

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora cinnamomi* CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN RADICAL DE *Annona cherimola* EN LA COSTA CENTRAL DEL PERÚ

Yuri Calle-Cheje¹, René Aguilar-Ancota², Robert Rafael-Rutte³, José Silupú-Masías², Arturo Morales-Pizarro² y Merici Medina-Guerrero⁴

RESUMEN

La Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) es una planta que se cultiva principalmente en los valles interandinos de la región Lima, Perú, que presentan condiciones adecuadas para su producción. Sin embargo, estas condiciones, también, favorecen el desarrollo de patógenos que causan el decaimiento y muerte de las plantas de chirimoya. El objetivo del estudio fue identificar molecularmente el agente causal de la pudrición de la raíz de chirimoya. Se recolectaron raicillas de chirimoya con síntomas leves y severos de pudrición de los valles: Huanangui, San Antonio de Cumbe y Huaral, Lima. En medio PDA y V8 se obtuvieron siete aislados de *Phytophthora* con micelio coraloides, petiolado, hifas cenocíticas con hinchamientos hifales, esporangios obpiriformes, ovoide sin papilas y con clamidosporas globosas. Las regiones de la subunidad II del citocromo oxidasa (Cox2) y del factor de elongación alfa 1 (EF1- α) se amplificaron utilizando los primers FM75, FM78, EF1AF y EF1AR. Las secuencias obtenidas mostraron una similitud del 99,22 al 99,87 % para Cox2 y del 99,04 al 100 % con EF1- α para *Phytophthora cinnamomi*. El árbol filogenético mostró una topología congruente con las accesiones de *Phytophthora*. Se concluye que *P. cinnamomi* es el causante de la pudrición de la raíz, siendo este el primer reporte sobre la presencia de este patógeno en plantas de chirimoya en el Perú.

Palabras clave adicionales: Cox2, EF1- α , Oomyceto, patógeno de suelo, zoospora

ABSTRACT

Molecular characterization of *Phytophthora cinnamomi*, the cause of root rot in cherimoya (*Annona cherimola*) on the central coast of Peru

Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) is a plant that is cultivated mainly in the inter-Andean valleys of the Lima region, Peru, which present suitable conditions for its production. However, these conditions also favor the development of pathogens that cause the decline and death of cherimoya plants. The objective of the study was to molecularly identify the causal agent of cherimoya root rot. Cherimoya roots with mild and severe symptoms of root rot were collected from the valleys: Huanangui, San Antonio de Cumbe and Huaral, Lima. Seven *Phytophthora* isolates were obtained on PDA and V8 media with coraloid, petiolate mycelium, coenocytic hyphae with hyphal swellings, obpyriform sporangia, ovoid without papillae and globose chlamydospores. The cytochrome oxidase subunit II (Cox2) and elongation factor alpha 1 (EF1- α) regions were amplified using primers FM75, FM78, EF1AF and EF1AR. The sequences obtained showed a similarity of 99,22 to 99,87 % for Cox2 and 99,04 to 100 % with EF1- α for *Phytophthora cinnamomi*. The phylogenetic tree showed a topology consistent with the *Phytophthora* accessions. It is concluded that *P. cinnamomi* is the cause of root rot, this being the first report on the presence of this pathogen in custard apple plants in Peru.

Additional keywords: Cox2, EF1- α , Oomycete, soil pathogen, zoospore

Editor Asociado: Dra. Iris Pérez-Almeida

INTRODUCCIÓN

La chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), originaria de Sudamérica, es un cultivo

ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Tineo, 2019), su fruto posee una destacada importancia histórica y cultural en diversas áreas de Centroamérica,

Recibido: Julio 6, 2024

Aceptado: Diciembre 12, 2024

¹Universidad Católica Sedes Sapientiae. Mazo, Lima, Perú. e-mail: yuricalle@hotmail.com (autor de correspondencia).

²Universidad Nacional de Piura, Campus Universitario. Piura, Perú.

e-mail: raancota@hotmail.com; silupumasias04@gmail.com; damorpiz@hotmail.com

³Universidad Nacional Tecnológica de Lima Sur. Lima, Perú. e-mail: rrafael@untels.edu.pe

⁴Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica, Perú. e-mail: ingrid.medina@unica.edu.pe

donde fue valorado por civilizaciones como los mayas y aztecas, así como en Sudamérica y el Caribe. En Perú, especialmente en la región de La Libertad, situada al noroeste del país, la chirimoya fue consumida desde épocas precolombinas, formando parte integral de la tradición alimentaria de los antiguos pobladores (Gayoso y Chang, 2017), en la historia peruana, existen antecedentes en las cerámicas prehispánicas con formas y figuras de chirimoya (Ghezzi, 2011), en la actualidad es un cultivo de gran importancia económica dentro de la agricultura familiar peruana, se desarrolla de manera óptima en altitudes de 1500 a 2500 m (Tineo, 2019).

