

Etiología de la pudrición blanda en hojas de la planta suculenta *Sempervivum* sp.

Etiology of leaf soft rot in the succulent plant *Sempervivum* sp.

Alejandro Soto-Plancarte¹, Y. L. Fernández-Pavía², Gerardo Rodríguez-Alvarado¹, S. P. Fernández-Pavía¹

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México 58880. ²Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Especialidad de Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México 56230.

Autor para correspondencia: patricia.pavia@umich.mx

RESUMEN

El comercio y transporte de plantas ornamentales de viveros entre estados en México es una práctica común; sin embargo, se desconoce en la mayoría de los casos, si las plantas que se comercializan están infectadas por patógenos. En septiembre de 2015, se observaron plantas de *Sempervivum* sp. con síntomas de pudrición blanda en hojas en un vivero comercial en Cuautla, Morelos. Para determinar el agente causal de la enfermedad se analizaron muestras de suelo de la rizósfera de las plantas afectadas. A partir de las muestras se aisló consistentemente a un organismo oomicete, el cual fue identificado como *Phytophthora tropicalis* por sus características morfológicas: esporangios papilados con pedicelo caduco largo, ovoides y limoniformes, con simpodio simple, presencia de clamidosporas terminales e intercalares, heterotálico, con anteridios anfíginos y oosporas pleróticas. La identidad del oomicete se corroboró utilizando protocolos moleculares. En pruebas de patogenicidad plantas sanas de *Sempervivum* inoculadas con *P. tropicalis* presentaron síntomas similares a los observados en el vivero, cumpliéndose así con los postulados de Koch. Estos resultados confirman que la comercialización de plantas sin que se conozca la sanidad de las mismas propicia la diseminación del oomicete *Phytophthora*. Estos hallazgos también destacan la necesidad de implementar protocolos de manejo adecuados y oportunos para el manejo de enfermedades causadas por *Phytophthora* en sistemas de producción de plantas ornamentales en viveros en Morelos y evitar así que se disemine a otros estados del país.

Palabras clave: vivero, suculenta, *Phytophthora tropicalis*

INTRODUCCIÓN

El estado de Morelos es el principal productor nacional de plantas ornamentales en México. Morelos genera una pro-

ABSTRACT

The trade and transportation of ornamental plants from nurseries between states in Mexico is a common practice; however, in most cases, it is unknown whether the plants being traded are infected by pathogens. In September 2015, *Sempervivum* sp. plants with symptoms of soft rot on leaves were observed in a commercial nursery in Cuautla, Morelos. To determine the causal agent of the disease, soil samples from the rhizosphere of the affected plants were analyzed. Consistently isolated from the samples was an oomycete organism, identified as *Phytophthora tropicalis* based on its morphological characteristics: papillate sporangia with long caducous pedicel, ovoid and lemon-shaped, with a simple sympodium, presence of terminal and intercalary chlamydospores, heterothallic, with amphigynous antheridia and plerotic oospores. The identity of the oomycete was confirmed using molecular protocols. In pathogenicity tests, healthy *Sempervivum* plants inoculated with *P. tropicalis* exhibited symptoms similar to those observed in the nursery, fulfilling Koch's postulates. These results confirm that the trade of plants without knowledge of their health status promotes the spread of the *Phytophthora* oomycete. These findings also emphasize the need to implement appropriate and timely management protocols for diseases caused by *Phytophthora* in ornamental plant production systems in nurseries in Morelos, thus preventing its spread to other states in the country.

Keywords: nursery, succulent, *Phytophthora tropicalis*

INTRODUCTION

The state of Morelos is the main national producer of ornamental plants in Mexico. Morelos generates a production of ornamental plants that represent at least 30% of the state's agricultural gross domestic product, producing

