Pythium irregulare*, *P. aphanidermatum* y especies de *Pythium* del grupo F como las especies con mayor prevalencia (Martin, 2000; Lévesque & W.A.M De Cock, 2004; Proaño, 2014); siendo el complejo *Pythium irregulare* el predominante (Garzón et al., 2005).

1.4.1.5 Control

Debido a las grandes pérdidas generadas por el género *Pythium* en varios cultivos, es necesario aplicar medidas de control específicas para cada patología. Desde el punto de vista epidemiológico, se pretende reducir el inóculo inicial y la tasa epidémica (Agrios, 2005; Fry, 1982);

para ello se debe eliminar tanto el inóculo como sus fuentes: suelos contaminados, semillas u órganos infectados, agua de riego contaminada con zoosporas y desinfectar instrumentos previamente usados (macetas, bandejas, tijeras de podar, entre otros). Como métodos de control se han tratado de implementar medidas culturales (destrucción de material vegetal anterior, rotación de cultivos), físicas (solarización), biológicas (organismos antagonistas) y genéticas (plantas resistentes o tolerantes) (Fry, 1982; Stanghellini, Stowell, & Bates, 1984; Agrios, 2005).

Control químico

El uso de productos químicos es la técnica más utilizada para contrarrestar las enfermedades generadas por fitopatógenos. Específicamente para oomicetos se emplean el metalaxil (más eficaz en el control de diferentes especies de *Pythium*), furalaxil, propamocarb, entre otros. Para lograr éxito en el control de las enfermedades es imperativo establecer un plan de aplicación teniendo en cuenta la alternancia de productos con base en su mecanismo de acción (Davidse, Looijen, Turkensteen, & van der Wal, 1981; Erwin & Ribeiro, 1996).

Sin embargo, el uso prolongado de fungicidas genera resistencia por parte de los patógenos hacia los principios activos del producto, lo cual conlleva a un incremento en la dosis o en la frecuencia de aplicación y con ello se aumenta el costo de producción (Agrios, 2005; Erwin & Ribeiro, 1996).

Control biológico

Debido a los efectos secundarios producidos por el uso continuo de fungicidas químicos, varias investigaciones se han enfocado en encontrar controladores biológicos eficaces para especies fitopatógenas de *Pythium* (van der Plaats-Niterink, 1981). Uno de ellos es *Pythium oligandrum*, un

oomiceto micoparásito que se encuentra presente en todo tipo de suelos y ejerce antagonismo frente a especies de *Pythium* patógenas, Ascomicetes, Basidiomicetes y Oomicetos patógenos; adicionalmente se ha observado un control eficaz frente a *Ralstonia solanacearum*. La acción biocontroladora de este micoparásito se basa en la competencia por espacio y nutrientes, parasitismo antibiosis, producción de precursores de auxinas que estimulan el crecimiento de la planta y activación el sistema inmune del hospedero (Ribeiro & Butler, 1992; Martin & Loper, 1999; C. A. Lévesque, 2011; Palmucci, 2015). Además, se han descrito otras especies con elevada actividad micoparásita como: *Pythium nunn* (antagonista de *P. ultimum*) (Lifshitz, Elad, & Baker, 1984), *P. periplocum* y *P. acanthicum* (Elad, Lifshitz, & Baker, 1985; Ribeiro & Butler, 1995).

1.4.2 Identificación morfológica

Durante las pasadas décadas, la identificación de las especies de *Pythium* se realizó mediante criterios fenotípicos basados en la morfología de las estructuras reproductivas del aislado y en el crecimiento dependiente del medio de cultivo empleado (Kageyama, Nakashima, Kajihara, Suga, & Nelson, 2005). Es una técnica sencilla, lenta y tediosa que consiste en la observación macroscópica y microscópica de las estructuras del microorganismo (Proaño et al., 2014). Sin embargo, debido a que las especies del género *Pythium* presentan características morfológicas variables y la precisión de la identificación se basa únicamente en la experiencia del técnico encargado, se concluye que esta técnica es deficiente y genera una identificación errónea de especies diferentes con morfologías similares (Al-Sa'di, Drenth, Deadman, W.A.M De Cock, & Aitken, 2007).

1.4.3 Identificación molecular

Con los continuos avances en las técnicas moleculares y de secuenciación, la taxonomía de los oomicetos (incluido el género *Pythium*) y las relaciones entre ellos han evolucionado. Actualmente, las investigaciones buscan establecer una clasificación con base en criterios filogenéticos para lograr identificar los organismos responsables de enfermedades en un cultivo específico entendiendo de mejor manera la epidemiología de la enfermedad y así establecer un tratamiento o plan de manejo adecuado (Mccartney, Foster, Fraaije, & Ward, 2003; Garzón et al., 2005).

Una de las regiones más utilizadas para la identificación molecular de oomicetos es la región ITS conformada por ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal (ADNr). De manera particular, por medio del análisis de ésta región se ha logrado identificar y clasificar distintas especies de *Pythium* (Matsumoto et al., 1999; Garzón et al., 2005; Proaño, 2014). Sin embargo, el estudio de un solo gen no permite establecer comparaciones entre miembros de un mismo género, por lo cual se ha incorporado el análisis de los genes *coxII* y *coxI* (citocromo oxidasa mitocondrial II y I), incluyendo el espaciador intergénico *coxII-coxI*; y el gen de la β -tubulina (Villa et al., 2006).

Se han descrito múltiples protocolos o metodologías que complementan los enfoques tradicionales y morfológicos, siendo aquellos que dependen de las variaciones en las secuencias de ADN las preferidas debido a su rapidez, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Narayanasamy, 2011).

1.4.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada la técnica más empleada para la detección de fitopatógenos debido a su precisión, reproductibilidad, flexibilidad, rapidez,

confiabilidad y automatización. La PCR amplifica un fragmento de ADN específico por medio de ciclos de desnaturalización, alineación y elongación a diferentes temperaturas, empleando cebadores (*primers*), nucleótidos (dNTPs) y la enzima *Taq* polimerasa. Los fragmentos amplificados son visualizados por medio de una corrida electroforética en geles de agarosa teñidos con un químico intercalado en el ADN y mediante la formación de bandas de diferente tamaño se concluye la presencia o ausencia del patógeno en la muestra estudiada (Capote, Pastrana, Torres, & Aguado, 2012; Ramsden, 2009).

1.4.3.2 Secuenciación

La secuenciación es una técnica que complementa la PCR, consiste en determinar el orden en el cual los nucleótidos se colocan en un fragmento de ADN. Durante los últimos años, se ha observado un aumento de secuencias de oomicetos en las diferentes bases de datos ya que se ha incrementado la facilidad de secuenciación y se han reducido sus costos. Las múltiples secuencias de los genes estudiados han servido para la identificación de patógenos mediante métodos bioinformáticos, convirtiendo a esta técnica en una estrategia rápida y confiable para estudios filogenéticos; sin embargo, depende de la calidad de las secuencias obtenidas y de las existentes en las bases de datos (Capote et al., 2012). Adicionalmente, se considera riesgosa debido a la posibilidad de que existan secuencias erróneas, incompletas y mal identificadas (McCartney et al., 2003).

Análisis y ensamblaje de secuencias

El orden de los nucleótidos de un genoma, cromosoma o un producto de PCR es determinado a partir del ensamblaje de los fragmentos generados en el proceso de secuenciación. El ensamblaje consiste en la limpieza de secuencias y alineamiento (Proaño et al., 2014). En primer

lugar, la limpieza se realiza eliminando fragmentos con baja calidad de lectura, bases correspondientes a cebadores, vectores o adaptadores y nucleótidos altamente repetidas; estas porciones de secuencia interfieren con el alineamiento (Cañizares & Blanca, 2013).

Una vez editadas y revisadas las secuencias se procede a su alineamiento, el cual consiste en comparar dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos, y solapar las regiones idénticas entre ellas. Por medio de este procedimiento se logra la identificación de regiones conservadas y se obtienen secuencias consenso o *contigs* de cada grupo de secuencias idénticas (Dutillh & Kesmir, 2017).

1.4.3.3 Identificación aplicando secuenciación de ADN

La identificación de especies o el diagnóstico de enfermedades en plantas basado en información obtenida a partir del ADN, es una técnica rápida y sencilla que genera resultados confiables siempre y cuando se disponga de una base de datos completa y depurada (Abad & Coffey, 2008; Ristaino, Haeger, & Hu, 2008).

Por lo general, se trabaja con regiones del genoma con suficiente variabilidad interespecífica que permitan la identificación de un aislado a nivel de especie o género. Para oomicetos, las regiones más empleadas son: el espaciador transcrito interno del ADNr (ITS 1 e ITS 2) y los genes que codifican para la enzima citocromo oxidasa mitocondrial (COX 1 y COX 2), la β -tubulina y el factor de elongación 1-alfa (TEF1- α) (White et al., 1990; Bruns et al., 1991; Liew, MacLean, & Irwin, 1998; Garzón et al., 2005; Robideau et al., 2011; Capote et al., 2012).

Región ITS

El ADNr nuclear se conforma por tres genes: el gen de la subunidad menor, el gen de la subunidad mayor y el gen 5.8S; los mismos que se encuentran separados por medio de ITS 1 e ITS 2 (McCartney et al., 2003). La región ITS (Figura 2) es la más utilizada para el diagnóstico, identificación y filogenia de múltiples especies; ya que presenta un elevado número de copias en todos los organismos, una alta variabilidad interespecífica y es conservada dentro de cada especie (Bruns et al., 1991; Xu, 2006).

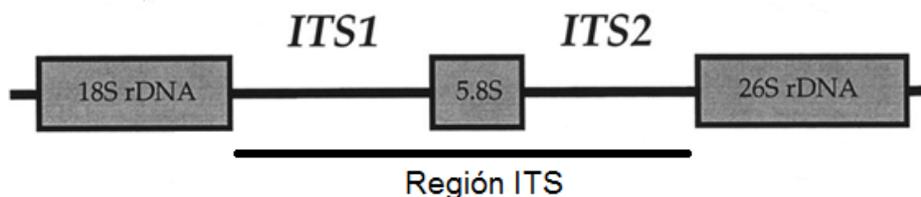


Figura 2. Estructura de la región ITS.

Fuente: Modificado de McDaniel, Werner, & Espín (2002).

El espaciador transcrito interno (ITS) ha sido utilizado en estudios filogenéticos de oomicetos debido a su facilidad de amplificación con cebadores universales (Bala, Robideau, Desaulniers, W.A.M De Cock, & Lévesque, 2010). Esta región contiene sitios conservados útiles para el diseño de cebadores y a su vez zonas variables que favorecen la discriminación de un aislado en varios niveles taxonómicos (Capote et al., 2012).

La región ITS ha sido ampliamente empleada en estudios filogenéticos de los géneros *Phytophthora* y *Pythium*, sin embargo, en ciertas ocasiones su análisis es complicado. Al ser una región no codificante, el alineamiento múltiple de sus secuencias contiene inserciones y deleciones acumuladas que dificultan la comparación entre secuencias. Además, la región ITS pierde utilidad cuando se trata de diferenciar o separar especies evolutivamente cercanas, ya que las diferencias

existentes entre ellas suelen ser mínimas o nulas (White et al., 1990; Martin, 2000; Garzón et al., 2005; Robideau et al., 2011; Capote et al., 2012).

Genes citocromo c oxidasa I y II (*cox I* y *cox II*)

La enzima citocromo c oxidasa forma parte de la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial y es la encargada de aceptar los electrones del citocromo c y transferirlos al oxígeno para la formación de agua. Esta enzima se forma por tres subunidades principales (COX I, COX II y COX III), codificadas por genes mitocondriales del mismo nombre (*cox I*, *cox II* y *cox III*) (Kadenbach, Huttermann, Arnold, Lee, & Bender, 2000; Lodish et al., 2002; Millar, Eubel, Jansch, Kruft, & Braun, 2004).

Los genes *cox I* y *cox II* (Figura 3), referidos como región COX en el presente proyecto, son considerados *barcodes* de oomicetos aprobados por GenBank y por el Consorcio de Barcodes de la Vida (CBOL); y han sido utilizados como marcadores filogenéticos para el estudio de los géneros *Pythium*, *Phytophthora* y *Pseudoperonospora* (Hudspeth, Nadler, & Hudspeth, 2000; Martin, 2000; Cook, Hudspeth, & Hudspeth, 2001; W.A.M De Cock & Lévesque, 2004; Thines, 2014; Villa et al., 2006; Robideau et al., 2011). La amplificación del gen *cox I* es variable y por ello el gen *cox II* es el más usado en estudios de genética poblacional y para la identificación molecular a nivel de especie o complejo (Choi et al., 2015).

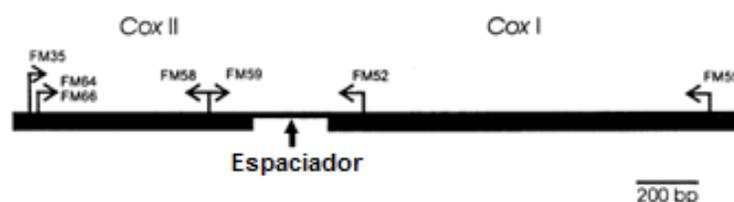


Figura 3. Estructura de la región COX (genes *cox I* y *cox II*) y localización de los cebadores más utilizados para su amplificación.

Fuente: Martin (2000).

La región COX al ser codificante permite obtener un alineamiento sencillo sin un gran número de inserciones o deleciones, obteniéndose una mayor resolución y soporte en comparación a la región ITS. Sin embargo, en estudios filogenéticos se ha concluido que ambas regiones se complementan (McCartney et al., 2003; Robideau et al., 2011).

1.4.4 Análisis filogenético

La filogenia es una rama de la biología que se encarga de estudiar las relaciones evolutivas entre organismos. Estos estudios se han basado tradicionalmente en características morfológicas y fisiológicas; sin embargo, en las últimas décadas las secuencias de genes o proteínas se han convertido en el pilar de los análisis filogenéticos (Lio & Goldman, 1998).

El análisis filogenético a partir de secuencias de nucleótidos o aminoácidos es una herramienta importante para el estudio de la historia evolutiva de uno o más organismos. La técnica se desarrolló en paralelo con la secuenciación, ya que a partir de ésta se pueden entender las relaciones evolutivas a cualquier nivel taxonómico (Wilson, Carlson, & White, 1997; Masatoshi & Sudhir, 2000).

Para la visualización de las relaciones filogenéticas se emplean diagramas en forma de árboles, formados por raíces, ramas, nodos y hojas; siendo los nodos externos las unidades taxonómicas operacionales (OTU) y los nodos internos o ancestros hipotéticos de los OTU se denominan unidades taxonómicas hipotéticas (HTU). A partir de los gráficos se pueden observar ramas que comparten un mismo ancestro en común (monofiléticos) o aquellas que no provienen de un único ancestro en común (parafilético). Finalmente, aquellas ramas sin un ancestro en común se denominan polifiléticas y la distribución del árbol en general se denomina topología (Contreras, Cuevas, Goyenechea, & Iturbe, 2007; Lemey, Salemi, & Vandamme, 2009).

La reconstrucción de árboles filogenéticos se realiza por medio de métodos estadísticos con base en distancias genéticas o a partir de caracteres (Lio & Goldman, 1998).

1.4.4.1 Reconstrucción filogenética basada en distancias

Los métodos basados en distancias o en matrices de distancias se emplean cuando se desea obtener una clasificación jerárquica de un set de secuencias. Se fundamentan en el cálculo de distancias evolutivas para todos los pares de taxones y el árbol filogenético es construido a través de la relación existente entre esas distancias; los métodos más utilizados son el UPGMA y el Neighbor-Joining. Este tipo de metodología es rápida y requiere poco poder computacional, lo cual facilita el análisis de secuencias extensas en cortos periodos de tiempo (Masatoshi & Sudhir, 2000; Lemey et al., 2009; Cañizares & Blanca, 2013).

1.4.4.2 Reconstrucción filogenética basada en caracteres

La reconstrucción filogenética a partir de caracteres proporciona resultados más robustos ya que emplea toda la información evolutiva conocida, determinando las relaciones ancestrales más probables con base en las sustituciones individuales entre secuencias. Los métodos más utilizados son el de máxima verosimilitud y el de inferencia bayesiana (Lio & Goldman, 1998; Lemey et al., 2009).

Método de máxima verosimilitud

El concepto de verosimilitud en las ciencias naturales hace referencia a la obtención de una explicación sobre un set de datos específico, teniendo como base un modelo particular y una hipótesis previa. En el campo filogenético trata de encontrar la probabilidad de observar un alineamiento específico a partir de un modelo de sustitución y un árbol. En este caso, el parámetro

considerado no es la topología en sí, sino la distancia de cada rama en cada árbol construido (Masatoshi & Sudhir, 2000; Lemey et al., 2009).

La confiabilidad de los nodos de un árbol construido a partir del método de máxima verosimilitud se estima mediante un proceso denominado *bootstrap*. Es una metodología estadística que a través de generaciones repetidas crea un alineamiento artificial manteniendo los parámetros del original y a su vez construye un árbol para cada alineamiento nuevo. Finalmente, todos los árboles generados forman un árbol consenso en donde cada rama tiene un valor de soporte equivalente al número de veces que una rama apareció en un árbol. De forma general, un valor de *bootstrap* superior al 70% es considerado aceptable (Svennblad, Erixon, Oxelman, & Britton, 2006; Lemey et al., 2009).

Método de inferencia bayesiana

El método de inferencia bayesiana a diferencia de otros métodos como el de máxima verosimilitud, trata de encontrar el árbol con la mejor probabilidad posterior que se ajuste a las secuencias o datos proporcionados. Tanto la topología como la longitud de las ramas son consideradas variables aleatorias y no parámetros. La confiabilidad del árbol se obtiene a partir del cálculo de la probabilidad posterior, la cual es proporcional al producto de la probabilidad anterior por la verosimilitud. El valor de la probabilidad posterior no puede ser calculado de manera analítica y por ello se aplica el método numérico conocido como Modelo de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC) (Masatoshi & Sudhir, 2000; Lemey et al., 2009).

En el MCMC, las cadenas exploran la superficie de la probabilidad posterior por medio de la integración de los parámetros establecidos en el modelo seleccionado. Los árboles se muestrean

cada cierto intervalo y la probabilidad de ese árbol se estima por medio de la proporción de tiempo que las cadenas lo visitaron (Douady, Boucher, Doolittle, & Douzery, 2003).