Los frutos de chirimoya se consumen principalmente como fruta fresca y se utilizan en diversas preparaciones, como jugos, helados y batidos. Además, poseen propiedades nutricionales y nutraceuticas destacadas debido a su contenido de polifenoles y proantocianidinas se les atribuye actividades antioxidantes (Gentile et al., 2020). Diversas partes de la planta contienen alcaloides por lo que se utilizan en la medicina tradicional para tratar afecciones como disentería aguda, depresión, enfermedades de la médula espinal y problemas cutáneos (Durán et al., 2021). Los extractos obtenidos de la corteza, hojas y las semillas han demostrado actividad antitumoral, el ácido 17-dihidroxicauran-oico presente en el fruto exhibe propiedades antivirales contra el virus de la inmunodeficiencia; compuestos aislados de las semillas, como annotemoyin-1, annotemoyin-2, esquamocina y glucopiranosido, han mostrado actividades antimicrobiana y citotóxica (Bapat et al., 2019).

En el Perú se cultivan al menos 2.905 ha, concentrándose principalmente en las regiones de Lima (42,2 %), Cajamarca (17,5 %) y Piura (14,4 %), la producción nacional alcanza un total de 20.500 t anuales (MINAGRI, 2019), de las cuales se exportan 1.200 t. El valle de Huanangui de la región Lima, tiene una superficie cultivada de 268 ha, de las cuales 70,5 ha corresponden a chirimoya (Buse et al., 2015).

El cultivo de chirimoya representa una importante fuente de ingresos económicos para muchas familias peruanas. No obstante, la mayoría de las plantaciones se encuentran en huertos con manejo técnico limitado, lo que contribuye a su vulnerabilidad a enfermedades como la pudrición de la raíz, que afectan

significativamente los rendimientos. Este cultivo suele manejarse en asociación con aguacate (*Persea americana*), el cual es afectado por la pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* (Gastañadui et al., 2021). Sin embargo, no se han documentado ni publicado estudios que confirmen el ataque de este patógeno en el cultivo de chirimoya, ni se ha realizado la caracterización molecular como patógeno de chirimoya.

P. cinnamomi es un patógeno que causa enfermedades en un amplio rango de plantas cultivadas, colonizando y desarrollándose principalmente en el sistema radical (Del Castillo et al., 2024). En plantas de aguacate atacados por este patógeno, se observa pudrición progresiva de la raíz, muerte regresiva de ramas y finalmente decaimiento de la planta. Este patógeno infecta principalmente las raíces mediante las zoosporas liberadas del zoosporangio, como resultado de la saturación hídrica del suelo de forma temporal o frecuente, favorecido por la textura pesada o arcillosa del suelo y manejo inadecuado del riego (Hardham y Blackman, 2018).

El problema más importante de estos frutales es la pudrición de la raíz, como síntomas externos se observó decaimiento de la planta, marchitez, defoliación, frutos pequeños con daños por radiación solar, muerte regresiva. Asimismo, presentan cuarteaduras en la base del tallo principal, acompañado por muerte de ramas donde es común encontrar a *Lasioidiplodia theobromae* tal como mencionan Del Castillo et al. (2024). La pudrición radical es un factor limitante en la producción de chirimoya en las zonas del valle de Huanangui, Santo Toribio de Cumbre y Huaral de la región Lima, muchos campos con chirimoya no logran superar los 15 años, teniendo que renovarse con nuevas plantas (Buse et al., 2015), en varios lugares se observó campos con más del 50 % de plantas afectadas.

No se han reportado datos específicos sobre las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad, sin embargo, son significativas, lo que demanda la necesidad de una identificación precisa y exacta. En la identificación de un microorganismo no es suficiente la caracterización morfológica, siendo necesaria la identificación molecular a nivel de especie. El uso de herramientas de identificación molecular permitirá determinar con certeza el agente causal de la pudrición radical, lo cual es

fundamental para implementar un manejo adecuado de la enfermedad. Por lo mencionado, se planteó como objetivo determinar el agente causal de la pudrición radical de chirimoya mediante caracterización molecular del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento de *Phytophthora*.

Entre enero y junio de 2019 se seleccionaron huertos de chirimoya en los valles de Huanangui, Santo Toribio de Cumbe y Huaral (Cuadro 1), considerado como las principales zonas productoras de la región Lima, Perú. Para el

estudio, se recolectaron muestras de raíces secundarias y raicillas con síntomas de necrosis, utilizando una espátula.

Los árboles de chirimoya seleccionados para el muestreo provenían de campos con manejo técnico limitado, poca utilización de fertilizantes, riego por inundación a gravedad; los suelos presentaban textura franco arcilloso en todas las zonas muestreadas. Los huertos elegidos contenían árboles de entre 5 y 10 años que mostraban síntomas como falta de vigor, amarillamiento del follaje, decaimiento general, escasez de hojas y frutos pequeños (Figura 1).

Cuadro 1. Lugares de muestreo en árboles de chirimoya (*Annona cherimola*) y aguacate (*Persea americana*) para el aislamiento de *Phytophthora* sp.