ducción de plantas ornamentales que representan al menos el 30% del producto interno bruto agrícola del estado, generando alrededor de 400 millones de piezas de plantas ornamentales con un valor de la producción de cinco mil millones de pesos. Los principales municipios productores son Cuautla, Cuernavaca, Emiliano Zapata, Jiutepec, Tepoztlán, Xochitepec, Yauatepec y Yecapixtla (SIAP, 2023). Entre las plantas ornamentales que se comercializan en viveros de Morelos se encuentra la suculenta *Sempervivum* spp., con nombres comunes como siempreviva o alcachofa de gato. Las especies de *Sempervivum* además de ser utilizadas como plantas ornamentales, son valoradas por sus propiedades antimicrobianas y producción de antioxidantes (Abram y Donko, 1999; Stojičević *et al.*, 2008). Sin embargo, esta planta es afectada por diversas enfermedades entre las que se encuentra la causada por el hongo *Endophyllum sempervivi* en Bulgaria, Canada, Estados Unidos de America (EUA) y Noruega (Anonymous 1960; Gjaerum, 1974; Ginns 1986; Denchev, 1995). Varios oomicetes han sido reportados causando enfermedades en esta planta en los EUA; *Pythium* sp. causando pudrición de raíz en *S. tectorum* en Iowa; *Phytophthora parasitica* causando pudrición del tallo en *Sempervivum* sp. en Nueva York y *Phytophthora nicotianae* causando pudrición del tallo en *S. tectorum* en Carolina del Sur (Anonymus, 1960; Robayo-Camacho, 2009). Además, *Phytophthora cryptogea* ha sido reportada causando pudrición de hojas en *Sempervivum* sp. en Polonia (Ptaszek, 2008). A la fecha, no existen reportes de enfermedades causadas por hongos u oomicetes en plantas de *Sempervivum* en México. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar el agente causal de la pudrición blanda de hojas en plantas de *Sempervivum* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante septiembre de 2015, se observaron plantas de *sempervivum* sp. con síntomas de pudrición blanda de

around 400 million pieces of ornamental plants with a production value of five billion pesos. The main producing municipalities are Cuautla, Cuernavaca, Emiliano Zapata, Jiutepec, Tepoztlán, Xochitepec, Yauatepec, and Yecapixtla (SIAP, 2023). Among the ornamental plants traded in Morelos nurseries is the succulent *Sempervivum* spp., commonly known as "siempreviva" or "alcachofa de gato." *Sempervivum* species, in addition to being used as ornamental plants, are valued for their antimicrobial properties and antioxidant production (Abram and Donko, 1999; Stojičević *et al.*, 2008). However, this plant is affected by various diseases, including those caused by the fungus *Endophyllum sempervivi* in Bulgaria, Canada, the United States of America (USA), and Norway (Anonymous 1960; Gjaerum, 1974; Ginns 1986; Denchev, 1995). Several oomicetes have been reported causing diseases in this plant in the USA; *Pythium* sp. causing root rot in *S. tectorum* in Iowa; *Phytophthora parasitica* causing stem rot in *Sempervivum* sp. in New York, and *Phytophthora nicotianae* causing stem rot in *S. tectorum* in South Carolina (Anonymous, 1960; Robayo-Camacho, 2009). Additionally, *Phytophthora cryptogea* has been reported causing leaf rot in *Sempervivum* sp. in Poland (Ptaszek, 2008). To date, there are no reports of diseases caused by fungi or oomicetes in *Sempervivum* plants in Mexico. Therefore, the objective of this work was to identify the causal agent of soft leaf rot in *Sempervivum* sp. plants.

MATERIALS AND METHODS

During September 2015, *Sempervivum* sp. plants with symptoms of soft leaf rot were observed in a commercial nursery in Cuautla, Morelos (Figure 1). To isolate the pathogen directly from soil or planting substrate of wilted plants, leaves of *Rhododendron* sp. (azalea) were used as baits (trap tissues). Six azalea leaves, previously superficially disinfested with tap water



Figura 1. Síntomas de pudrición blanda en hojas de plantas de *Sempervivum* sp. en vivero.
Figure 1. Symptoms of soft rot on leaves of *Sempervivum* sp. plants in the nursery.