1.4.5 Análisis de diversidad genética

El análisis de diversidad genética permite describir variaciones intra e interpoblacionales con el fin de establecer relaciones entre individuos, poblaciones o regiones. En vista de que los cambios o procesos históricos dejan marcas en la estructura genética de una población, el entendimiento de la diversidad genética favorece la comprensión de procesos evolutivos (Cornell University, 2003; Feng, Wang, & Gong, 2014).

La diversidad genética es un pilar para el desarrollo de la genética poblacional y se fundamenta en la riqueza (número de haplotipos, genotipos y/o alelos) e igualdad (frecuencia). Con el avance de la tecnología, metodologías analíticas y técnicas de secuenciación; el uso de secuencias de nucleótidos ha facilitado obtener información de la historia evolutiva y demográfica de una población o región (Nei, 1973; Hudson, Slatkint, & Maddison, 1992; Lemey et al., 2009).

Los estimadores de variabilidad intrapoblacional más utilizados son: el número o diversidad de haplotipos (probabilidad de que dos secuencias muestreadas al azar sean diferentes), la diversidad de nucleótidos (probabilidad de que un sitio difiera entre dos secuencias aleatorias) y el número de sitios segregantes (número de sitios en donde los nucleótidos son diferentes entre secuencias). Para la estimación de la variabilidad interpoblacional se suele comparar los parámetros calculados de cada población por medio de un estadístico de referencia, por ejemplo, el estadístico chi-cuadrado (Nei, 1973; Xu, 2006; Milgroom, 2015).

En función de la diversidad genética intra e interpoblacional se puede inferir la estructura de una población y para ello se ocupan índices de fijación o coeficientes de hibridación. Estos índices miden la reducción de la heterocigocidad en una población y mientras mayores sean sus valores, mayor será la divergencia existente. Finalmente, en función de los índices de fijación se puede calcular el flujo génico (Nm) entre poblaciones haploides o diploides. Sin embargo, para realizar dicho cálculo se asumen las siguientes condiciones: baja tasa mutacional, ambientes estables, ausencia de selección del gen analizado, elevado número de individuos y un equilibrio genético entre poblaciones; lo que le convierte en un estimador idealizado o no realista (Nei, 1973; Hudson et al., 1992; Masatoshi & Sudhir, 2000; Lemey et al., 2009; Milgroom, 2015).

1.4.6 Crisantemos (*Chrysanthemum* sp.)

1.4.6.1 Generalidades

Los crisantemos pertenecen a la familia Asteraceae, orden Asterales, clase Magnoliopsida y reino Plantae (Tropicos, 2018). Es una planta nativa de Asia y del Noreste de Europa, la cual tiene más de 150 especies naturales siendo las más cultivadas las siguientes: *Chrysanthemum indicum*, *C. morifolium* y *C. articum* (Cabrera, Alvarez, Sosa de Castro, & Sosa, 2004).

Esta planta fue introducida por primera vez al hemisferio occidental en el siglo XVII y desde entonces su cultivo se ha incrementado y perfeccionado constantemente. Por medio de técnicas de hibridación en Estados Unidos se han desarrollado plantas con flores de diferentes colores, formas y tamaños. Por su amplia variedad, se ha establecido un sistema de clasificación basado en el tipo de florete y en su patrón de crecimiento (National Chrysanthemum Society, 2015).

Los crisantemos son plantas susceptibles a múltiples tipos de plagas y enfermedades, por lo que se requiere tener un gran control en la sanidad de los viveros e invernaderos con el fin de

precautelar la calidad de sus flores y de sus hojas (Cabrera et al., 2004). Dentro de las principales plagas se puede mencionar a la mosca del crisantemo (*Liriomyza trifolii*) y nematodos (*Aphelenchoides ritzemabosi*); mientras que las principales enfermedades son: pudrición de la raíz (*Pythium* sp.), pudrición del tallo (*Rhizoctonia solani*) y podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) (López & Pardo, 2010).

1.4.6.2 Importancia económica

El crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), también llamada como la “Reina de las Flores de Otoño”, es una de las plantas ornamentales más populares en Estados Unidos por su variedad de colores, formas y relativa sencillez de cultivo. Se utiliza principalmente en arreglos florares durante los meses de septiembre y diciembre, liderando el mercado en esta época. Es la planta de maceta más cultivada en Estados Unidos y la más comercializada ya que es la base de adornos florares durante las festividades de Acción de Gracias y Navidad (National Chrysanthemum Society, 2015; Smith, 2013). En 2016, el 99% del crisantemo importado hacia Estados Unidos provenía de Colombia y representó cerca de 200 millones de dólares (Pizano, 2017).

1.4.7 Dalias (*Dahlia* sp.)

1.4.7.1 Generalidades

El género *Dahlia* pertenece a la familia Asteraceae, orden Asterales, clase Magnoliopsida y reino Plantae (Jiménez, 2015). Es una planta nativa de México (considerada la flor nacional de México) con alrededor de 30 especies y más de 20 000 variedades, siendo las principales: *Dahlia coccinea*, *D. pinnata* y *D. imperialis* (Pappu et al., 2005; Jiménez, 2015).

La gran variedad de características de sus flores se debe a más de dos siglos de cultivo, selección e hibridación; y actualmente su distribución es global reportándose su presencia desde el nivel del mar hasta sobre los 2 500 m.s.n.m. (Jiménez, 2015).

El cultivo de dalias a pesar de ser relativamente sencillo, requiere de cuidados para evitar el desarrollo de enfermedades principalmente ocasionadas por insectos, hongos y oomicetos. Las principales plagas identificadas en dalias son orugas, larvas, pulgones, ácaros y saltamontes; los cuales a pesar de ser insectos de pequeño tamaño pueden absorber grandes cantidades de sabia, debilitar a la planta e incluso ser vectores de virus o bacterias. Por otro lado, las enfermedades más frecuentes en dalias son: pudrición de tallo y raíces (*Pythium* sp.), podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) e infecciones víricas (virus del mosaico de la dalia, DMV) (British Dahlia Organization, 2012; Texas A&M University, 2016; Dyer, 2018).

1.4.7.2 Importancia económica

El cultivo de dalias (*Dahlia* sp.) es uno de los cultivos ornamentales más importantes en varios países como: Australia, Canadá, Japón, Holanda, Francia, Chile, Reino Unido y Estados Unidos; por ello su valor en el mercado es de aproximadamente 11 millones de euros. La flor de dalia es una de las flores más cotizadas y más comercializadas a nivel mundial por sus características únicas que la convierten (Pappu et al., 2005; Jiménez, 2015; Elsadek, 2018).

En Estados Unidos, es empleada en concursos, exhibiciones y arreglos florales; involucrando a miles de productores, comerciantes, jardineros e incluso centros de investigación. Al igual que otras plantas florales, su flor tiene un tiempo de vida post-cosecha corto, dificultando su importación e impulsando la producción local para satisfacer la demanda creciente de esta planta (Bogash et al., 2012; Elsadek, 2018; Khuriwal et al., 2018).

1.5 Hipótesis

Las especies identificadas del género *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos y dalias son homogéneas para ambos cultivos.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Instituciones participantes

La presente investigación forma parte del convenio existente entre el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y el Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma (OSU), Estados Unidos.

2.2 Colaboradores científicos

Francisco Javier Flores, PhD. Director de tesis.

Alma Koch Kaiser, M.Sc. Codirectora de tesis.

Carla D. Garzón, PhD. Docente a cargo del Laboratorio de Patógenos de Suelo (OSU).

María Fernanda Proaño, M.Sc. Ayudante de investigación en el Laboratorio de Patógenos de Suelo (OSU).

2.3 Área de estudio

El desarrollo experimental del presente proyecto fue realizado en la Universidad Estatal de Oklahoma, Departamento de Entomología y Fitopatología, Laboratorio de Patógenos del Suelo; localizado en Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos.

2.4 Metodología

2.4.1 Muestras analizadas

Se analizaron 128 aislados del género *Pythium* (anexo A) obtenidos de crisantemos (*Chrysanthemum* sp.) y dalias (*Dahlia* sp.) en tres invernaderos de Long Island, Nueva York en el año 2017. El aislamiento e identificación morfológica de las cepas fue realizado por el Centro de

Horticultura de la Universidad de Cornell a cargo de Margery Daughtrey M.Sc. Dichas cepas fueron transportadas a la Universidad Estatal de Oklahoma en forma de micelio congelado y mantenidas a -20°C hasta su análisis.

2.4.2 Caracterización molecular

2.4.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio preservado a -20°C , para ello se empleó una modificación del protocolo expuesto por Weising, Nybom, Wolff & Kahl, (2005). En primer lugar, se pesó 40-80 mg de micelio y se colocó en tubos con microperlas de 5, 3 y 0.5 mm de diámetro. Los tubos se introdujeron por 15 s en nitrógeno líquido y se homogenizaron en el equipo BeadBeater por 20 s con una velocidad de 4 m/s, proceso que se realizó dos veces.

Se adicionó 800 μL de buffer de lisis CTAB (Tabla 1) y se homogenizó durante 60 s a 4 m/s. Se colocó 400 μL de la solución cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se agitó en vórtex por 10 s. Posteriormente, se incubaron los tubos a 58°C por 30 min con agitación constante. Los tubos se centrifugaron por 15 min a 14000 rpm a 4°C . Se tomó el sobrenadante ($\sim 450 \mu\text{L}$) y se lo transfirió a un nuevo tubo.

Tabla 1

Componentes de 250 mL de buffer de lisis CTAB.

Reactivos	Concentración final (mM)	Cantidad (g)
Sorbitol	140	6.37
Tris HCl, pH 8.0	220	6.66
EDTA	22	1.607
NaCl	800	11.69
CTAB	0.85 %	2.0
SDS	10 %	0.0025

Fuente: Weising, et al. (2005).

Se adicionó 1.5 volúmenes de isopropanol (~ 675 μL) y se mezcló por inversión. Se dejó reposar los tubos durante 30 min a -20°C . Luego, se centrifugó durante 8 min a 22 000 g y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol al 70% (~ 750 μL) y se centrifugó durante 5 min a 22 000 g. Sin tocar el pellet formado, se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos boca abajo sobre una toalla de papel durante 30 min con el fin de eliminar el etanol sobrante.

Finalmente, se resuspendió el pellet en 100 μL de buffer TE 1X y se incubó con 1 μL de RNasa A durante 30 min a 32°C . El ADN extraído de cada muestra se almacenó a -20°C .

2.4.2.2 Cuantificación de ADN y determinación de su pureza mediante espectrofotometría

La cuantificación y la determinación de la pureza del ADN extraído se realizó empleando el equipo NanoDrop 1000 Thermo Scientific®. Antes de empezar con las lecturas se limpió los pedestales y los lectores con agua destilada y papel absorbente, además se colocó 1.5 μL de agua destilada para la inicialización del equipo. Una vez inicializado el equipo, se colocó 1.5 μL de buffer TE 1X, como blanco. Posteriormente, se colocó 1.5 μL de cada muestra y se registró la concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y la relación de absorbancias 260 y 280 nm (260/280) (Thermo Fisher Scientific, 2010).

2.4.2.3 Dilución de ADN

Las muestras de ADN se diluyeron en agua estéril a una concentración de 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y un volumen final de 20 μL , empleando la siguiente relación:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde, V_1 es el volumen de ADN de cada muestra, V_2 es el volumen final deseado (20 μL), C_1 es la concentración de ADN obtenida en el NanoDrop 1000 y C_2 es la concentración final deseada (25 ng/ μL).

2.4.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En el presente proyecto se amplificó la región ITS (*internal transcribed spacer*) perteneciente al ADN ribosomal empleando los primers ITS5 (sentido) e ITS4 (antisentido); con el fin de identificar cada uno de los aislados analizados. Posteriormente, se amplificó un fragmento de los genes *cox I* y *cox II* empleando los primers FM35 (sentido) y FM52 (antisentido); para la identificación de las especies dentro del complejo *Pythium irregulare*.

Las características de los primers empleados se describen en la Tabla 2 y

Tabla 3, para la región ITS y para los genes *cox I* y *cox II*, respectivamente.

Tabla 2

Características de los primers empleados en las reacciones de PCR y secuenciación para la región ITS.

Primer	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	%CG	Referencia
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	55.3	40.91%	(Belbahri et al., 2008)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56.7	45.00%	(Belbahri et al., 2008)

Tabla 3

*Características de los primers empleados en las reacciones de PCR y secuenciación para los genes *cox I* y *cox II*.*

Primer	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	%CG	Referencia
FM35	CAGAACCTTGGCAATTAGG	55.5	47.37%	(Martin, 2000)
FM52	GTTGTGCTAATTCCATTCTAA	51.8	33.33%	(Martin, 2000)

En la Tabla 4, se detallan los volúmenes de cada reactivo empleado para el desarrollo de la PCR tanto para la región ITS como para los genes *cox I* y *cox II*. Se usó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega), el cual contiene: ADN Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de

reacción; cada uno en concentraciones óptimas para la amplificación de las muestras de ADN. En cada reacción se incluyó un control negativo (en lugar de ADN se adicionó 2 μL de agua estéril) para descartar posibles contaminaciones de los reactivos empleados. La concentración de los primers empleados fue de 5 y 2.5 μM , para la región ITS y para los genes *cox I* y *cox II*; respectivamente.

Tabla 4

*Volúmenes de los reactivos empleados en el desarrollo de la PCR para la amplificación de la región ITS y genes *cox I* y *cox II* en un volumen de reacción de 25 μL .*

Reactivos	Volúmenes por reacción (μL)
Agua libre de nucleasas	8.0
GoTaq® Green Mix	12.5
Primer Sentido	1.25
Primer Antisentido	1.25
ADN (25 ng/μL)	2.0
Volumen de reacción total	25.0

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador cuyo programa se detalla en la Tabla 5 para la región ITS y en la

Tabla 6 para los genes *cox I* y *cox II*.

Tabla 5

Configuración del termociclador para la amplificación de la región ITS empleando los primers ITS5 e ITS4.

Fase	T [°C]	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación	50	30 s	35
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

Tabla 6

*Configuración del termociclador para la amplificación de los genes *cox I* y *cox II* empleando los primers FM35 y FM52.*

Fase	T [°C]	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación	57.6	1 min	30
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	1

Los productos de PCR obtenidos fueron almacenados a 4°C hasta ser analizados mediante electroforesis y enviados para su secuenciación.

2.4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa

En un matraz se colocó un volumen de buffer TAE 1X (Tris Base, EDTA y ácido acético) en el cual se disolvió una cantidad de agarosa dependiente de la concentración requerida del gel. Para los productos de PCR de la región ITS, la concentración del gel fue del 1% (m/v); mientras que para los productos de PCR de los genes *cox I* y *cox II* fue del 1.5% (m/v).

Se calentó la solución obtenida, en ciclos de 30 s en un microondas hasta que la agarosa se encuentre totalmente disuelta. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó 3 μ L de bromuro de etidio.

Electroforesis

Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa empleando como tampón de corrida TAE 1X. En cada pocillo se cargó 5 μ L de los productos de PCR, así como el marcador de peso molecular tipo escalera de 100 pb (Axygen® cat. No. M-DNA-100bp) y el control negativo.

Una vez cargadas las muestras (el marcador de peso molecular y el control negativo) se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder y se corrió el gel durante una hora a 95V. Al finalizar la electroforesis, se procedió a revelar al gel con luz ultravioleta (UV) en un transiluminador y se obtuvieron fotografías digitales de cada uno.

2.4.3 Secuenciación

2.4.3.1 Limpieza de los productos de PCR

A partir de los resultados obtenidos en la electroforesis, se aproximó la concentración de cada producto empleando el marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen®) y se calculó el volumen de producto de PCR necesario para alcanzar una concentración de 5 ng/ μ L en un volumen final de 20 μ L.

A cada producto de PCR se lo sometió a un sistema de purificación enzimática (ExoSAP-IT PCR Product Clean-Up Affymetrix®), con el fin de eliminar el exceso de dNTPs y/o primers que puedan interferir con la secuenciación. Para ello, se adicionó 2 μ L de ExoSAP-IT por cada 5 μ L de producto de PCR. La mezcla se incubó primero a 37°C por 15 min y luego a 80°C por 15 min. Al cabo del tiempo de incubación, se tomó el volumen previamente calculado y se lo diluyó con agua estéril. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su envío (Proaño et al., 2014).

2.4.3.2 Envío

La secuenciación de cada una de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio Central de Análisis (*Core Facility*) de la Universidad Estatal de Oklahoma, por medio del equipo 3730 DNA Analyzer Applied Biosystems®. De cada muestra se envió 20 μ L y 10 μ L de cada primer (ITS5, ITS4, FM35 y FM52) por muestra enviada (Proaño et al., 2014).

2.4.4 Análisis bioinformático

2.4.4.1 Limpieza y registro de las secuencias

Las secuencias recibidas de cada aislado, se analizaron, alinearon y ensamblaron empleando el programa CodonCode Aligner versión de prueba 8.0.2 (obtenido de: <https://www.codoncode.com/aligner/download.htm>). En primer lugar, se importaron las secuencias a la interfaz del programa en donde se visualizó su la calidad y se verificó la asignación de bases mediante la inspección de cada cromatograma. Posteriormente, se ensambló la secuencia sentido y antisentido, obteniéndose una secuencia consenso; este proceso se realizó empleando los ajustes por defecto del programa. Las secuencias consenso de cada muestra se exportaron en formato FASTA.

2.4.4.2 Análisis de similitud

Las secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias existentes en la base de datos del NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) por medio de la herramienta de alineamiento local BLAST:

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Para ello se cargó la secuencia consenso en formato FASTA a la página web antes mencionada, se seleccionó como base de datos colección de nucleótidos (*Nucleotide collection*) y se marcó la opción *megablast* para el análisis de secuencias altamente similares.

Una vez concluida la búsqueda, se analizaron los resultados obtenidos con base en el porcentaje de cobertura (*query coverage*), porcentaje de identidad (*identity*) y valor-E (E-value). Para los aislados con un porcentaje de identidad inferior al 98% se procedió a repetir la

amplificación y el proceso de secuenciación; en caso de persistir el problema, dichos aislados fueron descartados del análisis filogenético posterior y del análisis de diversidad genética.