Aislado	Lugar/Cultivo	Ubicación geográfica	Altitud (msnm)
PC1	Huanangui- Huaura/ Chirimoya*	11°07'58" S 77°02'21" W	1650-1680
PC2	Huanangui - Huaura/Chirimoya*	11°07'58" S 77°02'22" W	1665-1675
PC3	Huanangui- Huaura/Chirimoya*	11°07'51" S 77°01'58" W	1650-1670
PC4	Acotama–Huaura/Chirimoya*	11°08'45" S 77°04'08" W	1350-1380
PC5	Santo Toribio Cumbe/Chirimoya**	11°53'32" S 76°33'01" W	1670-1690
PC6	Huaral/Chirimoya***	11°27'55" S 77°11'30" W	240-256
PC7	Huaral/Aguacate	11°25'47" S 77°13'52" W	185-200

*Ecotipo Blanca de Huanagui, **ecotipo Cumbe, *** ecotipo Criolla.

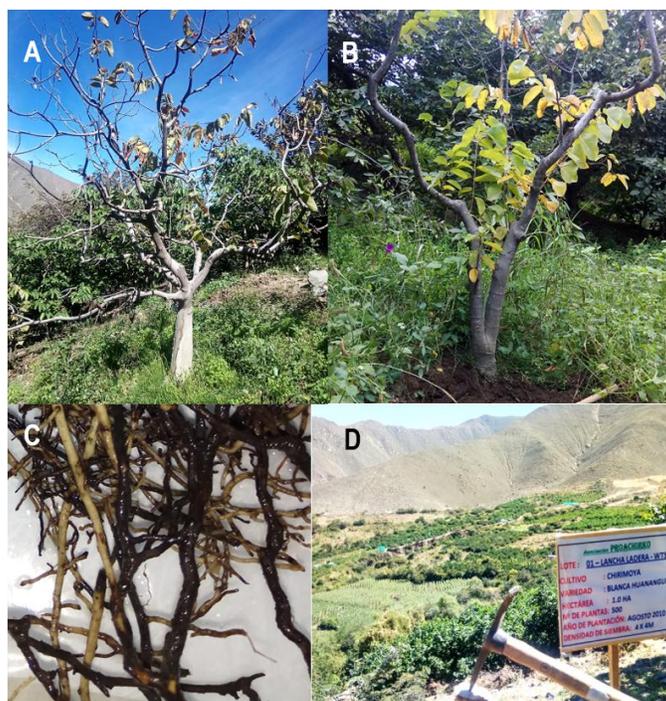


Figura 1. (A) Planta de chirimoya enferma de Huanangui. (B) Planta del valle de Cumbe. (C) Raíces de chirimoya con necrosis de Huanangui. (D) Cultivo de chirimoya en valle de Huanangui.

Se seleccionaron raicillas con diámetro de 2 a 5 mm y ligera necrosis, extraídas a una profundidad de 15 a 20 cm. De cada árbol, se recolectaron de 20 a 30 gramos de muestra, utilizando tijeras desinfectadas con alcohol. Las raicillas fueron colocadas en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio. En total, se obtuvieron 24 muestras: 12 del valle de Huananguí, 8 del distrito de San Antonio de Otazo (Cumbe) y 4 del distrito de Huaral.

En el laboratorio, las raicillas se lavaron con agua potable y luego sumergidas en agua destilada durante 48 h, renovando el agua destilada cada 12 h para eliminar polifenoles y reducir las poblaciones bacterianas. Con una tijera desinfectada se cortaron trozos de raicillas entre 1 a 1,5 cm de longitud, de las zonas intermedias entre área sana y necrótica. Los trozos se desinfectaron con una solución clorinada a 300 ppm de hipoclorito de calcio por 2 min, enjuagándose después con agua destilada estéril. Los trozos fueron sembrados en placas de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA) + PARHB, modificando al medio de cultivo propuesto por Drenth y Sendall (2004); empleando: 10 mg de pimaricina, 125 mg de ampicilina, 10 mg de rifampicina, 50 µl de hymexazol (Tachigaren) y 20 mg de benomyl (Benlate), se utilizó una cabina de flujo laminar Biobase modelo BBS-H1300, luego, se incubó a 25 °C durante 4 d en oscuridad, observándose micelio cenocítico, con hinchamientos. El aislamiento se realizó en el laboratorio de la Universidad Católica Sedes Sapientiae de Huaura.

Caracterización morfológica. Los aislados se purificaron mediante cultivos monohifales, se transfirieron secciones de puntas de hifas del patógeno a placas de Petri con PDA y se incubaron a 24 °C por 7 d. Las características culturales de colonia del patógeno y el diámetro de crecimiento micelial se evaluaron en medio PDA. Las estructuras fúngicas asexuales fueron obtenidas de colonias del patógeno desarrollado en medio V8 después de incubar durante 7 d a 24 °C, que fueron llevados al microscopio de luz a 200x y 400x (Motic BA310E, contraste LED) para observar los esporangios, esporangióforos, clamidospora, midiendo el largo (L), ancho (A) y relación (L/A) de 40 esporangios y diámetro (µm) de 40 clamidosporas. La descripción fue de

acuerdo con los criterios establecidos por Erwin y Ribeiro (1996).