hojas, en un vivero comercial en cuautla, morelos (figura 1). Para aislar al patógeno directamente de suelo o sustrato de siembra de plantas con marchitez se usaron hojas de *Rhododendron* sp. (azalea) como cebos (tejidos trampa). Se utilizaron seis hojas de azalea previamente desinfectadas superficialmente con agua corriente y jabón, secadas a temperatura ambiente (25 °C), las cuales fueron colocadas sobre suelo inundado (10 g de suelo o sustrato de siembra y 20 mL de agua destilada estéril), y se incubaron en oscuridad a 25 °C por 48 h para permitir que el patógeno infectara las hojas de azalea. Posteriormente, las hojas se lavaron con agua, los peciolo se cortaron y se desinfectaron con cloro comercial al 10% (0.6% hipoclorito de sodio) durante 30 seg, se enjuagaron con agua destilada estéril y secaron con toallas de papel absorbente estéril. Los peciolo se sembraron en condiciones asépticas en cajas Petri con medio selectivo V8 NARPH [15 g de agar bacteriológico, 3 g de CaCO₃, 160 mL de jugo V8 Campbell, 840 mL de agua destilada, y suplementado con los antibióticos natamicina (0.02 g L⁻¹) ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), pentacloronitrobenzeno (PCNB) (0.10 g L⁻¹), e himexazol (0.075 g L⁻¹) e incubaron a 25 °C por 48 h. Las colonias miceliales que emergieron de las hojas de azalea se examinaron en un microscopio y se seleccionaron las que presentaron micelio cenocítico típico del oomicete *Phytophthora*. Estas colonias se transfirieron a medio agar harina de maíz para crecerlas y después a medio agar agua al 1.5% para su purificación por el método de punta de hifa (Tuite 1969). Posteriormente, se crecieron en medio agar harina de maíz (17 g L⁻¹) durante 7 días, una vez que se desarrolló la colonia se tomó un disco de 6 mm y se colocó en medio Luria Bertani para descartar que hubiera contaminación por bacterias. Se cortaron discos de agar con micelio de 6 mm de diámetro y se almacenaron en microtubos para centrifuga de 1.5 mL con 1 mL de agua destilada estéril a 15 °C, en la Colección de *Phytophthora* del Laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Para realizar la caracterización morfológica los aislados se crecieron en medio agar jugo V8 durante 5 a 7 días. Se indujo la formación de esporangios incubando bloques de agar V8 con micelio en agua destilada estéril a 25°C bajo luz blanca fluorescente continua durante tres a cinco días. Los tipos de compatibilidad de los aislados de *Phytophthora* se determinaron cruzándolos con cepas de tipo de compatibilidad conocido de *P. capsici* (A1 y A2) en medio de cultivo agar V8 e incubaron a 25°C en oscuridad hasta la observación de oosporas. Si el aislado en la cruce con A1 formó oosporas se le designó el tipo de compatibilidad A2 y viceversa. Las características morfológicas de las esporas sexuales y asexuales se compararon con las reportadas en la clave lúcida de *Phytophthora* (Abad *et al.*, 2023). Para la caracterización molecular el ADN genómico se obtuvo cultivando el aislado seleccionado (LEV6743) a 21±1 °C por 15 a 20 días en

and soap, air-dried at room temperature (25 °C), were placed on flooded soil (10 g of soil or planting substrate and 20 mL of sterile distilled water). They were then incubated in darkness at 25 °C for 48 hours to allow the pathogen to infect the azalea leaves. Subsequently, the leaves were washed with water, the petioles were cut, and they were disinfested with 10% commercial bleach (0.6% sodium hypochlorite) for 30 seconds. They were rinsed with sterile distilled water and dried with sterile absorbent paper towels. The petioles were aseptically planted in Petri dishes with selective V8 NARPH medium [15 g of bacteriological agar, 3 g of CaCO₃, 160 mL of Campbell V8 juice, 840 mL of sterile distilled water, supplemented with antibiotics natamycin (0.02 g L⁻¹), ampicillin (0.27 g L⁻¹), rifampicin (0.01 g L⁻¹), pentachloronitrobenzene (PCNB) (0.10 g L⁻¹), and hymexazol (0.075 g L⁻¹), and they were incubated at 25 °C for 48 hours.

Mycelial colonies emerging from the azalea leaves were examined under a microscope, and those exhibiting typical *Phytophthora* coenocytic mycelium were selected. These colonies were transferred to cornmeal agar medium for growth and then to 1.5% water agar medium for purification using the hyphal tip method (Tuite 1969). Subsequently, they were grown on cornmeal agar medium (17 g L⁻¹) for 7 days. Once the colony developed, a 6 mm disk was taken and placed in Luria Bertani medium to rule out bacterial contamination. Agar disks with mycelium of 6 mm diameter were cut and stored in 1.5 mL microcentrifuge tubes with 1 mL of sterile distilled water at 15 °C in the *Phytophthora* Collection of the Plant Pathology Laboratory at the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

For morphological characterization, isolates were grown on V8 juice agar medium for 5 to 7 days. sporangium formation was induced by incubating V8 agar blocks with mycelium in sterile distilled water at 25 °C under continuous white fluorescent light for three to five days. Compatibility types of *Phytophthora* isolates were determined by crossing them with known compatibility types of *P. capsici* (A1 and A2) on V8 agar medium and incubated at 25 °C in darkness until the observation of oospores. If the isolate formed oospores in the cross with A1, it was designated as compatibility type A2, and vice versa. Morphological characteristics of sexual and asexual spores were compared with those reported in the *Phytophthora* lucid key (Abad *et al.*, 2023). For molecular characterization, genomic DNA was obtained by cultivating the selected isolate (LEV6743) at 21±1 °C for 15 to 20 days in clarified 2% V8 liquid medium following the protocol of Möller *et al.* (1992) with modifications in tissue disruption, previously described by Robideau *et al.* (2011). In the final step, the DNA pellet was resuspended in 0.1X TE buffer with 50 µg/mL RNase A and incubated at 65 °C for 10 min. Partial regions of ITS1-5.8S-ITS2 (internal transcribed spacer) were amplified using oligonucleotides UN-up18S42 (Bakkeren *et al.*, 2000) UN-lo28S1220 (Bala *et al.*, 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22,