2.4.5 Reconstrucción de la filogenia del género *Pythium*

La reconstrucción de la filogenia del género *Pythium* se realizó con base en las secuencias obtenidas con los primers ITS4 e ITS5. Además, se reconstruyó la filogenia del complejo *Pythium irregulare* a partir de las secuencias obtenidas con los primers FM35 y FM52 (genes *cox I* y *cox II*) y por medio de un árbol concatenado de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*.

Al análisis filogenético se adicionaron secuencias de referencia de la región ITS de diferentes especies del género *Pythium* y también secuencias de los genes *cox I* y *cox II* de las especies pertenecientes al complejo *Pythium irregulare* s.l. (*P. irregulare* sensu stricto (s.s.), *P. cryptoirregulare* y *P. cylindrosporium*). Para los análisis filogenéticos se incluyeron como grupos externos (*outgroups*) a *Saprolegnia parasitica* y *Pythium aphanidermatum* (Tabla 7).

Tabla 7

Número de accesión de las secuencias referencia de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*, empleadas en el análisis filogenético del género *Pythium*.

Especie	Cepa	GenBank (ITS)	GenBank (<i>cox I</i> & <i>cox II</i>)
<i>P. irregulare</i> s.s.	CBS 250.28	AY598702.2 ^a	GU071760.1 ^e
<i>P. cryptoirregulare</i>	CBS 118731	HQ643515.2 ^b	GU071763.1 ^e
<i>P. cryptoirregulare</i>	P50	AY907893.1 ^b	AY907918.1 ^b
<i>P. cylindrosporium</i>	CBS 218.94	AY598643.2 ^a	GU071762.1 ^e
<i>P. intermedium</i>	CBS 266.38	AY598647.4 ^a	-
<i>P. rostratifingens</i>	CBS 115464	AY707986.2 ^c	-
<i>P. middletonii</i>	CBS 528.74	AY598640.1 ^a	-
<i>P. ultimum</i>	CBS 398.51	AY598657.2 ^a	-
<i>P. myriotylum</i>	CBS 254.70	AY598678.2 ^c	-
<i>P. dissotocum</i>	CBS 166.68	AY598634.2 ^a	-
<i>P. aphanidermatum</i> *	CBS 118.80	AY598622.2 ^a	KJ595344.1 ^e
<i>Saprolegnia parasitica</i> **	IFO32780	AB217688 ^d	-

a: (A. Lévesque & W.A.M De Cock, 2004); b: (Garzón et al., 2005); c: (W.A.M De Cock et al., 2015); d: (Villa et al., 2006); e: (Spies et al., 2011).

*: Especie empleada como grupo externo en la reconstrucción filogenética del complejo *Pythium irregulare* s.l.

** : Especie empleada como grupo externo en la reconstrucción filogenética del género *Pythium* con base en la región ITS.

2.4.5.1 Alineamiento múltiple

El alineamiento múltiple se realizó empleando el software MEGA7 versión 7.0.26 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). Se insertaron en el programa las secuencias de ADN en formato FASTA y se seleccionó el algoritmo ClustalW (Higgins, Thompson, & Gibson, 1994) para la elaboración del alineamiento múltiple empleando parámetros predeterminados. Para las secuencias de los genes *cox I* y *cox II*, el alineamiento se realizó tomando en cuenta los codones al ser secuencias codificantes.

Concluida la ejecución del algoritmo, se verificó manualmente su calidad y se exportó el alineamiento en formato FASTA.

2.4.5.2 Determinación del mejor modelo para la construcción del árbol filogenético

La selección del mejor modelo de sustitución de nucleótidos se desarrolló por medio de la opción: *Models>Find Best DNA/Protein Models (ML)*, dentro del software MEGA7; cuyos parámetros de operación fueron los siguientes: método estadístico: máxima verosimilitud; tipo de sustitución: nucleótidos y se escogió una eliminación parcial del 95% para los datos faltantes/gaps. Este análisis se realizó con base en el alineamiento múltiple de la región ITS o de los genes *cox I* y *cox II*.

2.4.5.3 Construcción del árbol filogenético

Se construyeron tres árboles en total, el primero de ellos abarcó todas las secuencias de la región ITS del género *Pythium*, el segundo se enfocó en las secuencias de la región COX de los aislados pertenecientes al complejo *Pythium irregulare*; y el tercero fue un árbol concatenado de *Pythium irregulare* s.l. basado en la región ITS y en la región COX. Todos los árboles se construyeron empleando el método de máxima verosimilitud y el método de inferencia bayesiana.

Reconstrucción basada en el método de máxima verosimilitud

Los árboles filogenéticos se reconstruyeron empleando el método de máxima verosimilitud por medio de la opción: *Phylogeny>Construct/Test Maximum Likelihood*, dentro del software MEGA7.

La ejecución del programa se llevó a cabo manteniendo su configuración por defecto, exceptuando los siguientes parámetros:

- *Modelo o método de sustitución*: se seleccionó el mejor modelo de sustitución con base en los resultados obtenidos de la opción *Find Best DNA/Protein Model*.
- *Distribución gamma y sitios invariables*: se escogió con base en los resultados obtenidos de la opción *Find Best DNA/Protein Model*.
- *Tratamiento de datos faltantes/gaps*: se eligió eliminación parcial del 95%, con el fin de retener la mayor cantidad de información y remover datos faltantes/gaps únicamente cuando sea necesario.

La reconstrucción filogenética del árbol multilocus se realizó empleando la herramienta RAxML localizada en el portal web CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>) utilizando los parámetros por defecto.

Reconstrucción basada en el método de inferencia bayesiana

La reconstrucción filogenética empleando inferencia bayesiana se realizó empleando el software BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) versión 1.10.4, el cual a su vez incluye los programas BEAUti, LogCombiner y Tree Annotator (Suchard et al., 2018).

En primer lugar, se cargaron los alineamientos múltiples de cada región a la interfaz del programa BEAUti y se procedió a modificar únicamente los siguientes parámetros:

- *Modelo de sustitución*: se seleccionó el mejor modelo de sustitución para cada alineamiento de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente en MEGA7. En el caso del alineamiento de los genes *cox I* y *cox II* se realizaron particiones en la posición 1, 2 y 3 de los codones.
- *Modelo de reloj*: modelo estricto con una tasa de 1.0.
- *Prior del árbol*: coalescente de tamaño constante.
- *Longitud de cadena y frecuencia de muestreo*: se seleccionó una longitud de cadena de 10×10^6 con una frecuencia de muestreo de 1000.

Con los parámetros antes mencionados, se ejecutó BEAUti y se generó un archivo .xml, el mismo que se subió a la interfaz del software BEAST. Tras la ejecución de BEAST se generaron archivos .log y .tree. La visualización y diagnóstico del archivo .log se realizó por medio del software Tracer versión 1.7.1, verificándose el tamaño de muestra efectivo con el fin de observar si la longitud de cadena seleccionada fue la adecuada.

Posteriormente, por medio del programa LogCombiner se unificaron los archivos .tree tomando en consideración un *Burn-in* del 10% del total de árboles generados. Finalmente, se empleó el programa Tree Annotator para generar un árbol consenso (.tre) que presente la topología con mejor soporte y la probabilidad posterior de cada clado.

2.4.5.4 Soporte estadístico de los árboles construidos

Se estimó la confiabilidad y soporte de los clados de los árboles construidos por medio del método de máxima verosimilitud mediante un análisis *bootstrap* de 1000 repeticiones. La probabilidad posterior (soporte) de los clados de los árboles construidos a través del método de inferencia bayesiana se obtuvo aplicando el modelo de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC).

En el presente proyecto únicamente se mostró la topología obtenida a partir del método de máxima verosimilitud; sin embargo, el soporte *bootstrap* se colocó en la parte superior de cada rama y la probabilidad posterior en la parte inferior de las mismas.

2.4.6 Evaluación de la diversidad genética

2.4.6.1 Composición nucleotídica y frecuencia de pares de nucleótidos

Las secuencias consenso obtenidas de cada aislado se cargaron en la interfaz del programa MEGA7 y por medio de la opción: *Data>Explore Active Data>Statistics>Nucleotide Composition* se obtuvo la composición nucleotídica y longitud de cada secuencia consenso, así como el promedio de todas las secuencias. Por otro lado, para la obtención de la frecuencia de pares de nucleótidos se empleó la opción: *Data>Explore Active Data>Statistics>Nucleotide Pair Frequencies*. Este procedimiento se realizó tanto para las secuencias de la región ITS como para *cox I* y *cox II*.

2.4.6.2 Cálculo de índices de diversidad genética

La estimación de la diversidad genética de la población de *Pythium* predominante se realizó por medio del software DnaSP versión 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). Para ello, se cargó al

programa el alineamiento múltiple de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*; el análisis se realizó por separado para cada *locus*.

En primer lugar, se procedió a definir las poblaciones de estudio y a través de la opción: *Analysis>Gene Flow and Genetic Differentiation*, se estimó la diversidad genética intra e interpoblacional mediante los siguientes índices: número de sitios segregantes (*S*), número de haplotipos (*h*), diversidad de haplotipos (*Hd*) y diversidad nucleotídica (π). Adicionalmente, se aproximó la diferenciación genética interpoblacional mediante el parámetro χ^2 (Masatoshi & Sudhir, 2000) y se evaluó el flujo genético por medio del coeficiente de hibridación entre poblaciones (F_{ST}) y el flujo genético (*Nm*) (Hudson et al., 1992).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Caracterización molecular

3.1.1 Extracción y cuantificación de ADN

A través de la aplicación del protocolo CTAB se extrajo ADN genómico de 128 aislados del género *Pythium* provenientes de tres invernaderos de Long Island – Nueva York (50% crisantemos y 50% dalias). El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría en el equipo NanoDrop ND-1000® obteniéndose una concentración entre los 70 y 4900 ng/ μ L y un promedio de 1.73 para la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (260/280). En el anexo A se detalla la concentración y la relación de absorbancias 260/280 para cada aislado.

3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa

3.1.2.1 Amplificación de la región ITS

Por medio del uso de los primers ITS5 e ITS4, se amplificó un fragmento entre los 800 y 1000 pb de la subunidad ribosomal menor 18S (porción), el espaciador transcrito interno 1 (completo), la subunidad ribosomal mayor 5.8S (completo), el espaciador transcrito interno 2 (completo) y la subunidad ribosomal mayor 28S (porción).

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% (m/v) y se utilizó el marcador de peso molecular tipo escalera de 100 pares de bases (Axygen® cat. No. M-DNA-100bp) que contiene 12 fragmentos de ADN entre las 100 y 3000 pb. Este marcador también permitió cuantificar los productos de PCR en función de la intensidad de cada una de las bandas encontradas (Figura 4).

Tamaño (pb)	Concentración (ng/ μ L)
3000	10.8
2000	14.7
1500	11.6
1000	7.7
800	6.2
700	5.4
600	4.6
500	15.0
400	6.0
300	5.6
200	6.0
100	6.0

Figura 4. Marcador de peso molecular tipo escalera de 100 pares de bases, se indica el tamaño y concentración de cada banda

De los 128 aislados analizados, 96 mostraron una banda alrededor de las 1000 pb, 28 aproximadamente de 800 pb y cuatro aislados (D003, D009, D011 y D012) exhibieron más de una banda por lo cual se procedió a descartarlas del estudio (Figura 5-14).

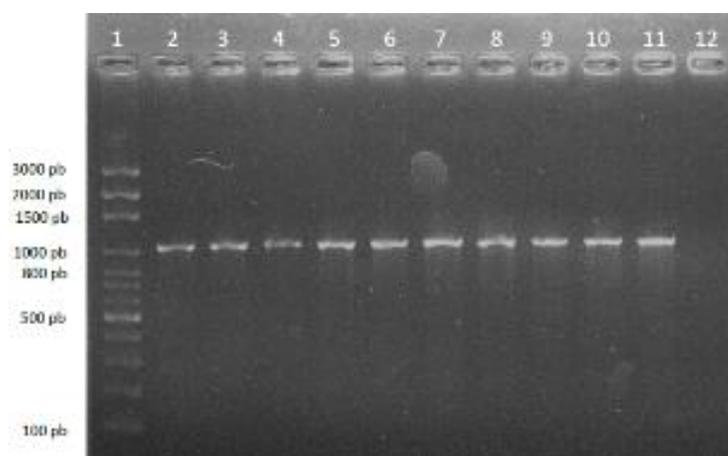


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: A002; 3: A003; 4: A004; 5: A005; 6: A006; 7: A007; 8: B001; 9: B002; 10: B003; 11: B004; 12: Control negativo.

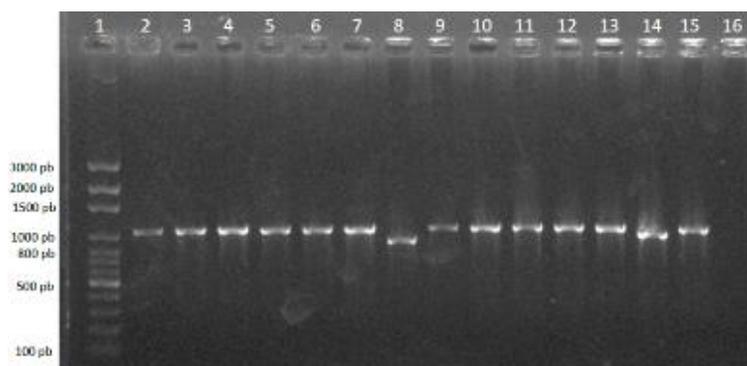


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B005; 3: B006; 4: B007; 5: B008; 6: B009; 7: B010; 8: A001; 9: B011; 10: B012; 11: B013; 12: B014; 13: B015; 14: B059; 15: B016; 16: Control negativo.

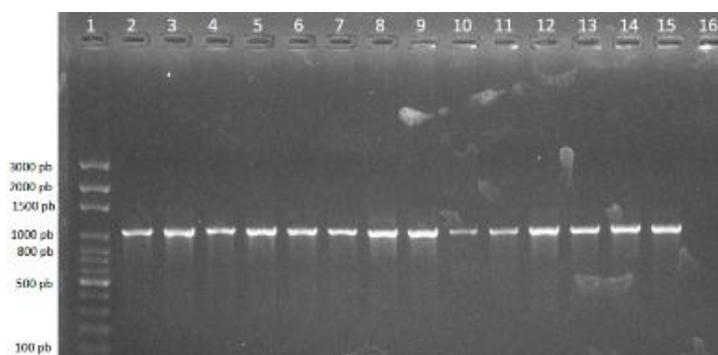


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B017; 3: B018; 4: B019; 5: B020; 6: B021; 7: B022; 8: B023; 9: B024; 10: B025; 11: B026; 12: B027; 13: B028; 14: B029; 15: B030; 16: Control negativo.

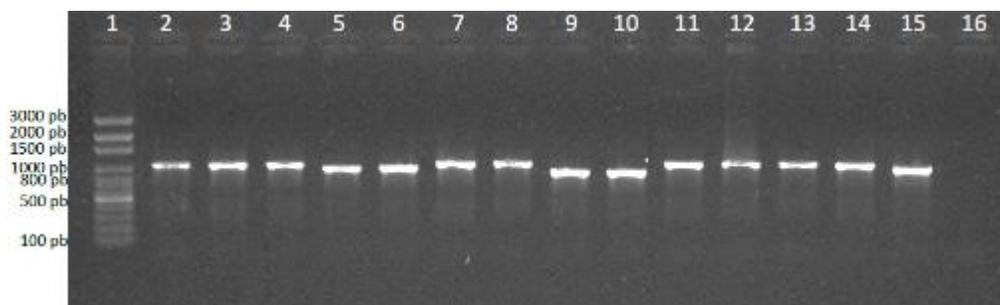


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B031; 3: B032; 4: B033; 5: B061; 6: B063; 7: B034; 8: B035; 9: B066; 10: B068; 11: B036; 12: B037; 13: B038; 14: B039; 15: B069; 16: Control negativo.

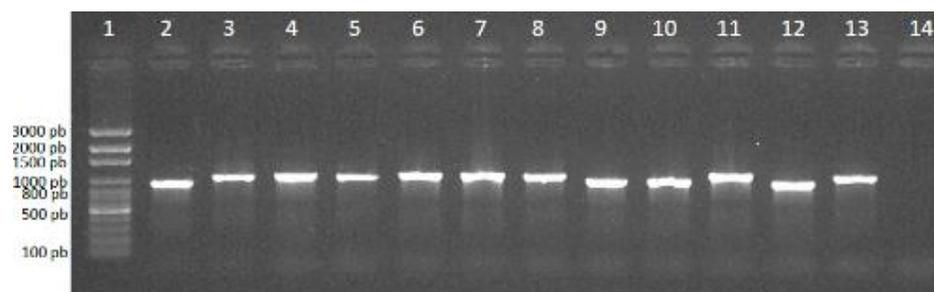


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B073; 3: B040; 4: B041; 5: B042; 6: B043; 7: B044; 8: B045; 9: B076; 10: B077; 11: B046; 12: B078; 13: B047; 14: Control negativo.

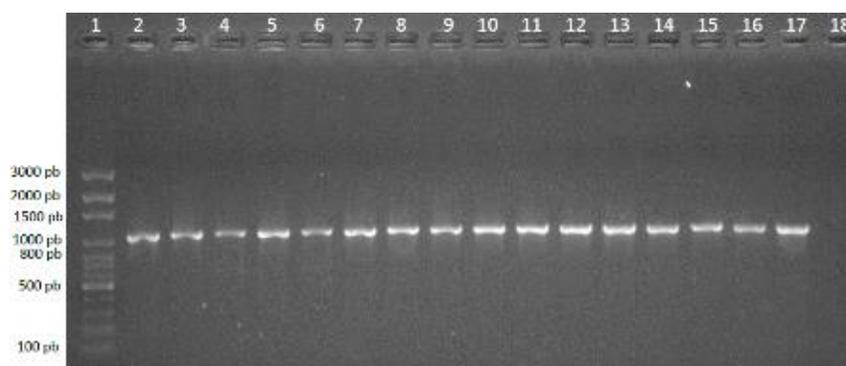


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B048; 3: B049; 4: B050; 5: B051; 6: B052; 7: B053; 8: B054; 9: B055; 10: B056; 11: B057; 12: B058; 13: B060; 14: B062; 15: B064; 16: B065; 17: B067; 18: Control negativo.