Para la obtención de esporangios, los aislados se multiplicaron en medio V8 según la metodología de Drenth y Sendall (2004) con modificaciones para este estudio (20 g agar Oxoid, 200 ml jugo V8 y 5,0 g de CaCO₃) incubándose durante 5 d a 24 °C, del cual se extrajeron trozos de medio de cultivo (con micelio) de 0,5 x 6,0 x 0,3 cm, transfiriéndose en placas de Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo 15 ml de una solución suelo no esterilizada. La solución suelo se preparó mezclando 5 g de suelo (recogida a 10 cm de profundidad de la zona de la raíz de chirimoya de Huananguí) con 01 litro de agua destilada estéril, la solución se agitó y se dejó reposar y sedimentar durante 18 h; transcurrido el tiempo, con una pipeta graduada se tomó del sobrenadante la solución suelo. Luego las placas de Petri se incubaron a 25±1 °C, durante 4 d a fotoperiodos diarios de 12 a 13 h, hasta la formación de esporangios. Luego, se sometió a 4 °C por 60 min para forzar la liberación de zoosporas.

Desarrollo de micelio a diferentes Temperaturas. Para determinar la relación de crecimiento micelial de los aislados a diferentes temperaturas se incubaron a 15, 20, 25, 30 y 35 °C, durante 5 d en medio V8 y PDA. Se evaluó la longitud del diámetro de crecimiento, trazando dos líneas perpendiculares en el dorso de la placa de Petri de 9 cm de diámetro (Scanu, et al., 2014).

Prueba de patogenidad. Los aislados de *P. cinnamomi* se inocularon en plantas de chirimoya de cuatro meses de edad propagadas de semilla sexual del ecotipo “Blanca de Huananguí” proporcionada por productores de Huananguí (Proachirko). Las plantas se mantuvieron en bolsas de plástico negras de 30 cm de altura y 15 cm de diámetro. El sustrato utilizado fue una mezcla esterilizada de suelo con textura franco limoso y cáscara de arroz en una proporción 4:1 (v/v). El inóculo de *P. cinnamomi*, se multiplicó en granos de trigo, para lo cual el cereal se remojó por 12 h, se oreó y depositó 250 g en bolsas de polipropileno. Luego, se esterilizó en autoclave vertical Fravil modelo AVDA50, por 30 minutos, se enfrió y se inoculó dos trozos de 5x2 cm con crecimiento activo de micelio multiplicado en PDA y se incubó a 24 °C por 21 d. Posteriormente, se inocularon 20 g de trigo colonizado con micelio del patógeno en cada

planta de chirimoya, removiéndose previamente 5 cm de suelo en la zona adyacente a la base de la planta. Luego, la superficie fue cubierta con cáscara de arroz esterilizada para conservar la humedad, regándose constantemente para mantener las condiciones de humedad del suelo.

Identificación molecular. Los aislados se cultivaron en medio PDA a 24 °C durante 7 d, las hifas se depositaron en viales Eppendorf de 2,0 mL conteniendo 1,0 mL de etanol al 96 %. El ADN se extrajo siguiendo el método de Zelaya et al. (2011), adaptado al protocolo del kit Presto Mini gDNA Yeast.

De cada tubo Eppendorf se tomaron 200 mg de muestras y se colocaron en tubos de 1,5 mL, se agregaron 600 µL de GT Buffer, luego se agregaron 5 µL de RNase A (50 mg/mL), todo transferido a un tubo *bead beating*, y se incubó a 70 °C por 10 min. Luego, se agregaron 100 µL de PR Buffer, se mezclaron e incubaron en hielo por 5 min y se centrifugó a 11.000 rcf (fuerza centrífuga relativa) durante 3 min a temperatura ambiental; luego, se transfirieron 450 µL del sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml; sobre esto se

agregaron 450 µL de GB Buffer y 450 µL de etanol absoluto; la mezcla se homogenizó y centrifugó a 16.000 rcf por 1 min para luego descartar el volumen precipitado y agregar 400 µL de W1 Buffer sobre la columna GD; se centrifugó nuevamente durante 30 s, se descartó el volumen precipitado y se agregaron 600 µL de Wash Buffer. Posteriormente, se repitió el centrifugado, se descartó nuevamente el volumen precipitado, se volvió a colocar la columna en el mismo tubo y se centrifugó esta vez durante 3 min. La columna GD seca se transfirió en un tubo de 1,5 mL, y se agregaron 100 µL de Elution Buffer precalentado a 70 °C, y se centrifugó por última vez durante 2 min a temperatura ambiental. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso. El control de calidad de ADN se cuantificó en espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (NanoDrop OneC, Thermo Scientific) y gel de agarosa. El gel fue preteñido con RedSafe (Intron Biotechnology) y visualizado en un transiluminador de luz LED azul. Para la amplificación mediante el PCR se utilizaron primers (cebadores) como se indica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Locus y primers utilizados en la amplificación de ADN de *Phytophthora cinnamomi*.