medio líquido V8 clarificado al 2% siguiendo el protocolo de Möller *et al.* (1992) con modificaciones en el rompimiento del tejido, previamente descrito por Robideau *et al.* (2011). En el paso final, la pastilla de ADN se resuspendió en 0.1X TE buffer con 50 µg/mL de RNasa A y se incubó a 65 °C por 10 min. Los espaciadores transcritos internos (ITS) de rDNA se amplificaron empleando los oligonucleótidos UN-up18S42 (Bakkeren *et al.*, 2000), UN-lo28S1220 (Bala *et al.*, 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 e ITS4 (Lévesque y de Cock, 2004). Se emplearon cinco oligonucleótidos para amplificar el cistron e identificar con mayor precisión la especie de *Phytophthora*. Las secuencias parciales del gen mitocondrial CO1 (cytochrome *c* oxidase subunit 1) fueron amplificadas con OomCoxIlevup y Fm85mod modificados por Martin y Tooley (2003), y Oom-Btub-up415 y Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau *et al.*, 2007) de la región del gen β-tubulina para el aislamiento de *Sempervivum*.

El volumen de la reacción de PCR para las regiones ITS y los genes CO1 y β-tubulina fue de 10 µL, con concentraciones finales de 1 x Titanium Taq buffer (con 3.5 mM de MgCl₂), 0.1mM de dNTPs, 0.08 µM de cada oligonucleótido, 0.5 x Titanium Taq polimerasa y de 1 a 10 ng/µL de ADN. Se agregó agua S-HPLC hasta obtener un volumen de 10 µL.

La amplificación de las regiones ITS SSU/LSU con los oligonucleótidos Oom-up18S67 y UN-lo28S1220 se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: 95 °C durante 3 min seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 45 s, 72 °C por 2 min, y finalmente 72 °C por 8 min de extensión. Para los oligonucleótidos UN-up18S42 y UN-lo28S22 o ITS4 las condiciones fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 68 °C durante 45 s, 72 °C por 1'30'', y 72 °C por 10 min de extensión final. Las condiciones para la amplificación de CO1 fueron las descritas por Robideau *et al.* (2011). Las condiciones para β-tubulina fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C por 1 min, y finalmente 72 °C por 8 min de extensión.

Se utilizó un analizador genético Applied Biosciences Prism® 3130xl para generar las secuencias de ADN a partir de las reacciones de amplificación de secuenciación. Las secuencias se ensamblaron, editaron, generaron secuencias consenso y analizaron con secuencias publicadas en la base de datos del GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante análisis Blast con el programa Geneious (Geneious v. 8.1, www.geneious.com) para determinar los porcentajes de identidad e identificar la especie de *Phytophthora*.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de *Sempervivum* sembradas en substrato Sunshine Mix3®, bajo condiciones de invernadero. La inoculación se realizó haciendo una herida con un bisturí estéril en dos puntos opuestos en la base del tallo y sobre estos se colocó un disco de agar V8 con micelio y esporangios. Se inocularon seis plantas y en las plantas control (tres) únicamente se hicieron heridas con un bisturí estéril. Los bloques de medio con mi-

and ITS4 (Lévesque and de Cock, 2004). Five oligonucleotides were used to amplify the ITS region and identify the *Phytophthora* species more accurately. Partial sequences of the mitochondrial CO1 gene (cytochrome *c* oxidase subunit 1) were amplified with modified OomCoxIlevup and Fm85mod primers (Martin and Tooley, 2003), and Oom-Btub-up415 and Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau *et al.*, 2007) from the β-tubulin gene region for *Sempervivum* isolate.