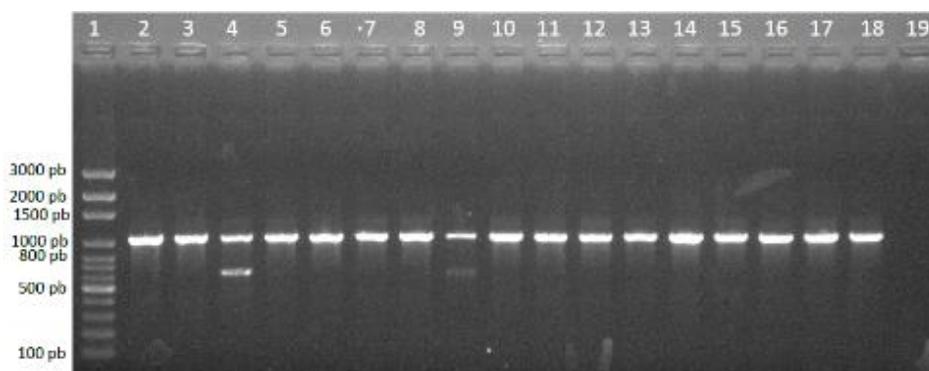


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B070; 3: B071; 4: D003; 5: B072; 6: B074; 7: B075; 8: B080; 9: D009; 10: C010; 11: C011; 12: C012; 13: C013; 14: C017; 15: C018; 16: C019; 17: C020; 18: C021; 19: Control negativo.

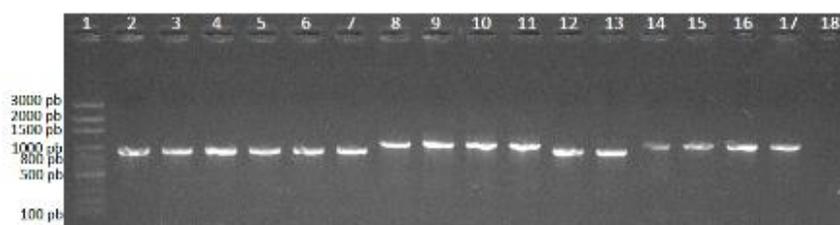


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B079; 3: C001; 4: C002; 5: C003; 6: C004; 7: C005; 8: C022; 9: C023; 10: C024; 11: C025; 12: C006; 13: C007; 14: C027; 15: C028; 16: D001; 17: D002; 18: Control negativo.

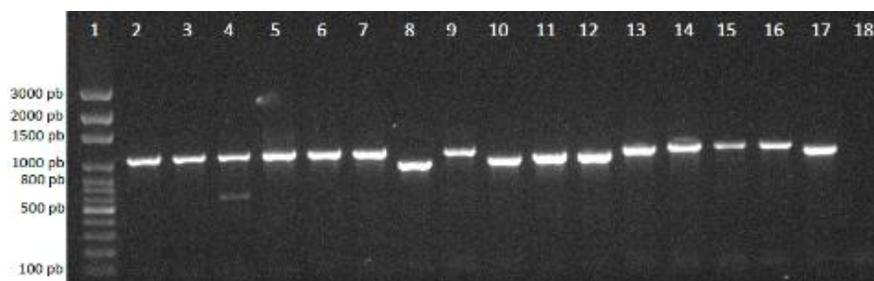


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: D004; 3: D005; 4: D011; 5: D006; 6: D010; 7: D007; 8: C006; 9: D008; 10: C007; 11: C008; 12: C009; 13: C0014; 14: C015; 15: C016; 16: C026; 17: C029; 18: Control negativo.

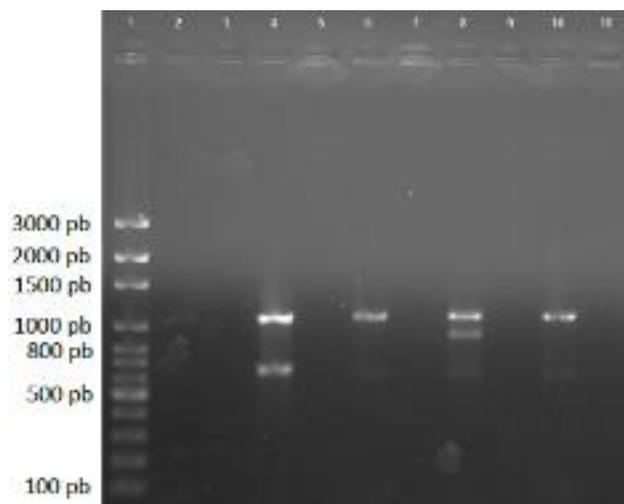


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) del producto de PCR de la región ITS.
Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: D010; 4: D003; 6: D009; 8: D011; 10: D012; 11: Control negativo.

3.1.2.2 Amplificación de los genes *cox I* y *cox II*

La amplificación de los genes *cox I* y *cox II* se realizó únicamente para los aislados pertenecientes al complejo *Pythium irregulare*. Por medio del uso de los primers FM35 y FM52 se obtuvieron productos de aproximadamente 1000 pb que contienen el gen citocromo oxidasa II (porción), el espaciador intergénico *cox II-coxI* (completo) y el gen citocromo oxidasa I (porción). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% (m/v) y se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb descrito anteriormente (Figura 4).

En total se amplificaron 86 cepas y todas mostraron una banda de aproximadamente 1000 pares de bases (Figura 15-21).

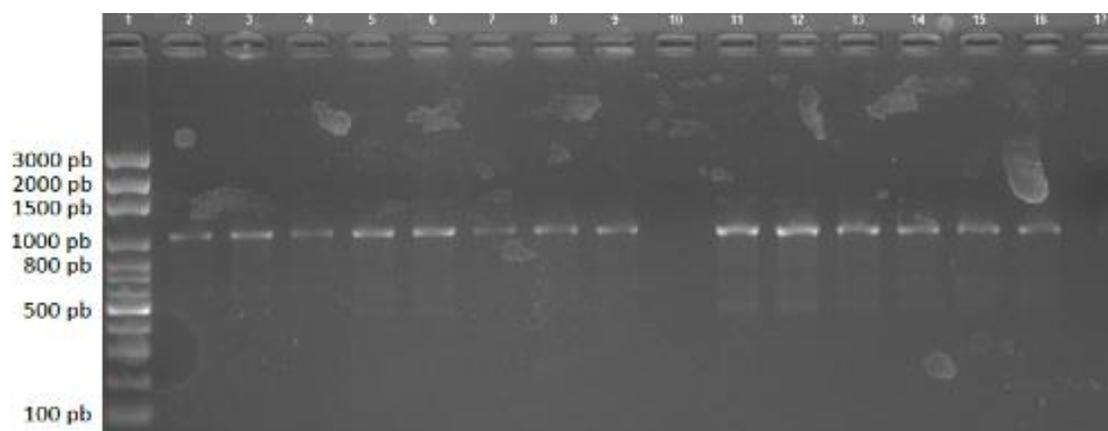


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: A002; 3: A004; 4: A007; 5: B001; 6: B002; 7: B003; 8: B004; 9: B005; 11: B006; 12: B007; 13: B008; 14: B009; 15: B010; 16: B011; 17: Control negativo.

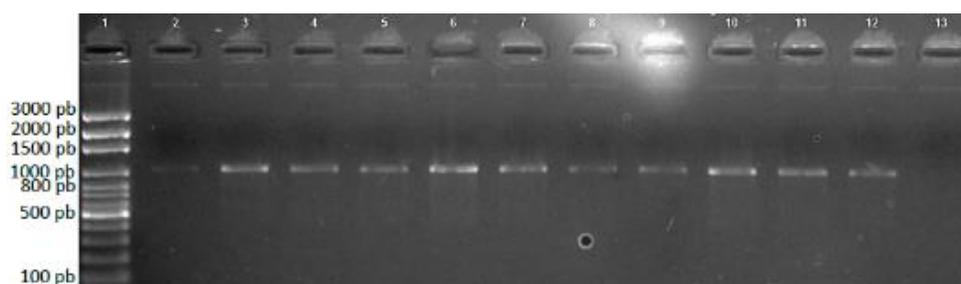


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B012; 3: B013; 4: B014; 5: B015; 6: B016; 7: B017; 8: B018; 9: B019; 10: B020; 11: B021; 12: B022; 13: Control negativo.

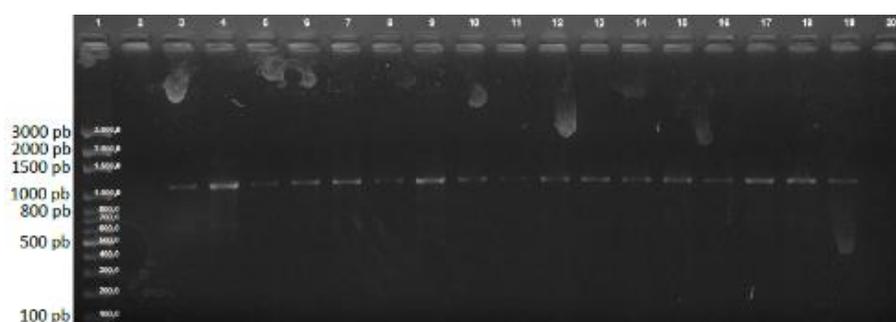


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 3: B023; 4: B024; 5: B025; 6: B026; 7: B027; 8: B028; 9: B029; 10: B030; 11: B031; 12: B032; 13: B033; 14: B034; 15: B035; 16: B036; 17: B037; 18: B038; 19: B039; 20: Control negativo.

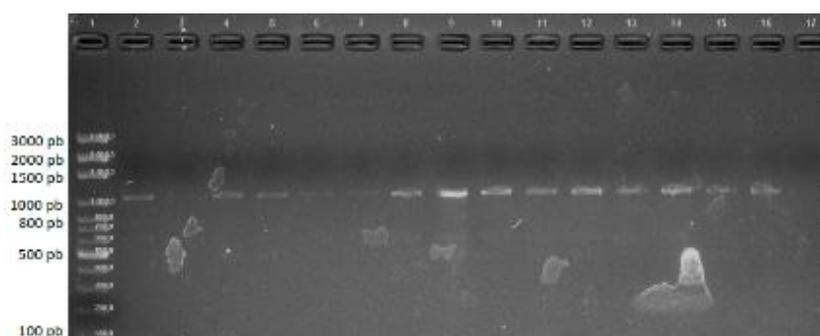


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B040; 3: B041; 4: B042; 5: B043; 6: B044; 7: B045; 8: B046; 9: B047; 10: B048; 11: B049; 12: B050; 13: B051; 14: B052; 15: B053; 16: B054; 17: Control negativo.

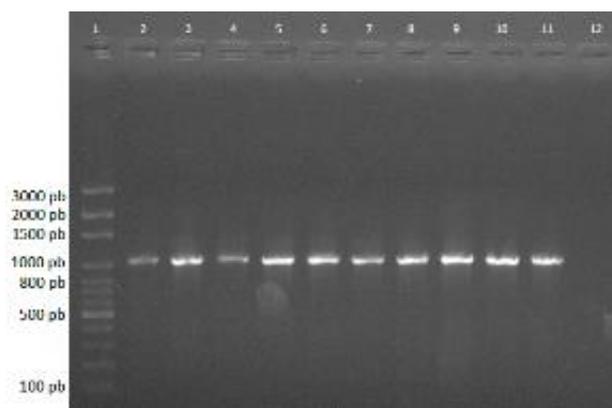


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B055 3: B056; 4: B057; 5: B058; 6: B060; 7: B064; 8: B065; 9: B067; 10: B070; 11: B071; 12: Control negativo.

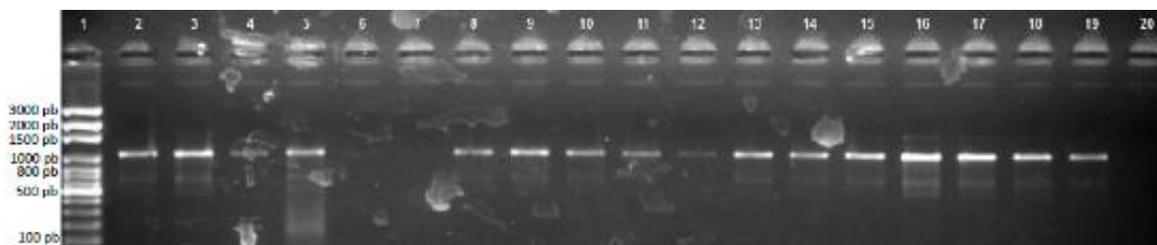


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: B072 3: B074; 4: B075; 5: B080; 8: C010; 9: C011; 10: C012; 11: C013; 12: C017; 13: C018; 14: C019; 15: C020; 16: C021; 17: C022; 18: C023; 19: C024; 20: Control negativo.

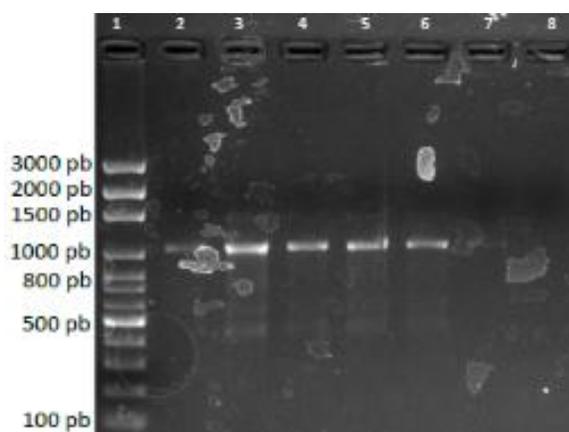


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) del producto de PCR de los genes *cox I* y *cox II*.

Nota: 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; 2: C025 3: C027; 4: C028; 5: C021; 6: C022; 7: C017; 8: Control negativo.

3.2 Secuenciación

3.2.1 Región ITS

Los productos de PCR de la región ITS correspondientes a 124 aislados del género *Pythium* presentaron una concentración promedio de 45 ng/ μ L (Figura 5-14) y fueron secuenciados usando los primers ITS4 e ITS5 en el *Core Facility* de la Universidad Estatal de Oklahoma. Los resultados de cada secuencia fueron recibidos en formato AB1 y FASTA.

3.2.2 Genes *cox I* y *cox II*

Los productos amplificados de los genes *cox I* y *cox II* correspondientes a 86 aislados del complejo *Pythium irregulare* presentaron una concentración promedio de 25 ng/ μ L (Figura 15-21) y su secuenciación se realizó empleando los primers FM35 y FM52 en el *Core Facility* de la Universidad Estatal de Oklahoma. Los resultados de cada secuencia se recibieron en formato AB1 y FASTA.

3.3 Análisis bioinformático

3.3.1 Región ITS

3.3.1.1 Limpieza y registro de las secuencias

Por medio del programa CodonCode Aligner versión 8.0.2 se visualizaron y editaron los archivos recibidos del *Core Facility* de la Universidad Estatal de Oklahoma. En la interfaz del programa se pudo observar la calidad de las secuencias en función de matices de verde que iban del verde oscuro (calidad baja) al blanco (calidad alta). Se inspeccionaron los cromatogramas, la asignación de bases y el ensamblaje del *contig* para cada aislado.

Todas las secuencias presentaron picos bien definidos y con una baja cantidad de ruido; por lo cual se generaron sin inconvenientes los *contigs* para las 124 muestras (Figura 22).



Figura 22. Interfaz del programa CodonCode Aligner.

Nota: A: Panel en el que se muestra el ensamblaje del contig. B: Panel que indica los cromatogramas de las secuencias sentido y antisentido del aislado, así como la calidad y asignación de bases. C: Panel que expone la secuencia consenso del contig generado.

3.3.1.2 Análisis de similitud

Mediante la herramienta BLAST se compararon los *contigs* resultantes con la base de datos del NCBI y se identificó cada uno de los aislados a nivel de género y especie. El porcentaje de cobertura de las 124 secuencias analizadas fue superior al 98%, indicando una extensión de *contig* (aproximadamente 860 pares de bases) óptima para la comparación con la región ITS. Sin embargo, de los 124 aislados, ocho presentaron un porcentaje de identidad inferior al 98%, por lo cual no se pudo identificar con confianza la especie y fueron excluidos del análisis posterior.

El análisis de similitud permitió identificar que los 116 aislados se distribuyen entre ocho especies del género *Pythium*, siendo la de mayor abundancia *P. irregulare* s.l. con un 74.14% seguida de *P. aphanidermatum* con un 9.48%. En dalias se encontraron únicamente especies pertenecientes a *P. irregulare* s.l.; mientras que en crisantemos se halló una variedad de ocho especies de *Pythium*. En ambos cultivos *P. irregulare* s.l. fue la predominante (Tabla 8).

El análisis de la región ITS no permitió diferenciar entre especies del complejo *Pythium irregulare* (*Pythium cryptoirregulare*, *P. cylindrosporum* y *P. irregulare* s.s.); por lo que se emplearon los genes *cox I* y *cox II* para su diferenciación.

Tabla 8

Especies del género Pythium en crisantemos y dalias identificadas con base enl análisis de similitud de la región ITS.

Especie	Crisantemos	Dalias	Total
<i>Pythium irregulare</i> s.l.	28	58	86
<i>Pythium aphanidermatum</i>	11	-	11
<i>Pythium myriotylum</i>	7	-	7
<i>Pythium ultimum</i>	5	-	5
<i>Pythium rostratifingens</i>	4	-	4
<i>Pythium dissotocum</i>	1	-	1
<i>Pythium intermedium</i>	1	-	1
<i>Pythium middletonii</i>	1	-	1
Total	58	58	116

En el anexo A se detallan los resultados del análisis de similitudde todas las secuencias de la región ITS en estudio.

3.3.2 Genes *cox I* y *cox II*

3.3.2.1 Limpieza y registro de las secuencias

Empleando el programa CodonCode Aligner versión 8.0.2 se visualizaron y editaron los archivos proporcionados por el *Core Facility* de la Universidad Estatal de Oklahoma. En la interfaz del programa se observó la calidad de las secuencias en función de matices de verde que iban del verde oscuro (calidad baja) al blanco (calidad alta). Se inspeccionaron los cromatogramas, la asignación de bases y el ensamblaje del *contig* para cada aislado.

Las secuencias correspondientes a los genes *cox I* y *cox II* mostraron picos bien definidos y con una baja cantidad de ruido; por lo cual se generaron sin inconvenientes los *contigs* para los 86 aislados correspondientes a *Pythium irregulare* s.l. (Figura 23).



Figura 23. Interfaz del programa CodonCode Aligner.

Nota: A: Panel en el que se muestra el ensamblaje del contig. B: Panel que indica los cromatogramas de las secuencias sentido y antisentido del aislado, así como la calidad y asignación de bases. C: Panel que expone la secuencia consenso del contig generado.