Región	Primer	Secuencia 5´-3´primers forward	Referencia	Temperatura hibridación en PCR
<i>β-Tub</i>	BTubF1	GCCAAGTTCTGGGAGGTCATC	Olson y Benson, 2011	60 °C
	BTubR1	CCTGGTACGCTGGTACTCAG		
<i>Cox2</i>	FM75	CCTTGGCAATTAGGATTTCAAGAT	Martin y Tooley, 2003	54 °C
	FM78	ACAAATTCACACTACATTGTCC		
<i>EF1-α</i>	EF1AF	TCACGATCGACATTGCCCTG	Olson y Benson, 2011	60 °C
	EF1AR	ACGGCTCGAGGATGACCATG		

Para la mezcla en el termociclador (Thermo Scientific) se utilizó 1µL de ADN de 50 ng de la región indicada, 0,125 µL Taq polimerasa (ACTaq), 2,0 µL dNTP (ACTaq), 4,0 µL solución tampón (ACTaq) y 0,5 µL de los primers. Los amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5 % teñidos con RedSafe. Los fragmentos de PCR positivos fueron purificados con el kit GenepHlow Gel/PCR (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan), de acuerdo con su protocolo de la marca. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados mediante la tecnología Sanger capilar por MacroGen Korea Inc. Los electroferogramas con las secuencias en formato AB1 se editaron con el programa Mega versión

11, almacenándose en formato fasta y se compararon con las secuencias existentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el programa Basic Local Aligment Search Tool (BLAST).

Análisis filogenético. Las secuencias de los aislados obtenidos se compararon con otras especies de *Phytophthora* y *P. cinnamomi* relacionadas, cuyas accesiones fueron tomadas del Gen Bank (Cuadro 3). Todas las secuencias se ensamblaron y alinearon con el programa Mega 11 (Tamura et al., 2021), elaborándose el árbol filogenético de los aislados utilizando el criterio de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura y Nei (1993) con 1000 bootstrap.

Análisis estadístico. Se comparó las dimensiones de diámetro de colonias crecidas en PDA y Agar V8 en 15, 20, 25, 30 y 35 °C y el promedio de medidas de diámetro de clamidosporas en PDA. Para determinar la temperatura óptima de crecimiento, se estableció el diseño experimental completamente al azar

(DCA). El análisis de variancia, la prueba de comparación entre medias de Tukey ($p \leq 0,05$), distribución de frecuencias se realizaron utilizando programa IBM SPSS Statistics v. 24. Para las dimensiones de relación L/W de esporangios se utilizó la prueba de frecuencias.

Cuadro 3. Especies de *Phytophthora* y accesiones del GenBank utilizadas en la concatenación y construcción del árbol filogenético con los aislados, para las regiones Cox2 y EF1- α .

Clado	Especie	Accesión		Referencia
		Cox2	EF1- α	
2b	<i>P. capsici</i>	OP681096	HQ725529	Zumaila, 2023; Quesada et al., 2023
9a	<i>P. chrysanthemi</i>	AB465510	MG601091	Naher et al., 2016
9a	<i>P. chrysanthemi</i>	AB465509	KY363524	Naher et al., 2016; Goetz et al., 2017
7c	<i>P. cinnamomi</i>	KP183226	HM041799	Scarlett et al., 2016; Dos Santos et al., 2016
7c	<i>P. cinnamomi</i>	GU221969	MH358972	Abad et al., 2023a
2c	<i>P. citricola</i>	GU221976	ON246905	Nechwatal et al., 2001
2a	<i>P. citrophthora</i>	GU221980	MH358975	Abad et al., 2023a
7a	<i>P. fragariae</i>	GU222012	MH358990	Abad et al., 2023a
7a	<i>P. fragariae</i>	GU222014	EU079745	Blair et al., 2008
6a	<i>P. humicola</i>	GU222031	MH359001	Abad et al., 2023a
1c	<i>P. infestans</i>	KR046589	MN422925	Kumar et al., 2015; Wang et al., 2020
6a	<i>P. inundata</i>	OM468577	AY659727	Mostowfizadeh y Banihashemi, 2016
1c	<i>P. ipomoeae</i>	GU222047	MH359012	Abad et al., 2023a
6b	<i>P. megasperma</i>	DQ365747	MH359029	Goker et al., 2007; Abad et al., 2023a
1d	<i>P. nicotianae</i>	OP743912	MZ447852	Zhou et al., 2022
9a	<i>P. parsiana</i>	GU222102	MH359050	Abad et al., 2023a
1c	<i>P. phaseoli</i>	GU222106	MH359054	Abad et al., 2023a
3	<i>P. pseudosyringae</i>	GU222119	KY322150	Fajardo et al., 2017

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica y cultural. De las muestras recolectadas provenientes de los diferentes valles (Cuadro 1), se lograron obtener siete aislados. Los siete aislados en PDA desarrollaron micelio algodonoso, de color blanco y patrón de crecimiento tipo roseta o camelia (petiolado), gran parte del micelio con crecimiento aéreo. En medio V8, el micelio presentó un aspecto algodonoso, frondoso y ligeramente en forma de roseta, con un patrón petiolado menos pronunciado (Figura 2). Estas características coinciden con las descritas por Erwin y Ribeiro

(1996), quienes identificaron rasgos similares en diversas especies del género *Phytophthora*.