The PCR reaction volume for ITS region, CO1 and β-tubulin genes was 10 µL, with final concentrations of 1x Titanium Taq buffer (with 3.5 mM MgCl₂), 0.1mM dNTPs, 0.08 µM each oligonucleotide, 0.5x Titanium Taq polymerase, and 1 to 10 ng/µL DNA. Sterile water was added until a volume of 10 µL was obtained. Amplification of ITS SSU/LSU regions with oligonucleotides Oom-up18S67 and UN-lo28S1220 was performed according to the following protocol: 95 °C for 3 min followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 45 s, 72 °C for 2 min, and finally 72 °C for 8 min extension. For oligonucleotides UN-up18S42 and UN-lo28S22 or ITS4, the conditions were: 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 68 °C for 45 s, 72 °C for 1'30'', and 72 °C for 10 min final extension.

The conditions for amplifying CO1 were as described by Robideau *et al.* (2011). Conditions for β-tubulin were: 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and finally 72 °C for 8 min extension.

An Applied Biosciences Prism® 3130xl genetic analyzer was used to generate DNA sequences from the sequencing amplification reactions. Sequences were assembled, edited, generated consensus sequences, and analyzed with sequences published in the GenBank database (NCBI, National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using Blast analysis with the Geneious program (Geneious v. 8.1, www.geneious.com) to determine identity percentages and identify the *Phytophthora* species.

Pathogenicity tests were conducted on *Sempervivum* plants grown in the substrate Sunshine Mix 3®, under greenhouse conditions. Inoculation was performed by making a wound with a sterile scalpel at two opposite points at the base of the stem, and a V8 agar disk with mycelium and sporangia was placed over these wounds. Six plants were inoculated, and in control plants (three), wounds were made with a sterile scalpel only. Mycelium-containing agar blocks and wounds on the stems were covered with Parafilm and then covered again with the same non-sterilized soil as the plants.

To fulfill Koch's postulates, isolations of the diseased plant tissue on selective NARPH V8 agar were performed from plants showing stem necrosis and wilting (23 days post-inoculation). Two days after isolation, a approximately 0.5 cm² block of medium with characteristic *Phytophthora* mycelium was transferred to cornmeal agar medium, and from the developed colony, a block was transferred to 1.5%

celio y las heridas en los tallos se cubrieron con parafilm y cubrió de nuevo con el mismo sustrato de las plantas. Para cumplir con los postulados de Koch, a partir de las plantas que presentaron necrosis en el tallo y marchitez (23 días post-inoculación) se realizaron aislamientos del tejido vegetal enfermo en medio agar V8 selectivo NARPH. Dos días después del aislamiento se tomó un bloque de 0.5 cm² aproximadamente de medio con micelio característico de *Phytophthora* y se transfirió a medio agar harina de maíz, y de la colonia que se desarrolló se transfirió un bloque a medio agar agua al 1.5%. El aislado se purificó, identificó morfológicamente y almacenó como se describe en párrafos anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas enfermas de *Sempervivum* se colectaron en el mes de septiembre que corresponde a la temporada de lluvias, favoreciendo esto el desarrollo del patógeno en viveros del estado de Morelos, la incidencia de la enfermedad fue de aproximadamente 10%. Las plantas severamente afectadas en el vivero mostraron las hojas inferiores con pudrición blanda (Figura 1). Se aisló consistentemente a *Phytophthora* del suelo de la rizósfera de *Sempervivum*. Los esporangios producidos fueron papilados con pedicelo caduco largo, limoniformes, ovoides con diámetros 35-55 (42.4) a 20-35 (25.7) µm largo por ancho, con simpodio simple, presentó clamidosporas terminales e intercalares. Heterotálico con tipo de compatibilidad A1, con anteridios anfiginos, oosporas pleróticas con un diámetro de 20-25 (22.85) a 20-27.5 (23.95) µm largo por ancho. Las características mencionadas coinciden con la descripción de *Phytophthora tropicalis* (Abad *et al.*, 2023).

La secuencia ITS sometida a una búsqueda BLASTn en GenBank mostró un 99.34% y 99.47 % de identidad con los aislados tipificados CPHST_BL_58 y CBS43491 de *P. tropicalis* ([MG865596.1](#) y [HQ643369.1](#)) respectivamente. La secuencia COI también mostró un 100% de identidad con aislados de *P. tropicalis* ([HF937580.1](#) y [HF937579.1](#)), y con β-tubulina mostró un 99.55% de identidad con el aislado tipificado CPHST_BL_58 de *P. tropicalis* ([MH494022.1](#)). Con base en las características morfológicas y la caracterización molecular se confirmó que el patógeno en plantas de *Sempervivum* es *P. tropicalis*.