3.3.2.2 Análisis de similitud

Mediante la herramienta BLAST se compararon los *contigs* de los genes *cox I* y *cox II* con la base de datos del NCBI y se identificaron las especies dentro del complejo *Pythium irregulare*. El porcentaje de cobertura de las 86 secuencias analizadas osciló entre el 70% y 100%. El bajo porcentaje de cobertura (~70%) alcanzado se debe a que dentro de la base de datos del NCBI no se han reportado secuencias completas de los genes *cox I* y *cox II* para *Pythium cryptoirregulare* ni para *Pythium cylindrosporum*. Por otro lado, las 86 secuencias analizadas obtuvieron un porcentaje de identidad superior al 98% permitiendo así su identificación.

Por medio del análisis de similitud se logró dividir a los 86 aislados del complejo *P. irregulare* en: *P. cryptoirregulare* (62) y *P. irregulare* s.s. (24). En dalias y crisantemos se observó una mayor presencia de *P. cryptoirregulare* (Tabla 9).

Tabla 9

*Diversidad de especies dentro del complejo Pythium irregulare s.l. mediante análisis de similitud de los genes *cox I* y *cox II*.*

Especie	Crisantemos	Dalias	Total
<i>Pythium cryptoirregulare</i>	15	47	62
<i>Pythium irregulare s.s.</i>	13	11	24
Total	28	58	86

En el anexo A se detallan los resultados del análisis de similitudde todas las secuencias de los genes *cox I* y *cox II* en estudio.

3.4 Reconstrucción de la filogenia del género *Pythium*

3.4.1 Región ITS

3.4.1.1 Alineamiento múltiple

El alineamiento múltiple obtenido tras ejecutar el algoritmo ClustalW con la configuración predeterminada por el software MEGA7 contempló 925 caracteres de los cuales 279 fueron conservados (identificados por medio de un asterisco en la parte superior del alineamiento), 639 fueron variables y 527 presentaron parsimonia informativa (Figura 24).

3.4.1.2 Elección del modelo de sustitución

El análisis ejecutado por el software MEGA7 involucró a 128 secuencias nucleotídicas y 667 posiciones (eliminando posiciones con una cobertura menor al 95%). El mejor modelo obtenido fue el de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) tomando en cuenta una distribución gamma discreta de cinco categorías para modelar la heterogeneidad evolutiva entre sitios (+G) y también asumiendo que una fracción de los sitios fueron evolutivamente invariables (+I). Este modelo presentó el menor valor de criterio de información Bayesiano (BIC = 13011.32) y también el menor valor de máxima verosimilitud (lnL = -5035.53).

En el anexo B se detalla para cada modelo el valor del criterio de información Bayesiana (BIC) y de Akaike corregido (AICc); el valor de máxima verosimilitud (lnL), el número de parámetros, las estimaciones tomando en cuenta la distribución gamma, la fracción estimada de sitios invariantes, los valores estimados de transición/transversión (R), las frecuencias de nucleótidos (f) y las tasas de sustitución de bases para cada par de nucleótidos (r).

3.4.1.3 Construcción y soporte estadístico del árbol filogenético

La reconstrucción filogenética del género *Pythium* se realizó con base en las secuencias de la región ITS mediante el método estadístico de máxima verosimilitud empleando el modelo de sustitución de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY +G +I) descrito anteriormente. El soporte de cada clado se obtuvo por medio de un análisis *bootstrap* de 1000 repeticiones (parte superior del nodo) y mediante el cálculo de la probabilidad posterior con base en MCMC (parte inferior del nodo).

La topología del árbol consenso (Figura 25) construido con base en la región ITS, mostró la formación de diez grupos principales (I-X) y el enraizamiento del árbol se consiguió empleando como grupo externo (*outgroup*) a *Saprolegnia parasitica* (GenBank: AB217688.1).

El grupo I presentó un soporte *bootstrap* de 73.9% y una probabilidad posterior del 1 y se agruparon 25 taxones más la secuencia de referencia de *P. irregulare* s.s. (GenBank: AY598702.2). En el grupo II se agruparon seis taxones incluida la secuencia de referencia de *P. cryptoirregulare* (GenBank: HQ643515.2) con un soporte *bootstrap* del 69% y una probabilidad posterior del 0.999%.

6. AY598647.4_Pythiu	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
7. AY598657.2_Pythiu	TGGGGACGAAAGTCC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
8. AY598678.2_Pythiu	CGAGAACGAAAGTTT TTTGGTTTAACTCC -ATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
9. AY598702.2_Pythiu	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
10. AY707986.2_Pythiu	TGAGGACGAAAGTCC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
11. A001	TGGGGACGAAAGTCC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
12. A002	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
13. A003	TGAGGACGAAAGTCC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
14. A004	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
15. A005	TGAGGACGAAAGTCC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
16. A006	TGAGGACGAAAGTCC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
17. A007	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
18. HQ643515.2_Pythiu	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
19. B001	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
20. B002	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
21. B003	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
22. B004	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
23. B005	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
24. B006	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
25. B007	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
26. B008	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
27. B009	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
28. B010	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
29. B011	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
30. B012	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
31. B013	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
32. B014	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
33. B015	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC
34. B016	TGAGAACGAAAGTTCTTGC TTTTAACTAGATAACAAC TTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAC

Figura 24. Interfaz del software MEGA7 que muestra el alineamiento múltiple de la región ITS (residuo 245-331) resultante tras la aplicación del algoritmo ClustalW.

Nota: Cada nucleótido presenta un color característico, los gaps (-) indican inserciones y deleciones, y los asteriscos (*) en la parte superior indican los sitios conservados del alineamiento.

El grupo III se formó por secuencias de referencia de *P. cylindrosporum* (GenBank: AY598643.2), *P. cryptoirregulare* (GenBank: AY907893.1) y 56 taxones, agrupados con un soporte *bootstrap* del 69.7% y una probabilidad posterior del 0.792. Los tres grupos mencionados anteriormente conforman *P. irregulare* s.l. Los grupos IV (soporte *bootstrap* del 100% y probabilidad posterior de 1) y VI (soporte *bootstrap* del 92.6% y probabilidad posterior de 1) incluyeron un taxón y la secuencia de referencia de *P. intermedium* (GenBank: AY598647.4) y *P. middletonii* (GenBank: AY598640), respectivamente.

En el grupo V se encuentran cuatro taxones relacionados con la secuencia de referencia de *P. rostratifyingens* (GenBank: AY707986.2) con un soporte *bootstrap* del 100% y probabilidad posterior de 1. El grupo VII incluye a la secuencia de referencia de *P. ultimum* (GenBank: AY598657.2) y cinco taxones con un soporte *bootstrap* del 100% y probabilidad posterior de 1.

El grupo VIII abarca siete taxones y la secuencia de referencia de *P. myriotylum* (GenBank: AY598678.2) con un soporte *bootstrap* del 94.9% y probabilidad posterior de 1. El grupo IX se forma de la secuencia de referencia de *P. dissotocum* (GenBank: AY598634.2) y un taxón con un soporte *bootstrap* del 99.9% y una probabilidad posterior del 1. Finalmente, el grupo X alberga a 11 taxones y a la secuencia de referencia de *P. aphanidermatum* (GenBank: AY598622.2) con un soporte *bootstrap* del 86.7% y una probabilidad posterior de 1.

El árbol consenso basado en la región ITS y el análisis realizado con BLAST permitieron confirmar la especie de los aislados encontrados en los grupos IV-X. Sin embargo, se observó discordancias en la distribución de los aislados dentro del complejo *Pythium irregulare* (grupo I-III), por lo cual se procedió a estudiarlo por medio de la secuenciación de los genes *cox I* y *cox II*.

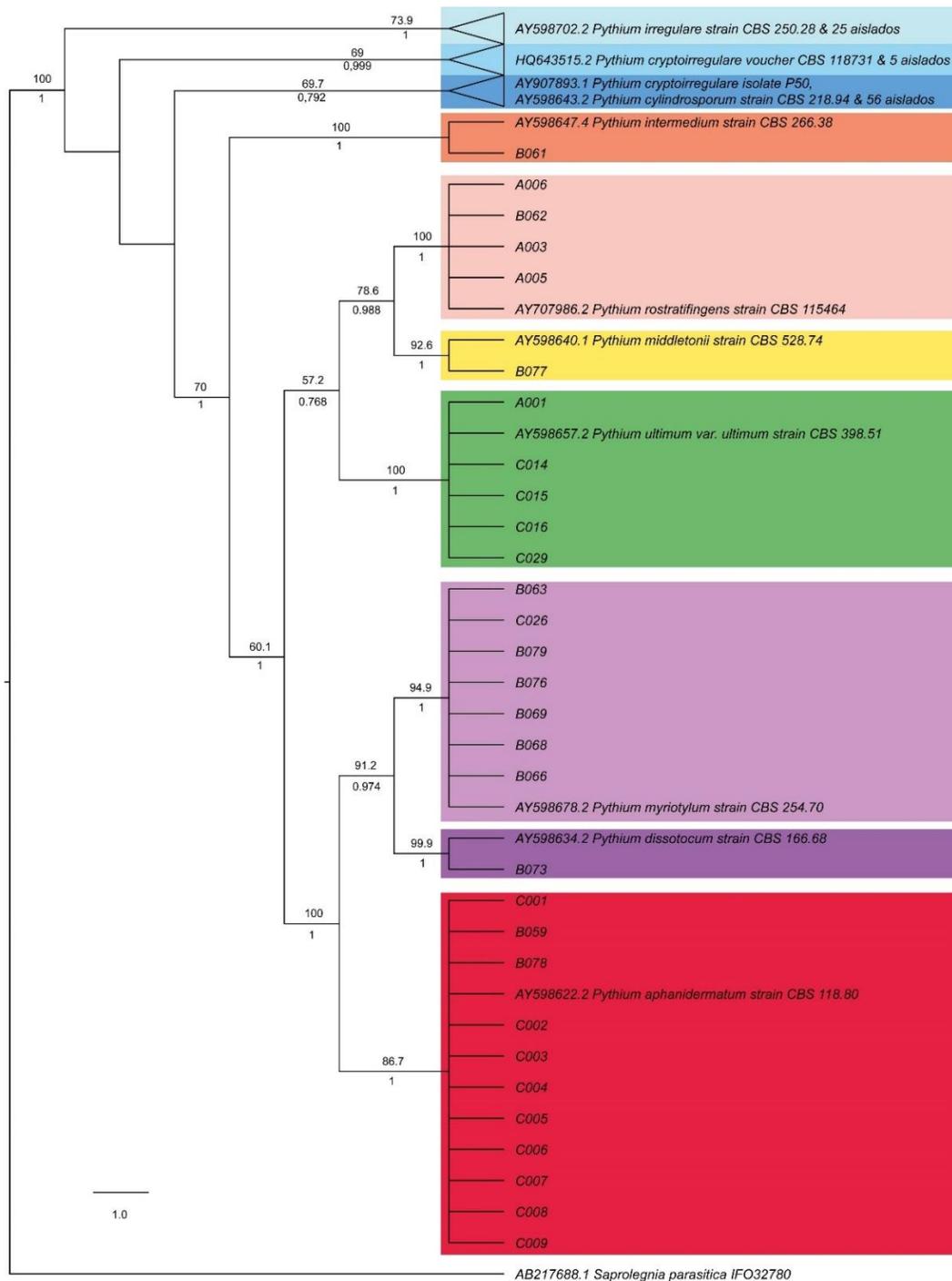


Figura 25. Árbol filogenético del género *Pythium* generado con base en secuencias de la región ITS mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY +G +I) y empleando como grupo externo a *Saprolegnia parasitica*. El soporte bootstrap se muestra en la parte superior de los nodos y en la parte inferior se indica la probabilidad posterior.

3.4.2 Genes *cox I* y *cox II*

3.4.2.1 Alineamiento múltiple

El alineamiento múltiple resultante después de la ejecución del algoritmo ClustalW con los parámetros predeterminados por el software MEGA7 abarcó 866 caracteres de los cuales 801 fueron conservados, 63 variables y 18 presentaron parsimonia informativa (Figura 26).

3.4.2.2 Elección del modelo de sustitución

El análisis realizado por medio del software MEGA7 abarcó 90 secuencias nucleotídicas y un total de 864 posiciones (eliminando posiciones con una cobertura menor al 95%). El análisis se realizó tomando en consideración la naturaleza codificante de los genes *cox I* y *cox II*.

El mejor modelo obtenido fue el de Tamura 3-parámetros (T92), presentando el menor valor de criterio de información Bayesiano ($BIC = 4901.54$) y también el menor valor de máxima verosimilitud ($\ln L = -1444.57$).

En el anexo C se detalla para cada modelo el valor del criterio de información Bayesiana (BIC), del criterio de información de Akaike corregido (AICc), el valor de máxima verosimilitud ($\ln L$), el número de parámetros, las estimaciones tomando en cuenta la distribución gamma, la fracción estimada de sitios invariantes, los valores estimados de transición/transversión (R), las frecuencias de nucleótidos (f) y las tasas de sustitución de bases para cada par de nucleótidos (r).

3.4.2.3 Construcción y soporte estadístico del árbol filogenético

La reconstrucción filogenética del complejo *Pythium irregulare* s.l. se efectuó con base en las secuencias de los genes *cox I* y *cox II* empleando el método estadístico de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de Tamura 3-parámetros (T92). El soporte de cada rama se obtuvo por medio de un análisis *bootstrap* de 1000 repeticiones (parte superior de la rama) y mediante el cálculo de la probabilidad posterior con base en MCMC (parte inferior de la rama).

La topología del árbol consenso (Figura 27) reveló la formación de tres grupos principales (I, II y III) y el enraizamiento del árbol se realizó incluyendo como grupo externo (*outgroup*) a *Pythium aphanidermatum* (GenBank: KJ595344.1). El grupo I presentó un soporte *bootstrap* del 97.2% y una probabilidad posterior de 1 incluyendo 20 taxones, en el grupo II se juntaron 45 taxones con un soporte *bootstrap* del 82.1% y una probabilidad posterior de 1; y finalmente el grupo III se conformó de 21 taxones con un soporte *bootstrap* del 92.3% y una probabilidad posterior de 0.997. En los tres grupos se observó la presencia de politomías y pequeñas ramificaciones internas. Las secuencias de referencia de *P. cylindrosporium* (GenBank: GU071762.1) y la de *P. irregulare* s.s. (GenBank: GU071760.1) se agruparon en los grupos I y III, respectivamente. Las secuencias de referencia de *P. cryptoirregulare* (GenBank: GU071763.1 y AY907918.1) se colocaron en el grupo II.

El árbol consenso construido a partir de los genes *cox I* y *cox II* permitió diferenciar las tres especies del complejo *P. irregulare* e identificar cada aislado. No obstante, se evidenciaron incongruencias con los resultados del análisis de similitud de los genes *cox I* y *cox II*, y también con los obtenidos a partir de la región ITS; por lo cual se decidió realizar un análisis filogenético concatenando ambas regiones.

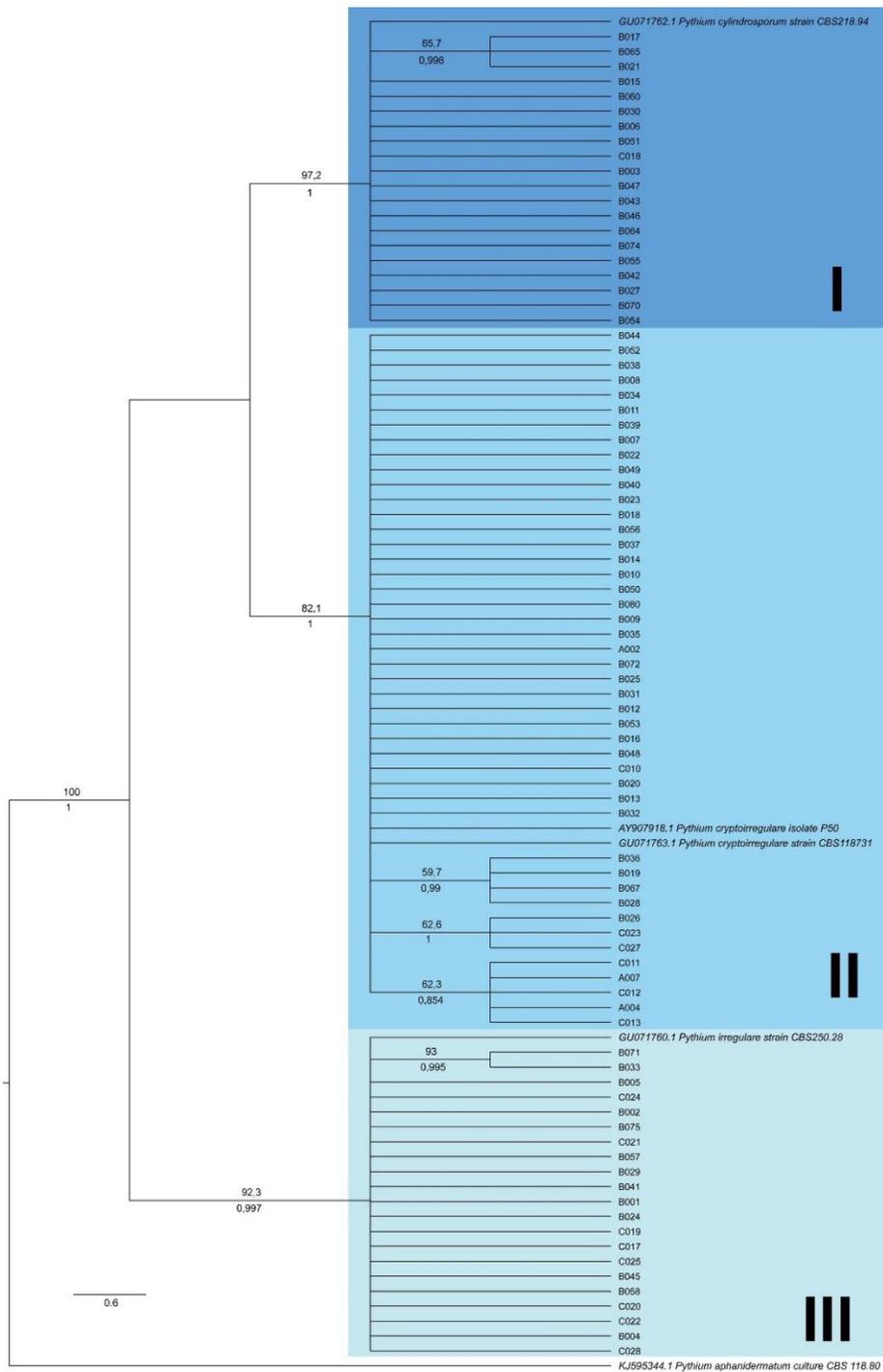


Figura 27. Árbol filogenético de *Pythium irregulare* s.l. generado a partir de secuencias de los genes *cox I* y *cox II* por medio del método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura 3-parámetros (T92) y empleando como grupo externo a *Pythium aphanidermatum*. El soporte bootstrap se muestra en la parte superior de los nodos y en la parte inferior se indica la probabilidad posterior.