Las hifas fueron cenocíticas, torulosa y coraloide, hialinas, con abundantes hinchamientos globosos, de ramificación irregular simple y botryosa, con presencia de muchas clamidosporas solitarias y en grupos, lateral, intercalar y terminal, hialino globosa a subglobosa, en algunas partes en forma irregular (Figura 3). Al incubar el micelio en solución suelo, a partir de las 72 h se observó abundante formación de esporangios ovoides, algunos obturbada y sin papila (Figura 3) (Drenth y Sendall, 2004). Estos esporangios después de sometidas a 4 °C durante 60 min liberaron abundantes zoosporas.

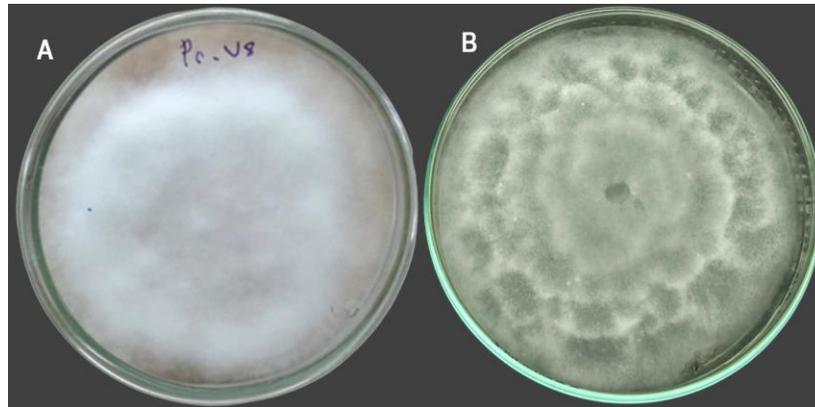


Figura 2. Crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* en medio agar V8 (A) y PDA (B).

Las características descritas de los siete aislamientos (PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6 y

PC7) corresponden a *P. cinnamomi* (Hardham y Blackman, 2018; Abad et al., 2023b).



Figura 3. Estructuras asexuales de *Phytophthora cinnamomi* aislados de chirimoya (*Annona cherimola*) en medio agar V8. A: Micelio y esporangióforos, B: esporangio caduco, C y D: esporangio obturbinado y ovoide, E: hifas y clamidosporas.

Los esporangios de los siete aislamientos de *Phytophthora* presentaron una media de 58,7-51,1 x 41,8-36,1 μm en largo y ancho, respectivamente. La media de la relación L/W varió entre 1,41-1,46, las clamidosporas se encontraban entre 40,4-42,6 μm (Cuadro 4). Estas medidas concuerdan con lo descrito por Erwin y Ribeiro (1996) y Abad et al. (2023b). Huarhua et al. (2018) informan que la relación L/A de esporangios para aislados obtenidos desde Arándano en Perú varió entre 1,36-1,40. También, coinciden con lo reportado

por Scanu et al. (2014) quienes encontraron dimensiones de 77,9-48,1 x 29,6-45,7 μm de largo y ancho y una relación de largo/ancho de 1,5-1,6 como media de esporangios en cinco aislados de *P. cinnamomi* de plantas de *Arbutus unedo*, y con Larach et al. (2009) quienes informan que los esporangios obtenidos de plantas de arándano presentaron medidas de 61 x 37 μm . En el mismo Cuadro 4, se observa medias del diámetro de crecimiento de la colonia de *P. cinnamomi* en medio PDA, que fue de 48 a 52 mm y en medio

V8 de 55 a 58 mm, resultado que se asemeja a Zentmyer et al. (1976) que indican que este patógeno creció entre 41 a 85 mm de diámetro a 25 °C.

Cuadro 4. Dimensiones de esporangios, clamidosporas, relación largo/ancho y temperatura de crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* aislados desde raíces de chirimoya (*Annona cherimola*).

Aislados	Esporangio (µm)				L/W	Clamidospora	Diámetro de colonia a 25 °C a los 5 días (mm)			
	Largo		Ancho				Media	Media	PDA	V8
	Media	Rango	Media	Rango						
PC1	54,9	79-41	38,0	52-26	1,45	41,9	51,02 a	58,14 a		
PC2	53,6	88-39	37,6	60-28	1,43	40,8	51,68 a	58,92 a		
PC3	58,7	90-45	41,8	61-34	1,41	41,1	52,21 a	58,37 a		
PC4	53,7	86-37	37,9	61-28	1,41	40,5	50,20 a	57,23 a		
PC5	55,3	72-41	38,2	48-28	1,46	40,4	48,20 a	54,95 a		
PC6	56,1	72-42	39,4	48-32	1,42	41,4	50,60 a	57,68 a		
PC7	51,1	63-39	36,1	42-30	1,42	42,6	49,02 a	55,86 a		

L/ W = Largo/Ancho de esporangio. Las medias son resultado de 40 esporangios y clamidosporas.