En pruebas de patogenicidad, las plantas inoculadas con el aislado LEV6743 presentaron síntomas de clorosis y pudrición de hojas, seguido de una lesión necrótica en el tallo 23 días post-inoculación (Figura 2). Finalmente, las hojas se tornaron de amarillas a café y se observó una pudrición suave. Los síntomas fueron similares a aquellos observados en las plantas de vivero. No se observaron síntomas en las plantas control. *Phytophthora* fue reaislada del tejido de tallo sintomático infectado e identificada morfológicamente como *P. tropicalis* (Abad *et al.*, 2023), completándose los postulados de Koch.

water agar medium. The isolate was purified, identified morphologically, and stored as described in previous paragraphs.

RESULTS AND DISCUSSION

The diseased *Sempervivum* plants were collected in September, corresponding to the rainy season, which favored the development of the pathogen in nurseries in the state of Morelos. The disease incidence was approximately 10%. Severely affected plants in the nursery exhibited lower leaves with soft rot (Figure 1). *Phytophthora* was consistently isolated from the rhizosphere soil of *Sempervivum*. The produced sporangia were papillate with a long caducous pedicel, lemon-shaped, ovoid with diameters of 35-55 (42.4) by 20-35 (25.7) µm in length and width, with a simple sympodium, and presented terminal and intercalary chlamydospores. It was heterothallic with compatibility type A1, amphigynous antheridia, and plerotic oospores with a diameter of 20-25 (22.85) to 20-27.5 (23.95) µm in length and width. The mentioned characteristics match the description of *Phytophthora tropicalis* (Abad *et al.*, 2023). The ITS sequence subjected to a BLASTn search in GenBank showed 99.34% and 99.47% identity with the typified isolates CPHST_BL_58 and CBS43491 of *P. tropicalis* (MG865596.1 and HQ643369.1), respectively. The COI sequence also showed 100% identity with isolates of *P. tropicalis* (HF937580.1 and HF937579.1), and with β-tubulin, it showed 99.55% identity with the typified isolate CPHST_BL_58 of *P. tropicalis* (MH494022.1). Based on the morphological characteristics and molecular characterization, it was confirmed that the pathogen in *Sempervivum* plants is *P. tropicalis*.

In pathogenicity tests, plants inoculated with the LEV6743 isolate obtained from a *Sempervivum* sp. plant exhibited symptoms of chlorosis and leaf rot, followed by necrotic lesions on the stem 23 days post-inoculation (Figure 2). Finally, the leaves turned from yellow to brown, and soft rot was observed. The symptoms were similar to those observed in nursery plants. No symptoms were observed in the control plants. *Phytophthora* was re-isolated from the infected symptomatic stem tissue and morphologically identified as *P. tropicalis* (Abad *et al.*, 2023), completing Koch's postulates.

Phytophthora tropicalis is a species with a wide geographic distribution that affects around 23 plant families. It is frequently isolated from ornamental nursery plants and economically important trees (Uchida and Kadooka, 2013), however it had not been detected in *Sempervivum*. The number of host plants may increase, along with its distribution, due to the commercialization of infected nursery plants, both in Mexico and other countries. In Mexico, *Phytophthora tropicalis* has been reported in *Theobroma cacao* causing black pod rot in the state of Tabasco, in *Sesamum indicum* causing stem and root rot in the state of Guerrero, and in *Cyclamen persicum* causing



Figura 2. Síntomas en plantas de *Sempervivum* sp. inoculadas con *P. tropicalis*. **A.** Pudrición y necrosis en el tallo; **B.** Hojas amarillas cloróticas y café con pudrición.

Figure 2. Symptoms in *Sempervivum* sp. plants inoculated with *P. tropicalis*. **A.** Rot and necrosis in the stem; **B.** Yellow chlorotic leaves and brown discoloration with rot.

Phytophthora tropicalis es una especie con amplia distribución geográfica que afecta alrededor de 23 familias de plantas. Frecuentemente se aísla de plantas ornamentales de vivero y de árboles de importancia económica (Uchida y Kadooka, 2013), sin embargo, no se había detectado en *Sempervivum*. Es posible que el número de plantas hospedantes aumente, así como su distribución debido a la comercialización de plantas de vivero infectadas tanto en México como en otros países. En México se ha reportado a *Phytophthora tropicalis* en *Theobroma cacao* causando pudrición negra de la vaina en el estado de Tabasco, en *Sesamum indicum* causando pudrición del tallo y la raíz en el estado de Guerrero, y en vivero en *Cyclamen persicum* causando marchitez en el Estado de México (Leyva-Mir et al., 2016; Ortega-Acosta et al., 2017; Chávez-Ramírez et al., 2021). Por lo que este es el primer reporte de *P. tropicalis* en *Sempervivum* en México, y a nivel mundial.