3.4.3 Árbol filogenético concatenado (región ITS y genes *cox I* y *cox II*)

En vista de que los resultados obtenidos en el análisis de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II* fueron incongruentes para el complejo *Pythium irregulare*, se decidió construir un árbol concatenando ambas regiones y así diferenciar de mejor manera las especies dentro de este complejo. El árbol filogenético de ambas regiones se construyó mediante la herramienta RAxML, en el cual se subió un archivo FASTA concatenando ambas regiones y especificando para cada una el mejor modelo de sustitución de nucleótidos.

La topología del árbol inferido (Figura 28) mostró la formación de cuatro grupos principales, tres de los cuales (I, II y IV) abarcan a las secuencias de referencia de las especies pertenecientes al complejo *Pythium irregulare*; mientras que el grupo III contiene a posibles aislados híbridos que no se relacionaron con ninguna secuencia de referencia. El enraizamiento del árbol se realizó incluyendo como grupo externo (*outgroup*) a *Pythium aphanidermatum* (CBS: 118.80).

El grupo I presentó un soporte *bootstrap* del 86.1% y una probabilidad posterior de 0.99 y agrupó a 36 taxones y a las secuencias de referencia de *P. cryptoirregulare* (CBS 118731 y cepa P50). En el grupo II se encuentran 20 taxones y al aislado de referencia de *P. cylindrosporum* (CBS 218.94); este grupo presentó un soporte *bootstrap* del 85.6% y una probabilidad posterior de 1. El conjunto III abarca a nueve posibles aislados híbridos divididos en dos clados: A (soporte *bootstrap* del 51.3% y probabilidad posterior del 0.995) y B (soporte *bootstrap* del 64% y probabilidad posterior de 0.77). Finalmente, en el grupo IV se juntaron 21 taxones y el aislado de referencia para *P. irregulare* s.s. (CBS 250.28), con un soporte *bootstrap* del 90% y una probabilidad posterior de 1. En todos los grupos se evidenció la presencia de pequeñas ramificaciones internas y politomías.

3.5 Evaluación de la diversidad genética

El análisis de diversidad genética se realizó para el complejo *Pythium irregulare*, población predominante durante la investigación.

3.5.1 Composición nucleotídica y frecuencia de pares de nucleótidos

Las secuencias de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II* tuvieron una longitud promedio de 871 pb y 910 pb, respectivamente. La timina fue la base más frecuente en ambas regiones con 33.37% para la región ITS y un 40.23% para los genes *cox I* y *cox II*; seguida de la guanina con un 30.26% para la región ITS y un 36.96% para los genes *cox I* y *cox II* (Tabla 10).

Tabla 10

Resumen de la composición nucleotídica y longitud de las secuencias de la región ITS del complejo Pythium irregulare.

Nucleótidos	Región ITS	Región COX
T (%)	33.37	40.23
C (%)	18.38	9.03
A (%)	17.98	13.78
G (%)	30.26	36.96
Total (pb)	871	910

En el anexo D se detalla la longitud y composición de bases nucleotídicas de cada uno de los aislados analizados para ambas regiones (ITS y COX).

En la Tabla 11 se indican los valores de pares de nucleótidos idénticos, transversiones (sv), transiciones (si) y la relación transición/transversión ($R=si/sv$) tanto para la región ITS como para los genes *cox I* y *cox II*. Se identificó que ambas regiones presentan un elevado número de pares idénticos y un valor de R superior a 1.50.

Tabla 11

*Frecuencias de pares de nucleótidos, transversiones, transiciones y relación transición/transversión (R) para la región ITS y para los genes *cox I* y *cox II*.*

Parámetro	Región ITS	Región COX
	Frecuencia	Frecuencia
Pares idénticos	854	896
Transiciones (si)	10	4
Transversiones (sv)	4	3
R: si/sv	2.53	1.52

En la Tabla 12 se expone la frecuencia de pares de nucleótidos encontrados en las secuencias de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*. Se observó que ambas regiones presentaron valores concentrados en cuatro pares de nucleótidos (TT, AA, CC, GG) siendo TT la más frecuente seguida de GG para la región ITS y de AA para los genes *cox I* y *cox II*.

Tabla 12

*Dinucleótidos y su frecuencia en secuencias de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*.*

Dinucleótido	Región ITS	Región COX
	Frecuencia	Frecuencia
TT	284	360
TC	4	1
TA	1	1
TG	1	0
CT	3	1
CC	156	80
CA	0	0
CG	0	0
AT	0	1
AC	0	0
AA	154	332
AG	2	1
GT	1	0
GC	0	0
GA	1	1
GG	260	124

3.5.2 Estimación de los índices de diversidad genética

3.5.2.1 Poblaciones seleccionadas

Se realizaron dos análisis para la estimación de los índices de diversidad genética, el primero se ejecutó dividiendo a la población con base en el hospedero del patógeno, es decir, crisantemos y dalias. El segundo análisis se desarrolló tomando en consideración a las especies dentro del complejo *Pythium irregulare* (*P. irregulare* s.s., *P. cryptoirregulare* y *P. cylindrosporum*), exceptuando a los aislados híbridos.

Ambos análisis se realizaron tanto para la región ITS como para la región COX (genes *cox I* y *cox II*).

3.5.2.2 Parámetros de diversidad genética intrapoblacional e interpoblacional

En la Tabla 13, se muestran los parámetros de diversidad genética intrapoblacional e interpoblacional para cada región y de acuerdo al hospedero del complejo *P. irregulare*. Como se puede observar, el número de sitios segregantes y la diversidad de haplotipos fueron mayores en crisantemos para ambas regiones. La diversidad nucleotídica intrapoblacional encontrada en ambos *locus* fue similar, sin embargo, se hallaron diferencias significativas entre los haplotipos de cada población tanto para la región ITS (p-valor = 0.0018) como para la región COX (p-valor = 0.0241) con base en el parámetro estadístico chi-cuadrado (χ^2). Finalmente, para la región ITS se evidenció diferenciación genética elevada ($F_{ST} = 0.163$) y posibilidad de flujo génico entre poblaciones ($Nm = 1.28$); mientras tanto, para la región COX se calculó una diferenciación genética baja ($F_{ST} = 0.019$) y un elevado flujo génico interpoblacional ($Nm = 26.24$).

Tabla 13

Estimadores de diversidad genética intra e interpoblacional de la región ITS y de los genes cox I y cox II (región COX) de Pythium irregulare s.l. aislado de crisantemos y dalias.

Parámetro	Región ITS		Región COX	
	Crisantemos	Dalias	Crisantemos	Dalias
Número de secuencias	28	58	28	58
Número de sitios (sin gaps)	860	860	864	864
Número de sitios segregantes, S	74	45	20	19
Diversidad nucleotídica, π	0.022	0.011	0.008	0.007
Número de haplotipos, h	17	10	10	9
Diversidad de haplotipos, H_d	0.937	0.606	0.852	0.691
Estimadores de diferenciación genética				
Chi-cuadrado, χ^2	46.30		22.04	
p-valor	0.0018**		0.0241*	
Estimadores de flujo genético				
F_{ST}	0.163		0.019	
Nm	1.28		26.24	

F_{ST} : Coeficiente de hibridación interpoblacional. Nm: estimador de flujo genético calculado a partir de F_{ST} .

En la Tabla 14, se exponen los estimadores de diversidad genética intra e interpoblacional para cada región en función a las especies comprendidas dentro del complejo *P. irregulare*. Para la región ITS se observó que el número de sitios segregantes y la diversidad de haplotipos fue similar entre *P. irregulare* s.s y *P. cryptoirregulare*; sin embargo, *P. cylindrosporum* presentó un mayor número de sitios segregantes y una menor diversidad de haplotipos. Respecto a la región COX, las tres poblaciones presentaron valores similares para todos los estimadores de diversidad genética intrapoblacional estudiados. Con base en el estadístico chi-cuadrado (χ^2) se obtuvieron diferencias significativas entre haplotipos de cada población tanto para la región ITS (p-valor = 1×10^{-5}) como para la región COX (p-valor = 1×10^{-5}). Por último, los estimadores de flujo genético mostraron una diferenciación genética elevada ($F_{ST} > 0.900$) y una muy baja posibilidad de flujo genético interpoblacional ($Nm < 0.05$) para ambas regiones.

Tabla 14

*Estimadores de diversidad genética intra e interpoblacional de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II* (región COX) de las especies pertenecientes al complejo *Pythium irregulare*.*

Parámetro	Región ITS			Región COX		
	PI	PC	PCY	PI	PC	PCY
Número de secuencias	21	36	20	21	36	20
Número de sitios (sin gaps)	863	863	863	864	864	864
Número de sitios segregantes, S	7	4	11	2	2	1
Diversidad nucleotídica, π	0.002	0.001	0.001	3×10^{-4}	3×10^{-4}	3×10^{-4}
Número de haplotipos, h	6	8	2	3	3	2
Diversidad de haplotipos, H_d	0.652	0.598	0.100	0.267	0.208	0.268
Estimadores de diferenciación genética						
Chi-cuadrado, χ^2	92.94			154.0		
p-valor	$1 \times 10^{-5***}$			$1 \times 10^{-5***}$		
Estimadores de flujo genético						
F_{ST}	0.932			0.974		
Nm	0.02			0.01		

PI: *Pythium irregulare* s.s. PC: *Pythium cryptoirregulare*. PCY: *Pythium cylindrosporium*. F_{ST} : Coeficiente de hibridación interpoblacional. Nm: estimador de flujo genético calculado a partir de F_{ST} .

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Los oomicetos tienen una gran importancia en la investigación y la industria, debido a sus interacciones mutualistas y parasitarias con una amplia variedad de plantas. Constituyen uno de los principales grupos de fitopatógenos ya que ocasiona incalculables pérdidas económicas en cultivos ornamentales, alimenticios y silvestres. A pesar de su importancia, se conoce muy poco de su historia evolutiva, principalmente por la morfología convergente de sus especies, falta de registros fósiles y elevada diversidad inter e intraespecífica (Bruns et al., 1991; Derevnina et al., 2016).

El género *Pythium* es un género de oomicetos con la habilidad de infectar rápidamente un amplio rango de hospederos generando pérdidas en cultivos de múltiples ecosistemas (Agrios, 2005). Al no ser todas las especies de *Pythium* patógenas, su identificación dentro de un cultivo es necesaria ya que conforme a esto se establecen planes de manejo adecuados y se reducen gastos innecesarios en fungicidas y metodologías de control (Garzón et al., 2005).

La identificación de especies del género *Pythium* es un punto clave dentro de la fitopatología debido a que con ello se puede entender y controlar la enfermedad, y también estimar posibles pérdidas dentro de un sistema de producción. De manera tradicional, la identificación se realiza mediante características morfológicas de sus estructuras reproductivas, sin embargo, esta técnica es lenta y depende de la experiencia y habilidad del personal encargado (McCartney et al., 2003; Choi et al., 2015). Además muchas características morfológicas se superponen o son diferentes dentro de una misma especie; resultado de procesos de hibridación, especies crípticas y evolución convergente (Matsumoto et al., 1999; Martin, 2000; Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017).

Con los avances de la tecnología y herramientas bioinformáticas, el uso de métodos basados en ácidos nucleicos para la identificación, filogenia, sistemática, diversidad genética y estudios de genética poblacional del género *Pythium* se han extendido rápidamente (Martin & Loper, 1999; Martin, 2000; W.A.M De Cock & Lévesque, 2004; Hyde, Nilsson, Alias, & Ariyawansa, 2014; Weiland et al., 2015; Huzar-Novakowski & Dorrance, 2018). Uno de los métodos más utilizados en la actualidad por su rapidez, sensibilidad, especificidad y reproductibilidad es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una técnica aplicable a cualquier segmento del genoma y útil para estudios comparativos grandes. Dado que permite la amplificación de ambas cadenas del ADN, el error es mínimo y se ha utilizado como punto de partida para la secuenciación del ADN (Bruns et al., 1991).

La extracción de ADN es el primer paso para la caracterización molecular y su rendimiento depende del protocolo empleado y del tipo y cantidad de muestra procesada (McCartney et al., 2003). En la presente investigación se empleó el protocolo de extracción CTAB, obteniéndose concentraciones de ADN entre los 70 y 4900 ng/ μ L, y una pureza promedio de 1.73 (determinada como la relación de absorbancias a 260 y 280 nm). Según White et al. (1990), para el desarrollo de una PCR y secuenciación de sus productos resultantes se requiere una concentración mínima de ADN de 10 ng/ μ L y una relación de absorbancias 260/280 entre 1.7 y 2. En todas las muestras procesadas se logró extraer la concentración recomendada de ADN; sin embargo, algunas muestras presentaron una relación de absorbancias 260/280 inferiores a 1.7 y superiores a 2, a pesar de lo cual, la PCR se efectuó sin problemas.

Según Bruns et al. (1991), el análisis de secuencias de ADN tiene un poder de resolución elevado por el número de caracteres que intervienen y también impulsa la colaboración entre

investigadores para la actualización constante de bases de datos. El mismo autor recomienda secuenciar regiones de ADN con un ritmo evolutivo apropiado para la diferenciación de taxones en grupos monofiléticos, regiones de única copia o que evolucionen de esa manera (ADN nuclear o ADN mitocondrial) y que la región estudiada presente la misma función en todos los taxones estudiados.

Múltiples estudios filogenéticos y de diversidad genética del género *Pythium* se han enfocado en la amplificación de segmentos del ADNr debido a la presencia de segmentos codificantes y no codificantes. Las regiones codificantes (genes *28S*, *5.8S* y *18S*) denotan una evolución lenta y permiten la diferenciación de organismos distantes. Mientras que las regiones no codificantes (ITS-espaciador transcrito interno e IGS-espaciador intergénico ribosomal) tienen una evolución rápida que facilita la identificación de aislados a nivel de especie o complejo (White et al., 1990; Matsumoto et al., 1999; Raja et al., 2017). Por esta razón, en el presente proyecto se amplificó y secuenció la región ITS del ADNr para efectuar la identificación de las especies del género *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos y dalias.

La amplificación y secuenciación de la región ITS se llevó a cabo empleando los primers ITS4 e ITS5 y obteniéndose secuencias cuyo tamaño promedio fue de 871 pb. El número de pares de bases observado para cada aislado se encontró dentro del rango descrito para las especies de *Pythium* por W.A.M De Cock & Lévesque (2004), el cual oscila entre 750 y 1050 pb.

La comparación de secuencias con una base de datos por medio de la herramienta BLAST es la mejor aproximación para la identificación de un aislado a nivel de especie. Durante este proceso se debe tomar en cuenta que el porcentaje de identidad sea superior al 98% y el porcentaje de cobertura superior al 70% (Schroeder et al., 2013).

El análisis de similitud de 116 secuencias de la región ITS permitió identificar ocho especies del género *Pythium* distribuidas entre crisantemos y dalias; siendo la de mayor abundancia *P. irregulare* s.l. (74.14%) seguida de *P. aphanidermatum* (9.48%). Esta distribución se corrobora con estudios previos realizados en la misma zona de muestreo por Garzón et al. (2005), Lee, Garzón & Moorman (2010), Proaño (2014) y Weiland et al. (2015); y se explica por el ciclo de vida y patogenicidad de ambas especies. *Pythium irregulare* s.l. es la más frecuente debido a que es un patógeno no muy agresivo y sus síntomas no son visibles con rapidez (a diferencia de *P. aphanidermatum* y *P. ultimum*; especies altamente agresivas), lo cual le permite permanecer más tiempo en la zona de cultivo y diseminarse con mayor facilidad a través de sistemas de riego o por instrumentos de jardinería (Daughtrey & Benson, 2005; Garzón et al., 2005).

En dalias se encontraron especies únicamente pertenecientes al complejo *P. irregulare* y en crisantemos se halló una variedad de ocho especies. La diferencia existente es explicada por Martin & Loper (1999) y Daughtrey & Benson (2005), quienes afirman que al ser las dalias una planta de cultivo en el interior del invernadero tiene un mejor control en parámetros ambientales y en el volumen de riego; a diferencia de los crisantemos los cuales se cultivan al exterior del invernadero, exponiéndolos a un mayor contacto con el ambiente, agua y temperaturas variables.

En el presente estudio, el análisis de similitud de la región ITS no permitió diferenciar a las especies dentro del complejo *P. irregulare* (*P. cryptoirregulare*, *P. cylindrosporum* y *P. irregulare* s.s.). Esto se debe a que las secuencias de la región ITS de especies evolutivamente cercanas tienen muy poca variabilidad y se requiere dos o más *loci* para alcanzar una conclusión más cercana a la realidad (Spies et al., 2011; Schroeder et al., 2013).

En vista de la falta de resolución de la región ITS para diferenciar las especies dentro del complejo *P. irregulare*, se optó por amplificar y secuenciar los genes mitocondriales *cox I* y *cox II*. Los genes mitocondriales a diferencia de los nucleares, poseen un genoma haploide, una evolución más rápida, acumulan mutaciones durante su evolución y tienen una mayor resolución para la diferenciación de especies evolutivamente cercanas; razones por las cuales han sido empleados para complementar a la región ITS en estudios filogenéticos y de genética poblacional (White et al., 1990; Kageyama et al., 2005; Robideau et al., 2011; Schroeder et al., 2013).

Por medio de los primers FM35 y FM52 se amplificó y secuenció la región COX (porción del gen *cox II* y *cox I*, y el espaciador intergénico) de 86 aislados, obteniéndose una longitud promedio de secuencias de 910 pb, tamaño corroborado por Martin (2000).