En la Figura 4 se observa que la temperatura óptima de desarrollo *in vitro* para los siete aislados de *P. cinnamomi* fue entre 25 a 27 °C. Esto coincide con los resultados de Scagel et al. (2023) quienes afirman que *P. cinnamomi* desarrolla

óptimamente a 25,3 °C, mientras que Bregant et al. (2021) encontraron que el valor más alto de crecimiento fue a 25 °C y Erwin y Ribeiro (1996) indican que la temperatura óptima de crecimiento es entre 24 a 28 °C.

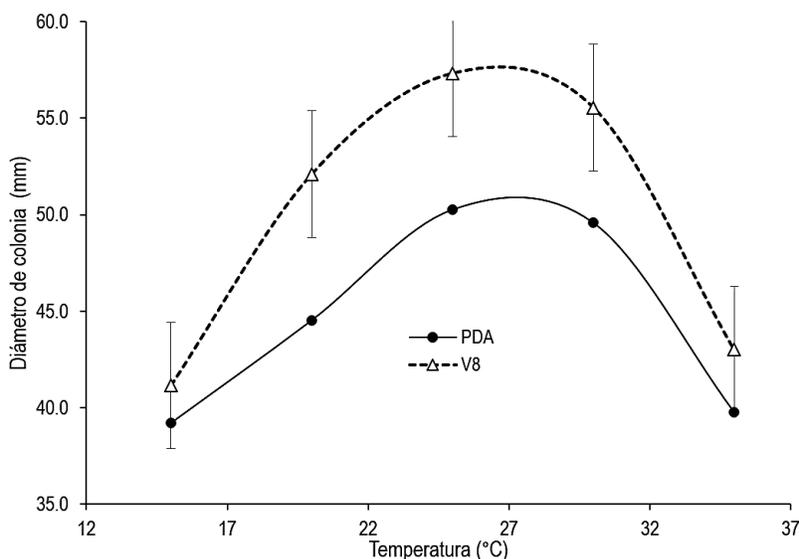


Figura 4. Diámetro de colonia de *Phytophthora cinnamomi* en PDA y V8 a diferentes temperaturas a los 5 días.

La frecuencia de distribución obtenida para las dimensiones de diámetro de clamidosporas y relación L/W de los aislados fue aproximadamente de una curva de distribución normal, es decir, el 91,7 % de mediciones de clamidosporas se ubicó entre 35 a 48 µm, en cuanto a relación L/W, el 83,3 % de esporangios (200) se encontró entre 1,34 y 1,50 (Figura 5).

Prueba de patogenicidad de los aislados.

Los resultados mostraron que los siete aislados identificados molecularmente como *P. cinnamomi* produjeron síntomas variables de la enfermedad cuando fueron inoculadas en plantas de *A. cherimola* ecotipo Blanca de Huananguí, evaluados después de 50 d de inoculación. Todas las plantas externamente mostraron decaimiento, defoliación y amarillamiento de las hojas basales

(Figura 6). Las raíces presentaron lesiones necróticas en la corteza interna y externa en un promedio de 60 % de la proporción radical comparado con el testigo. El reaislamiento del tejido afectado a partir de raíces con necrosis produjeron colonias, micelio y esporangios idénticos a las colonias originales de los

aislamientos utilizados para la inoculación. Mientras que los síntomas de decaimiento y amarillamiento coinciden con lo observado en los diferentes campos de chirimoya. Esta prueba de patogenicidad permitió identificar que los aislamientos obtenidos corresponden a la especie *P. cinnamomi*.

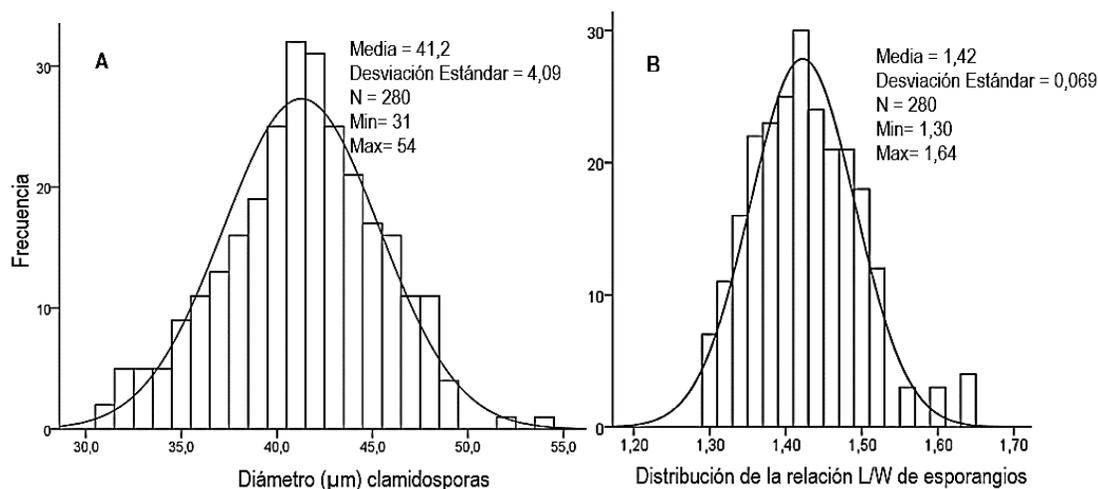


Figura 5. Frecuencia de distribución de diámetros de clamidosporas (A) y relación L/W de esporangios (B) de *Phytophthora cinnamomi* en chirimoya. L=largo, W=ancho.