Siendo Morelos el estado de la República Mexicana más importante en la producción de plantas ornamentales es preocupante que se detecte *Phytophthora* ya que se están comercializando plantas enfermas y se está diseminando este patógeno en diversos estados. La detección e identificación de especies de *Phytophthora* que ocasionan daños en plantas de vivero, enfatiza la necesidad de utilizar protocolos para un manejo adecuado y oportuno de enfermedades causadas por este patógeno en este sistema de producción. Las enfermedades causadas por *Phytophthora* son uno de los principales problemas fitosanitarios en viveros a nivel mundial y la dispersión de especies de este patógeno en viveros de plantas nativas demuestra los riesgos potenciales de diseminar de viveros infestados hacia áreas silvestres, jardines o lugares donde no estaba presente este oomicete (Rooney-Latham et al., 2019).

wilting in nursery in the State of Mexico (Leyva-Mir et al., 2016; Ortega-Acosta et al., 2017; Chávez-Ramírez et al., 2021). Therefore, this is the first report of *P. tropicalis* in *Sempervivum* in Mexico, and worldwide

Given that Morelos is the most important state in Mexico for the production of ornamental plants, it is concerning to detect *Phytophthora*, as infected plants are being traded, spreading this pathogen to various states. The detection and identification of *Phytophthora* species causing damage to nursery plants emphasize the need for protocols for proper and timely management of diseases caused by this pathogen in this production system. Diseases caused by *Phytophthora* are one of the major phytosanitary problems in nurseries worldwide, and the spread of this pathogen's species in nurseries of native plants demonstrates the potential risks of spreading from infested nurseries to wild areas, gardens, or places where this oomicete was not previously present (Rooney-Latham et al., 2019).

Nursery producers are advised to avoid reusing soil from diseased plants or to solarize it before reuse. Additionally, they should wash and disinfect reused pots, avoid planting susceptible plant species consecutively in the same nursery area to prevent infection, regularly clean and disinfect tools to prevent pathogen spread, keep the nursery free of weeds to reduce infection risk, avoid excessive watering as excess moisture promotes *Phytophthora* development and spread, conduct regular inspections to detect disease symptoms, and remove and destroy any infected plant material to prevent pathogen persistence in the nursery (Parke and Grünwald, 2012). Fungicide application is not recommended due to cost considerations. Our working group is developing a good practices manual for ornamental plant nurseries to assist producers in reducing the number of diseased plants.

Se le recomendó a los productores de vivero que eviten reutilizar el suelo si proviene de una planta enferma o solarizarlo antes de volver a usarlo, asimismo lavar las macetas que se reutilizan. Evitar poner especies de plantas susceptibles en la misma área del vivero de manera consecutiva ya que se pueden infectar. Limpiar y desinfectar regularmente las herramientas de trabajo para evitar la propagación de los patógenos de una planta a otra. Mantener el vivero libre de malezas para reducir la posibilidad de infección. Evitar el riego excesivo, ya que el exceso de humedad favorece el desarrollo y dispersión de *Phytophthora*. Realizar inspecciones periódicas para detectar síntomas de la enfermedad y descartar los primeros brotes de la enfermedad. Eliminar y destruir cualquier material vegetal infectivo para evitar la persistencia del patógeno en el vivero (Parke y Grünwald, 2012). La aplicación de fungicidas no se recomienda por no ser costeable. Nuestro grupo de trabajo está elaborando un manual de buenas prácticas para viveros de plantas

CONCLUSIÓN

Este es el primer reporte de *Phytophthora tropicalis* causando pudrición blanda en hojas de plantas de *Sempervivum* en Morelos, México y a nivel mundial. La información de este estudio ayudará a que los productores de vivero de plantas ornamentales tomen medidas preventivas de manejo pertinentes para evitar la diseminación de este patógeno a otros lugares.