A través del análisis de similitud de las secuencias de la región COX se dividió al complejo *P. irregulare* en: *P. cryptoirregulare* (72.09%) y en *P. irregulare* s.s. (27.91%), siendo *P. cryptoirregulare* la de mayor abundancia tanto en crisantemos como en dalias. Sin embargo, estos resultados fueron concluyentes únicamente para los aislados identificados como *P. irregulare* s.s., ya que dentro de la base de datos del NCBI no se hallan secuencias de los genes *cox I* y *cox II* juntas, únicamente se encuentran por separado tanto para *P. cryptoirregulare* como para *P. cylindrosporum*; dificultando la identificación de ambas especies. Como lo menciona Schroeder et al. (2013), una de las principales desventajas del análisis de similitudes la disponibilidad de información y secuencias dentro de la base de datos del NCBI.

Teniendo una idea de la diversidad de especies del género *Pythium* en crisantemos y dalias, se procedió a reconstruir su filogenia la cual parte de un alineamiento múltiple de las secuencias de una región determinada. El alineamiento múltiple es un paso crítico en un análisis filogenético

ya que se establecen las correspondencias posicionales en la evolución. De manera general, un buen alineamiento genera inferencias filogenéticas más cercanas a la realidad (Sutton, 2008; Proaño, 2014).

En el presente estudio, el alineamiento múltiple tanto de las secuencias de la región ITS como de la región COX se realizó empleando el algoritmo ClustalW. Este algoritmo aplica un método progresivo y tiene una elevada velocidad, sensibilidad y precisión al trabajar con conjuntos de datos de pequeño a mediano tamaño (hasta 250 secuencias). Es el algoritmo más utilizado en investigaciones filogenéticas ya que no requiere un elevado poder computacional y sus resultados son similares a algoritmos más avanzados (Sutton, 2008; Sviatopolk, Ruy, Oliveira, & Coimbra, 2014).

El alineamiento de la región ITS abarcó 925 caracteres de los cuales 279 fueron conservados, 639 variables y 527 mostraron parsimonia informativa; adicionalmente, el alineamiento tuvo una gran cantidad de gaps. Por otro lado, el alineamiento de la región COX no evidenció la presencia de gaps, abarcó 866 caracteres de los cuales 801 fueron conservados, 63 variables y 18 presentaron parsimonia informativa. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Garzón et al. (2005) y Villa et al. (2006), en cuanto a la cantidad de sitios con parsimonia informativa y al número de gaps en cada alineamiento.

La diferencia del número de gaps observados en cada alineamiento se debe a que los genes codificantes (genes *cox I* y *cox II*) son más conservados y cualquier inserción o delección (representadas con gaps) pueden alterar totalmente el marco de lectura (Bruns et al., 1991). Por otro lado, el elevado número de sitios con parsimonia informativa en el alineamiento de la región ITS, es explicado ya que se analizaron secuencias de diferentes especies del género *Pythium* y se

conoce la elevada diversidad interespecífica de *Pythium* spp. (Martin & Loper, 1999; Martin, 2000).

Según Raja et al. (2017), la reconstrucción filogenética de un conjunto de organismos se puede aplicar para el entendimiento de la historia evolutiva y las relaciones existentes entre cada especie; y también para la identificación de organismos a nivel de especie, incluso de aquellas evolutivamente cercanas. Se considera que la relación filogenética de una región del genoma explica de manera confiable la filogenia de un conjunto de organismos, no obstante, se suele confirmar empleando más de una región sin relación funcional o física entre ellas (Bruns et al., 1991). Durante la realización del presente proyecto, se reconstruyó la filogenia del género *Pythium* con base en las secuencias de la región ITS y en adición se reconstruyó la filogenia del complejo *Pythium irregulare* en función de los genes *cox I* y *cox II*; con el objetivo de confirmar la identidad de cada aislado y descubrir las relaciones filogenéticas existentes entre ellos.

La topología del árbol filogenético construido con base en la región ITS mostró la formación de diez grupos monofiléticos, corroborando lo descrito por Uzuhashi, Tojo, & Kakishima (2010), quienes afirman que la taxonomía de *Pythium* se compone en su mayoría por grupos de ese tipo.

La distribución de las especies dentro del árbol filogenético construido a partir de secuencias de la región ITS es similar a la descrita por W.A.M De Cock & Lévesque (2004), Kageyama et al. (2005), Villa et al. (2006), Uzuhashi et al. (2010) y Hyde (2014); y con base en ello se pudo asignar a cada grupo un clado específico; es así que los grupos I, II, III y IV pertenecen al clado F; los grupos V y VI al clado E; el grupo VII al clado I; los grupos VIII y IX al clado B y el grupo X al clado A. Adicionalmente, la formación de cada clado fue congruente con la

morfología del esporangio (filamentoso o globular) de las especies que lo conforman, considerándose como el ancestro del género *Pythium* a una especie con esporangio globular (W.A.M De Cock & Lévesque, 2004; Kageyama et al., 2005; Robideau et al., 2011). Se concluyó que únicamente las especies pertenecientes a los clados A y B tienen un esporangio filamentoso y los demás un esporangio globular.

La reconstrucción filogenética de *Pythium* en función de la región ITS permitió identificar a nivel de especie a cada aislado con excepción de los pertenecientes al complejo *P. irregulare* y conocer la morfología de su esporangio sin realizar una observación microscópica. Como se observa, el grupo II y III comparten secuencias de referencia de diferentes cepas de *P. cryptoirregulare* dificultando su identificación. La dificultad en identificar las especies de *P. irregulare* s.l., se debe a su elevada diversidad intraespecífica, tanto genotípica como fenotípica, razón por la cual se requiere el análisis de un segundo gen con mayor tasa de evolución, por ejemplo, los genes *cox I* y *cox II* (Garzón et al., 2005; Spies et al., 2011; Huzar-Novakowski & Dorrance, 2018).

La reconstrucción filogenética del complejo *P. irregulare* se realizó empleando las secuencias de los genes *cox I* y *cox II*, consiguiéndose la formación de tres grupos. Este resultado fue similar al alcanzado por Garzón et al. (2005) y Proaño (2014), quienes observaron la formación de tres grupos significativos, cada uno representante de una especie del complejo *P. irregulare*. A diferencia del resultado obtenido en el análisis filogenético de la región ITS, éste árbol agrupó a ambas cepas de *P. cryptoirregulare* facilitando la identificación de cada aislado.

Si bien el análisis filogenético de ambas regiones por separado permitió obtener una identificación confiable de las especies del complejo *Pythium irregulare*; se decidió realizar un

análisis filogenético concatenando las regiones ITS y COX. El análisis multigénico provee una mejor estadística, mayor precisión filogenética, y mayor resolución que el análisis de genes individuales (Gadagkar, Rosenberg, & Sudhir, 2005).

La topología del árbol concatenado fue similar a la obtenida a partir del análisis de los genes *cox I* y *cox II*; sin embargo, se observó la formación de cuatro grupos. El grupo III en este caso abarcó nueve posibles especies híbridas catalogadas de esa manera al no agruparse con ninguna secuencia de referencia, presentar agrupaciones discordantes en los árboles filogenéticos previos y durante los análisis de similitud para ambas regiones. La formación de híbridos dentro del complejo *P. irregulare* se ha descrito en investigaciones previas y ocurre debido a la habilidad de las especies de *P. irregulare* s.l. de cruzarse con otras cepas a pesar de tener una reproducción principalmente homotálica (Villa et al., 2006; Schroeder et al., 2013; Huzar-Novakowski & Dorrance, 2018).

Los tres árboles filogenéticos obtenidos en el actual proyecto se construyeron empleando el método de máxima verosimilitud y el método de inferencia bayesiana, a partir de los cuales se obtuvieron los valores de soporte bootstrap y probabilidades posteriores, respectivamente. La topología de los árboles fue la misma sin importar la metodología empleada, lo cual es comprobado por Bruns et al. (1991), quien asevera que todos los métodos de reconstrucción filogenética generan los mismos resultados siempre y cuando el tamaño de los datos sea informativo. Por otro lado, los valores de soporte bootstrap y probabilidades posteriores en la mayoría de las ramas de los tres árboles fueron superiores al 70% y al 95%, respectivamente; indicando una buena robustez estadística (Raja et al., 2017). En todos los casos el soporte bootstrap fue inferior a la probabilidad posterior, lo cual es confirmado por Douady et al. (2003), quien menciona que la probabilidad

posterior y el soporte bootstrap son parámetros que representan variables diferentes por lo cual no deben ser comparados entre ellos; sin embargo, se complementan para tomar una decisión.

Los análisis filogenéticos individuales y concatenados mostraron la formación de politomías, principalmente dentro del complejo *P. irregulare*. Una politomía hace referencia a nodos con más de dos progenies descendientes y puede deberse a la falta de conocimiento, a eventos de especiación rápida o al tipo de reproducción existente dentro del género *Pythium* (Cañizares & Blanca, 2013). La explicación más probable aplicable a este estudio es aquella que involucra la reproducción homotálica (sexual o asexual) del género *Pythium*, en donde una misma cepa se auto fecunda y genera progenie con genética idéntica al parental, fijando de forma aleatoria los *loci* heterocigotos en cada generación. Se estima que el 95% de las especies de *Pythium* descritas hasta la actualidad son homotálicas (Wright, 1949; Martin, 2000; A. Lévesque & W.A.M De Cock, 2004; Garzón et al., 2005).

Una vez reconstruida la filogenia de las especies del género *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos y dalias; se procedió a evaluar la diversidad genética a partir de secuencias de ADN de la población predominante, el complejo *P. irregulare*. El análisis de la diversidad genética (a partir de alelos, genotipos o secuencias de nucleótidos) es el punto de partida para realizar estudios de genética poblacional, por lo general se analizan genes nucleares y mitocondriales (Huzar-Novakowiski & Dorrance, 2018). Poder establecer la estructura de una población es de gran importancia en la fitopatología ya que se puede analizar el desarrollo de nuevas cepas o estudiar la resistencia a diferentes fungicidas (Bruns et al., 1991).

Según Xu (2006), los parámetros más utilizados para la estimación de la diversidad genética intrapoblacional a nivel de secuencias son: el número y diversidad de haplotipos, la diversidad de

nucleótidos y el número de sitios segregantes. Por otro lado, la estimación de la diversidad genética interpoblacional se obtiene al comparar mediante análisis estadísticos los parámetros antes mencionados. Hudson et al. (1992), mencionó que el estadístico chi-cuadrado (χ^2) es el método tradicional para establecer la diferenciación genética entre dos o más poblaciones; es decir, la homogeneidad entre un determinado número de poblaciones en función del número de haplotipos de cada una.

La población de *P. irregulare* s.l. en crisantemos es significativamente diferente (nivel de confianza del 95%) en términos de diversidad genética para ITS y COX respecto a la población presente en dalias. Esta diferenciación se corroboró por el estadístico chi-cuadrado obteniéndose un p-valor de 0.0018 para la región ITS y un p-valor de 0.0241 para la región COX. Por otro lado, se observó que *P. irregulare* s.s., *P. cryptoirregulare* y *P. cylindrosporium*; tienen una diversidad intraespecífica similar, sin embargo, al compararlos son significativamente diferentes para ambas regiones (p-valor 1×10^{-5}).

La diferencia existente intra e interpoblacional se explica por selección natural, eventos de migración recientes, mutaciones aleatorias y procesos de deriva génica (Tajima, 1983; Fumagalli, Vieira, Linderoth, Albrechtsen, & Nielsen, 2013). De forma particular, las diferencias encontradas dentro del complejo *P. irregulare* se corroboran con la elevada diversidad génica del complejo reportada por Garzón et al. (2005) y Huzar-Novakowiski & Dorrance (2018).

Finalmente, la estimación de la estructura poblacional se realizó mediante el cálculo del coeficiente de hibridación (F_{ST}) y el flujo génico (Nm). La estructura poblacional permite cuantificar la subdivisión de una población, por lo general empleando el estadístico F_{ST} , el cual oscila entre 0 y 1, y mide la desviación de la homogeneidad en una población o la variación de la

frecuencia genética entre poblaciones. Mientras mayor sea el F_{ST} , mayor divergencia existe entre poblaciones (Wright, 1949; Nei, 1973; Xu, 2006; Fumagalli et al., 2013). El N_m es un valor estimado a partir del F_{ST} por medio de un modelo de isla (modelo sencillo que acepta muchas suposiciones) y difiere su cálculo entre genomas diploides y haploide. El N_m reportado en el presente proyecto es únicamente una aproximación de la realidad debido a las suposiciones asumidas durante su cálculo (Wright, 1949; Xu, 2006).

Durante la comparación de *P. irregulare* s.l. entre crisantemos y dalias, se obtuvo un F_{ST} de 0.163 y 0.019, para ITS y COX, respectivamente. Mientras que los valores de N_m fueron de 1.28 y 26.24 para ITS y COX, respectivamente. Los resultados alcanzados para la región ITS muestran la posibilidad de flujo génico entre poblaciones y una estructura poblacional elevada. Sin embargo, para la región COX, el flujo génico es altamente probable y la estructura poblacional casi nula. Los valores obtenidos son similares a aquellos establecidos por Garzón et al. (2005), Weiland et al. (2015) y Huzar-Novakowski & Dorrance (2018).

La diferencia obtenida entre las regiones ITS y COX se debe a que los genes nucleares y mitocondriales tienen un diferente patrón de herencia y se ven sometidos a distintas fuerzas de selección. Los genes mitocondriales al ser heredados sin recombinación muestran un mayor flujo génico y una reducida estructura poblacional (Tajima, 1983; Huzar-Novakowski & Dorrance, 2018).

Por último, al comparar las especies dentro del complejo *P. irregulare*, se obtuvieron valores de F_{ST} superiores a 0.9 y N_m cercanos a 0, para ambas regiones. Los valores de F_{ST} cercanos a uno indican una estructura poblacional muy fuerte, confirmando que las especies dentro del complejo *P. irregulare* son diferentes. En cuanto al flujo génico cercano a cero, se considera a las

poblaciones en aislamiento genético y cualquier diversidad existente ocurre únicamente por procesos de deriva génica (Garzón et al., 2005; Proaño, 2014; Weiland et al., 2015).

En conclusión, esta investigación permitió estudiar la diversidad génica de especies del género *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos y dalias mediante la secuenciación de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*. El análisis combinado de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II* permitió la identificación a nivel de especie y complejo de los aislados analizados. Por otro lado, la reconstrucción filogenética obtenida a partir de la región ITS mostró una topología fundamentada en la morfología del esporangio de las especies de *Pythium* y se estableció mediante observación de la topología del árbol que el ancestro presentaba un esporangio globular. Sin embargo, es necesario complementar y confirmar la reconstrucción filogenética mediante el análisis de una segunda región, particularmente para el complejo *P. irregulare*.

En cuanto a la diversidad génica del complejo *P. irregulare* entre crisantemos y dalias, se observó una diferencia significativa entre ambas poblaciones y una estructura poblacional alta con posibilidad de flujo génico entre poblaciones, tanto para la región ITS como para la región COX. Al comparar las especies dentro del complejo *P. irregulare*, se obtuvo una estructura poblacional extremadamente alta, confirmando que tanto *P. irregulare* s.s., *P. cryptoirregulare* y *P. cylindrosporum* son especies diferentes con aislamiento génico entre ellas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. La amplificación y secuenciación de la región ITS y de los genes *cox I* y *cox II*, permitieron identificar las especies de *Pythium* asociadas a enfermedades de raíz de crisantemos y dalias; siendo el complejo *P. irregulare* el más común en dichos cultivos con un 74.14%, seguido de *P. aphanidermatum* con un 9.48%. Dentro del complejo *P. irregulare*, la especie con mayor prevalencia fue *P. cryptoirregulare* con un 41.86%.
2. La diversidad de especies de *Pythium* en crisantemos fue mayor al encontrarse ocho especies diferentes, mientras que en dalias se encontraron únicamente especies pertenecientes al complejo *P. irregulare*, negando la hipótesis planteada en el presente proyecto.
3. La reconstrucción filogenética del género *Pythium* con base en la región ITS mostró la formación de diez grupos monofiléticos, los cuales se agruparon en clados de acuerdo a la morfología del esporangio (filamentoso o globular). Únicamente *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum* y *P. dissotocum* presentan esporangio filamentoso y se demostró mediante observación de la topología del árbol que el ancestro en común del género *Pythium* tenía un esporangio globular.
4. El análisis de similitud y la reconstrucción filogenética de la región ITS no permitieron clasificar a los aislados dentro del complejo *P. irregulare*; por lo cual, se optó por analizar los genes *cox I* y *cox II*.
5. El análisis de similitud de los genes *cox I* y *cox II*, arrojó resultados no concluyentes debido a la falta de información sobre *P. cryptoirregulare* y *P. cylindrosporum* en la base de datos del NCBI.

6. La reconstrucción filogenética de los genes *cox I* y *cox II* del complejo *P. irregulare* mostró la formación de tres grupos, cada uno correspondiente a *P. irregulare* s.s., *P. cryptoirregulare* y *P. cylindrosporum*.
7. La construcción de un árbol concatenado de ambas regiones (ITS y COX), permitió una identificación confiable de los aislados dentro del complejo *P. irregulare* y también indicó la posible existencia de híbridos.
8. La población de *P. irregulare* s.l. en crisantemos y dalias es diferente estadísticamente en función de sus haplotipos, obteniéndose un p-valor de 0.0018 y 0.0241 para la región ITS y para la región COX, respectivamente.
9. Los haplotipos de las especies que conforman a *P. irregulare* s.l. son estadísticamente diferentes entre sí para ambas regiones, obteniéndose un p-valor de 1×10^{-5} .
10. El análisis de diversidad génica del complejo *P. irregulare* en función de la región ITS y de la región COX, mostró una estructura poblacional alta y una posibilidad de flujo génico entre poblaciones de dalias y crisantemos.
11. El análisis de diversidad génica entre las especies pertenecientes al complejo *P. irregulare* mostró una estructura poblacional extremadamente alta y un aislamiento génico entre poblaciones, lo cual confirma que dichas especies son diferentes entre sí.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

1. Generar alineamientos con otros algoritmos para verificar la topología de los árboles generados en el presente trabajo.
2. Reconstruir la filogenia del complejo *P. irregulare* incluyendo una tercera región, preferentemente codificante (por ejemplo el gen de la β -tubulina o el factor de elongación 1-alfa) para aumentar la resolución del análisis.
3. Emplear secuencias de referencia curadas y secuencias tipo para evitar resultados incongruentes durante la reconstrucción filogenética del género *Pythium*.
4. Confirmar los resultados referentes a especies híbridas, diversidad génica, estructura poblacional y flujo génico mediante la aplicación de marcadores moleculares como repeticiones de simple nucleótido (SSR) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).
5. Validar la metodología empleada en el presente proyecto con aislados del género *Pythium* obtenidos en Ecuador a partir de diferentes plantaciones florícolas u ornamentales; con el objetivo de incrementar el conocimiento evolutivo y aportar a la generación de planes de manejo y control fitopatógico.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, Z., & Coffey, M. (2008). Development of a morphological/phylogenetic lucid key for the identification of Oomycetes: *Phytophthora*. *International Congress of Plant Pathology*, 20.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Florida: Elsevier Academic.
- Al-Sa'di, A. M., Drenth, A., Deadman, M. L., W.A.M De Cock, A., & Aitken, E. A. B. (2007). Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology*, 56, 140–149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01501.x>
- Andersson, J. (2006). Convergent Evolution: Gene Sharing by Eukaryotic Pathogens. *Current Biology*, 16(18), R804–R806. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.042>
- Bala, K., Robideau, G. P., Desaulniers, N., W.A.M De Cock, A., & Lévesque, C. A. (2010). Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia*, (25), 22–31.
- Belbahri, L., McLeod, A., Paul, B., Calmin, G., Moralejo, E., Spies, C., ... Lefort, F. (2008). Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (Pythiaceae). *FEMS Microbiol Lett*, 284, 17–27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01168.x>
- Bogash, S., Ford, T., Kime, L., & Harper, J. (2012). Agricultural Alternatives: Cut-Flower Production. *The Pennsylvania State University*, 1–8.
- Boudjeko, T., Andeme-Onzighi, C., Vicré, M., Balangé, A., Ndoumou, D., & Driouich, A. (2006).

Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta*, 223(2), 271–282. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0090-2>

British Dahlia Organization. (2012). Dahlia diseases and what to look for. Retrieved May 18, 2019, from http://www.dahlias.co.uk/dahlia_care/diseases.php

Bruns, T. D., White, T. J., & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 22, 525–564.

Cabrera, M., Alvarez, R., Sosa de Castro, N., & Sosa, A. (2004). Patógenos de *Chrysanthemum* sp. en cultivos de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 1–4. Retrieved from <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/5-Agrarias/A-028.pdf>

Campion, C., Massiot, P., & Rouxel, F. (1997). Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *European Journal of Plant Pathology*, 103(8), 725–735. <https://doi.org/10.1023/A:1008657319518>

Cañizares, J., & Blanca, J. (2013). Ensamblaje y mapeo de secuencias tipo Sanger.

Capote, N., Pastrana, A. M., Torres, P., & Aguado, A. (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. In C. Cumagun (Ed.), *Plant Pathology* (1st ed., p. 362). China: INTECH.

Choi, Y., Beakes, G., Glockling, S., Kruse, J., Nam, B., Nigrelli, L., ... Thines, M. (2015). Towards a universal barcode of oomycetes – a comparison of the *cox1* and *cox2* loci. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1275–1288. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12398>

- Contreras, A., Cuevas, C., Goyenechea, I., & Iturbe, U. (2007). *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad*. México: Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo.
- Cook, K., Hudspeth, M., & Hudspeth, D. (2001). A cox2 phylogeny of representative marine peronosporomycetes (Oomycetes). *Nova Hedwigia, Beiheft*, (122), 231–243.
- Cornell University. (2003). *Genetic diversity analysis with molecular marker data: Learning Module*. Cornell University.
- Crawford, A. R., Bassam, B. J., Drenth, A., Maclean, D. J., & Irwin, J. A. G. (1996). Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. *Mycological Research*, 100(4), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80140-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80140-7)
- Daughtrey, M., & Benson, M. (2005). Principles of plant health management for ornamental plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43(10), 141–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140007>
- Davidse, L., Looijen, D., Turkensteen, L., & van der Wal, D. (1981). Occurrence of metalaxyl-resistance strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherland Journal of Plant Pathology*, 87, 65–68.
- Del Castillo-Munera, J. (2015). *Characterization, population genetics and management of Pythium spp. from floriculture crops in michigan*. Michigan State University.
- Derevnina, L., Petre, B., Kellner, R., Dagdas, Y. F., Sarowar, M. N., Giannakopoulou, A., ... Kamoun, S. (2016). Emerging oomycete threats to plants and animals. *Philosophical Transactions B*, 8(371), 1–9.

- Douady, C. J., Boucher, Y., Doolittle, W. F., & Douzery, E. J. P. (2003). Comparison of Bayesian and Maximum Likelihood Bootstrap Measures of Phylogenetic Reliability. *Molecular Biology and Evolution*, 20(2), 248–254. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg042>
- Dutillh, E., & Kesmir, C. (2017). *Bioinformatic Data Analysis* (Primera). Utrecht: Universidad de Utrecht.
- Dyer, M. (2018). Dahlia Flower Diseases: Learn About Dahlia Disease Treatment. Retrieved May 18, 2019, from <https://www.gardeningknowhow.com/ornamental/bulbs/dahlia/dahlia-flower-diseases.htm>
- Elad, Y., Lifshitz, R., & Baker, R. (1985). Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non- host fungi. *Physiological Plant Pathology*, 27(2), 131–148. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(85\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(85)90062-1)
- Elsadek, M. . (2018). Improvement Yield and Quality of Dahlia Flowers by Exogenous Application of Gibberellic Acid and Salicylic Acid under Sandy Soil Conditions. *J. Plant Production*, 9(3), 289–297.
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide* (2nd ed.). Minnesota: APS. Press.
- Feng, X., Wang, Y., & Gong, X. (2014). Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers. *BMC Plant Biology*, (14), 1–16.
- Fry, W. (1982). *Principles of Plant Disease Management* (1st ed.). New York: Academic Press.

- Fumagalli, M., Vieira, F. G., Linderoth, T., Albrechtsen, A., & Nielsen, R. (2013). Quantifying Population Genetic Differentiation from Next-Generation Sequencing Data. *Genetics Society of America, 195*(November), 979–992. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.154740>
- Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., & Sudhir, K. (2005). Inferring Species Phylogenies From Multiple Genes: Concatenated Sequence Tree Versus Consensus Gene Tree. *Journal of Experimental Zoology, 74*(July), 64–74. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21026>
- Garzón, C. D., Geiser, D. M., & Moorman, G. W. (2005). Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Internal Transcribed Spacer and *cox II* Sequences Reveal a Species Boundary Within *Pythium irregulare*. *The American Phytopathological Society, 95*(12), 1489–1498. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1489>
- Gilman, J. (1963). *Manual de los Hongos del Suelo* (1st ed.). México: Compañía Editorial Continental.
- Higgins, D., Thompson, J., & Gibson, T. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, *22*, 4673–4680.
- Hudson, R. R., Slatkint, M., & Maddison, W. (1992). Estimation of Levels of Gene Flow from DNA Sequence Data. *Genetics Society of America, 589*, 583–589.
- Hudspeth, D., Nadler, S., & Hudspeth, M. (2000). A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia, (92)*, 674–684.
- Huzar-Novakowski, J., & Dorrance, A. (2018). Genetic Diversity and Population Structure of *Pythium irregulare* from Soybean and Corn Production Fields in Ohio. *Plant Disease, (102)*,

1989–2000. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1725-RE>

Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., & Ariyawansa, H. A. (2014). One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, (67), 21–125. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>

Jiménez, L. (2015). Cultivation of the Dahlia. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 103–110.

Kadenbach, B., Huttermann, M., Arnold, S., Lee, I., & Bender, E. (2000). Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 211–221.

Kageyama, K., Nakashima, A., Kajihara, Y., Suga, H., & Nelson, E. B. (2005). Phylogenetic and morphological analyses of *Pythium graminicola* and related species. *Journal of General Plant Pathology*, 71(3), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0184-5>

Khuriwal, K. S., Kumar, M., Pandey, S. K., Kasera, S., & Singh, V. K. (2018). Effect of plant growth regulators on plant growth , flower yield and quality of dahlia (*Dahlia variabilis* L .). *Journal of Pharmacognosy and Pthytochemistry*, 603–604.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.

Lawson, R. (1996). Economic importance and trends in ornamental horticulture. *ISHS Acta Horticulturae*, 28(432), 1–12. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.432.28>

Lee, S., Garzón, C. D., & Moorman, G. W. (2010). Genetic structure and distribution of *Pythium aphanidermatum* populations in Pennsylvania greenhouses based on analysis of AFLP and

- SSR markers. *Mycologia*, 102(4), 774–784. <https://doi.org/10.3852/09-018>
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. (2009). *The Phylogenetic Handbook* (Segunda). Cambridge: Cambridge University Press.
- Lévesque, A., & W.A.M De Cock, A. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycologia*, 108(December), 1363–1383. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001431>
- Lévesque, C. A. (2011). Fifty years of oomycetes — from consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Diversity*, 50(35), 35–46. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0128-7>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Liew, E., MacLean, D., & Irwin, J. A. G. (1998). Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycological Research*, 73–80.
- Lifshitz, R., Elad, Y., & Baker, R. (1984). Hyphal interactions between a mycoparasite, *Pythium nunn*, and several soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(12), 1482–1487. <https://doi.org/10.1139/m84-236>
- Lio, P., & Goldman, N. (1998). Model of Molecular Evolution and Phylogeny. *Genome Res.*, (8), 1233–1244. <https://doi.org/10.1101/gr.8.12.1233>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2002). *Biología*

celular y molecular. Energética celular: glucólisis, oxidación aeróbica y fotosíntesis. (Tercera). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Long, Y., Wei, J., Sun, X., He, Y.-Q., Luo, J.-T., & Guo, L.-D. (2012). Two new *Pythium* species from China based on the morphology and DNA sequence data. *Mycol Progress*, *11*, 689–698. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0778-6>

López, K., & Pardo, S. (2010). El Cultivo de Crisantemo. Retrieved December 26, 2018, from <http://www.infoagro.com/flores/flores/crisantemo.htm>

Martin, F. N. (2000). Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. *Mycologia*, *92*(4), 711–727.

Martin, F. N., & Loper, J. E. (1999). Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* spp.: Ecology , Epidemiology , and Prospects for Biological Control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *18*(2), 111–181. <https://doi.org/10.1080/07352689991309216>

Masatoshi, N., & Sudhir, K. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics* (1st ed.). Nueva York: Oxford University Press.

Matsumoto, C., Kogeyama, K., Suga, H., & Hyakumachi, M. (1999). Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5 . 8S sequences of the ribosomal D N A. *Mycoscience*, *40*, 321–331.

McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, *142*(May 2002), 129–142. <https://doi.org/10.1002/ps.575>

- McDaniel, S., Werner, O., & Espín, R. (2002). New frontiers in bryology and lichenology. Phylogeography and phylodemography. *The Bryologist*, 3(105), 373–383.
- Meng, S., Torto-Alalibo, T., Chibucos, M. C., Tyler, B. M., & Dean, R. A. (2009). Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens , described with Gene Ontology terms. *BMC Microbiology*, 11(9), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-S1-S7>
- Milgroom, M. (2015). *Population Biology of Plant Pathogens* (Segunda). Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Millar, A., Eubel, H., Jansch, L., Kruff, V., & Braun, H. (2004). Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plan specific subunits. *Plan Mol. Biol.*, 56, 77–90.
- Narayanasamy, P. (2011). *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis* (1st ed.). New York: Springer Science.
- National Chrysanthemum Society. (2015). History of the Chrysdanthemum. Retrieved December 10, 2018, from <https://www.mums.org/history-of-the-chrysanthemum/>
- Nei, M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 70(12), 3321–3323.
- Nzungize, J., Gepts, P., Buruchara, R., Buah, S., Ragama, P., & Busogoro, J. P. (2011). Pathogenic and molecular characterization of *Pythium* species inducing root rot symptoms of common bean in Rwanda. *African Journal of Microbiology Research*, 5(10), 1169–1181.

- Ohno, S., Hosokawa, M., Hoshino, A., Kitamura, Y., & Morita, Y. (2011). A bHLH transcription factor, DvIVS, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*). *Journal of Experimental Botany*, *62*(14), 5105–5116. <https://doi.org/10.1093/jxb/err216>
- Palmucci, H. (2015). *Caracterización de especies fitopatógenas de Pythium y Phytophthora (Peronosporomycetes) en cultivos ornamentales del cinturón verde La Plata - Buenos Aires y otras áreas y cultivos de interés*. Universidad Nacional de La Plata.
- Pappu, H. R., Wyatt, S. D., & Druffel, K. L. (2005). Dahlia Mosaic Virus: Molecular Detection and Distribution in Dahlia in the United States. *HortScience*, *40*(3), 3–5.
- Pizano, M. (2017). *The USA Flower Market*. Boston: USAID. Retrieved from https://d3n8a8pro7vhmx.cloudfront.net/eatradehub/pages/3612/attachments/original/1505393416/Nairobi_workshop_EATIH_Sep_14.pdf?1505393416
- Proaño, F. (2014). *Temporal and host related variation of Pythium and Globisporangium species in floricultural crops*. Oklahoma State University.
- Proaño, F., Koch, A., Romero, P., & Garzon, C. D. (2014). Relación filogenética de cepas de *Pythium irregulare* sensu lato de Long Island , New York con base enl análisis de secuencias del gen β – tubulina . *Repositorio Universidad de Las Fuerzas Armadas - ESPE*, 1–12.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, (80), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramsden, J. (2009). *Bioinformatics: An Introduction* (2nd ed.). London: Springer.

- Ribeiro, W. R. C., & Butler, E. E. (1992). Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycological Research*, 96(10), 857–862.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81031-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81031-9)
- Ribeiro, W. R. C., & Butler, E. E. (1995). Comparison of the mycoparasites *Pythium periplocum*, *P. acanthicum* and *P. oligandrum*. *Mycological Research*, 99(8), 963–968.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80757-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80757-0)
- Ristaino, J., Haege, M., & Hu, C. (2008). Development of a Phytophthora lucid key. *International Congress of Plant Pathology*, 308.
- Robideau, G. P., Cock, A. W. A. M. D. E., Coffey, M. D., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. L. S. C. P., ... Peter, J. M. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, (11), 1002–1011.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Saralosa, A., & Rocca, M. (1975). *Fitopatología* (1st ed.). Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., W.A.M De Cock, A., Okubara, P. A., & Paulitz, T. C. (2013). Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species : Evolving Taxonomy , New Tools, and Challenges. *The American Phytopathological Society*, 97(1), 4–20.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0243-FE>
- Shen, Q., Geiser, D. M., & Royse, D. (2015). Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* reveals a species partition separating eastern North American and Asian isolates. *Mycologia*, 94(3), 472–482.
- Smith, S. (2013). Importance and uses of Chrysanthemum. Retrieved December 10, 2018, from

<http://agriinfo.in/default.aspx?page=topic&superid=2&topicid=1304>

- Spies, C. F. J., Mazzola, M., Botha, W. J., Langenhoven, S. D., Mostert, L., & Voglmayr, H. (2011). Molecular analyses of *Pythium irregulare* isolates from grapevines in South Africa suggest a single variable species. *Fungal Biology*, *115*(12), 1210–1224. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.08.006>
- Stanghellini, M. ., Stowell, L. ., & Bates, M. . (1984). Control of root rot of spinach caused by *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system by ultraviolet irradiation. *Plant Disease*, *68*, 1072–1076.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, *4*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
- Sutton, S. (2008). Multiple Sequence Alignment: A Critical Comparison of Four Popular Programs. *Bioinformatics*, (12), 1–18.
- Svennblad, B., Erixon, P. E. R., Oxelman, B., & Britton, T. O. M. (2006). Fundamental Differences Between the Methods of Maximum Likelihood and Maximum Posterior Probability in Phylogenetics. *Society of Systematic Biologists*, *55*(1), 116–121. <https://doi.org/10.1080/10635150500481648>
- Sviatopolk, F., Ruy, P., Oliveira, G., & Coimbra, R. S. (2014). Assessing the efficiency of multiple sequence alignment programs. *Algorithms for Molecular Biology*, (4), 1–8.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary Relationship of DNA sequences in Finite Populations. *Genetics Society of America*, 437–460.

- Texas A&M University. (2016). Text Plant Disease Handbook: Dahlia. Retrieved May 18, 2019, from <https://plantdiseasehandbook.tamu.edu/landscaping/flowers/dahlia/>
- Thermo Fisher Scientific. (2010). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3 . 8 User's Manual. *Thermo Fisher Scientific, 1*, 51.
- Thines, M. (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes — a global overview. *Eur J Plant Pathol, 5*(138), 431–447. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0366-5>
- Tropicos. (2018). Chrysantemum L. Retrieved December 26, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/40008423>
- USDA. (2016). Floriculture Crops 2015 Summary. *USDA*, (April), 59.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., & Kakishima, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience, 51*(March), 337–365. <https://doi.org/10.1007/s10267-010-0046-7>
- van der Plaats-Niterink, A. . (1981). *Monograph of the genus Pythium* (1st ed.). Amsterdam: Studies in Micology.
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., & Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA , cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia, 98*(3), 14. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832676>
- W.A.M De Cock, A., & Lévesque, C. A. (2004). New species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Studies in Mycology, 48*1–487.
- W.A.M De Cock, A., Lodhi, A. M., Rintoul, T. L., Bala, K., Robideau, G. P., Abad, Z. G., ...

- Lévesque, C. A. (2015). *Phytophythium* : molecular phylogeny and systematics. *Persoonia*, 34, 25–39. <https://doi.org/10.3767/003158515X685382>
- Walker, J. (1965). *Patología Vegetal* (1st ed.). Barcelona: Barcelona Omega.
- Weiland, J. E., Garrido, P., Kamvar, Z. N., Espíndola, A., Marek, S. M., Grunwald, N., & Garzón, C. D. (2015). Population Structure of *Pythium irregulare* , *P. ultimum* , and *P. sylvaticum* in Forest Nursery Soils of Oregon and Washington. *Phytopathology*, 105(5), 684–694. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-14-0147-R>
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications* (Second). Boca Raton: Taylor & Francis.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *Genetics and Evolution*, (May 2014), 315–322.
- Wilson, A., Carlson, S., & White, T. (1997). Biochemical evolution. *Annu. Rev. Biochem*, (46), 573–639.
- Wright, S. (1949). The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15(1), 323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Xu, J. (2006). Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analyses. *Current Issues Molecular Biology*, 2(8), 75–90.