REFERENCIAS

- Abad, Z.G., Burgess, T.I., Redford, A.J., Bienapfl, J.C., *et al.*, 2023. IDphy: An International online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on type specimens. *Plant Disease*, 107: 987–998. DOI:10.1094/PDIS-02-22-0448-FE
- Abram, V., and Donko, M., 1999. Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 485-489. <https://doi.org/10.1021/jf980669d>
- Anonymous. 1960. Index of Plant Diseases in the United States. U.S.D.A. Agriculture Handbook 165:1-531.
- Bakkeren, G., Kronstad, J.W., and Levesque, C.A., 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia*, 92(3), 510. <https://doi.org/10.2307/3761510>
- Bala, K., Robideau, G., Désaulniers, N., De Cock, A., and Lévesque, C., 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 22-31. <https://doi.org/10.3767/003158510x524754>
- Bilodeau, G.J., Lévesque, C.A., de Cock, A.W., Duchaine, C., Brière, S., Uribe, P., Martin, F.N., and Hamelin, R.C., 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR green, and molecular beacons. *Phytopathology*, 97(5), 632-642. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-5-0632>
- Chávez-Ramírez, B., Rodríguez-Velázquez, N.D., Chávez-Sánchez, M.E., Vásquez-Murrieta, M.S., Hernández-Gallegos, M.A., Velázquez-Martínez, J.R., Avendaño-Arrazate, C.H., and Estrada-de los Santos, P., 2021. Morphological and molecular identification of *Phytophthora tropicalis* causing black pod rot in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(5), 670-679. DOI: [10.1080/07060661.2020.1870003](https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1870003)
- Denchev, C.M., 1995. Bulgarian Uredinales. *Mycotaxon*, 55:405-465.
- Ginns, J.H., 1986. Compendium of plant disease and decay fungi in Canada, 1960-1980. *Research Brand Canada Agriculture Publication* 1813:416 <https://doi.org/10.5962/bhl.title.58888>
- Gjaerum, H. 1974. Nordens Rustsopper. *Fungiflora*, Oslo :321

CONCLUSION

This is the first report of *Phytophthora tropicalis* causing soft rot in the leaves of *sempervivum* plants in Morelos, Mexico, and globally. The information from this study will assist ornamental plant nursery producers in implementing relevant preventive management measures to avoid the spread of this pathogen to other locations.

- Lévesque, C., and De Cock, A.W., 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(12), 1363-1383. <https://doi.org/10.1017/s0953756204001431>
- Leyva-Mir, S.G., Tovar-Pedraza, J.M., Camacho-Tapia, M., Almaraz-Sánchez, A., and Silva, M.S., 2016. First report of *Phytophthora tropicalis* causing wilt of *Cyclamen persicum* in Mexico. *Plant Disease*, 100(8), 1796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1465-PDN>
- Martin, F.N., and Tooley, P.W., 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*, 95(2), 269. <https://doi.org/10.2307/3762038>
- Möller, E., Bahnweg, G., Sandermann, H., and Geiger, H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115-6116. <https://doi.org/10.1093/nar/20.22.6115>
- Ortega-Acosta, S.Á., Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D.L., and Ayala-Escobar, V., 2017. First report of *Phytophthora tropicalis* causing stem and root rot on sesame (*Sesamum indicum*) in Mexico. *Plant Disease*, 101(1), 258. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0482-PDN>
- Parke, J.L., and Grünwald, N.J., 2012. A systems approach for management of pests and pathogens of nursery crops. *Plant Disease*, 96(9), 1236-1244.
- Ptaszek, M., 2008. *Phytophthora cryptogea*-a new pathogen of perennial plants in Poland. In I International Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone 885(pp. 271-275). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.885.37>
- Robayo-Camacho, E., 2009. Diseases of floriculture crops in South Carolina: Evaluation of a pre-plant sanitation treatment and identification of species of *Phytophthora*. II Theses. 663. https://tigerprints.clemson.edu/all_theses/663
- Robideau, G.P., De Cock, A.W., Coffey, M.D, Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C.H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J., Ristaino, J.B., Lévesque, C.A., 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002-1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Rooney-Latham, S., Blomquist, C.L., Kosta, K.L., Gou, Y.Y., and Woods, P.W., 2019. *Phytophthora* species are common on nursery stock grown for restoration and revegetation purposes in California. *Plant Disease*, 103(3), 448-455. doi:10.1094/pdis-01-18-0167-re
- SIAP, 2023. [Visto 28 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/morelos/articulos/produccion-ornamental-de-morelos-representa-el-30-por-ciento-de-su-pib-agricola?idiom=es>
- Stojčević, S.S., Stanisavljević, I.T., Veličković, D.T., Veljković, V.B., and Lazić, M.L., 2008. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoratum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(6), 597-607. <https://doi.org/10.2298/jsc0806597s>
- Tuite, J., 1969. *Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria* [online]. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing Company. [Visto 27 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19701101886>
- Uchida, J., and Kadooka, C. Y. 2013. Distribution and biology of *Phytophthora tropicalis*. In *Phytophthora: a global perspective* (pp. 178-186). Wallingford UK: CABI