Figura 6. Plantas de *Annona cherimola* “Blanca de Huanagui” 50 días después de inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* (A) y plantas testigo sin inocular (B).

Identificación molecular de los aislamientos.

Los resultados de la identificación molecular y filogenética de los siete aislados de *P. cinnamomi* se muestran en la Figuras 7, 8 y Cuadro 4. La amplificación y secuenciación de ADN fue exitosa en 3 de los 5 marcadores genéticos utilizados, se

pudo amplificar la región ITS con el marcador genérico TCCGTAGGTGAACCTGCGG, TCCTCCGCTTATTGATATGC (Olson y Benson, 2011), sin embargo, la secuenciación para todos los aislados con este locus no fueron como lo esperado, por lo que se descartó este marcador.

Con el marcador β -Tub en uno de los aislados se logró completar la secuenciación, que al ser comparados con los nucleótidos depositados en el GenBank resultaron para *P. cinnamomi*. Para las regiones *EF1- α* y *Cox2* se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 960 y 926 pb respectivamente, con estas secuencias se completaron exitosamente la identificación y generación del árbol filogenético con 18 accesiones del GenBank y una accesión correspondiente al hongo *Pythium* sp. (GU222159), como grupo externo, realizándose con las secuencias concatenada de estos marcadores para los siete aislados (Figura 7).

Los resultados de la secuenciación los siete aislados comparados con los existentes en BLASTn del NCBI, indicaron la existencia de una estrecha relación de identidad con *P. cinnamomi*, tanto para las regiones *Cox2* y *EF1- α* . La identidad nucleotídica de la región *Cox2* de los aislados PC1, PC2, PC3, PC4, PC5 variaron entre el 99,22 al 99,78 % con la accesión KP070655 con el strain *P. cinnamomi* 140II y de los aislados PC6 y PC7 variaron entre el 99,46 y 99,23 % con la accesión JF771369. Con la región *EF1- α* , también, presentaron una relación de identidad entre el 99,04 al 100 % para *P. cinnamomi*, sin embargo, correspondió a diferentes números de accesiones.

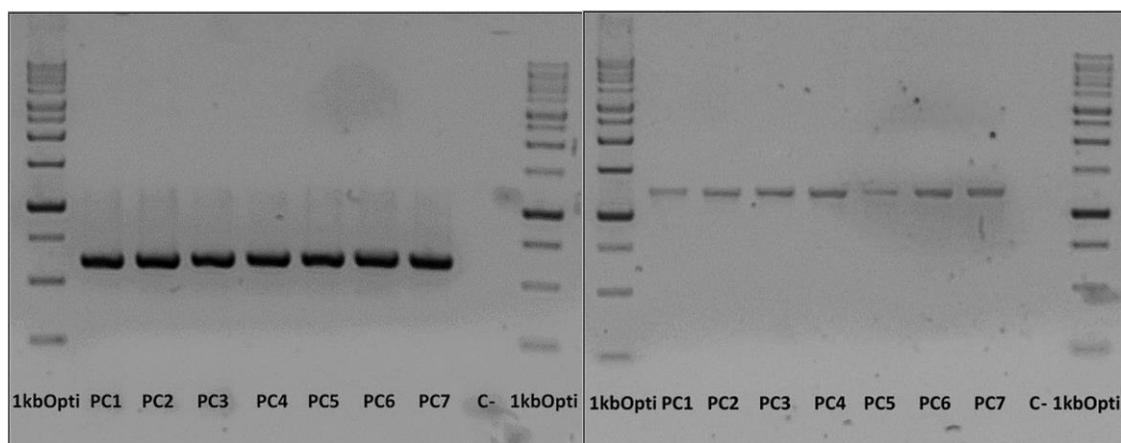


Figura 7. Visualización por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los amplificados por PCR, preteñidos con RedSafe (Intron Biotechnology, Corea del Sur), con los primers FM75 y FM78 para *Cox2* (izquierda), EF1AF y EF1AR para *EF1- α* (derecha) de los siete aislados (PC) desde Chirimoya.

Los análisis filogenéticos realizados en forma separada para las secuencias de los marcadores *Cox2* y *EF1- α* utilizando la probabilidad de máxima verosimilitud (MV), mostraron topologías aproximadamente similares. Sin embargo, al concatenar las secuencias de ambos genes (en Mega 11), *P. cinnamomi* se ubica en el clado 7 (sub clado 7b) (Martin et al., 2012) junto a *P. fragariae* (sub clado 7a) (Bregant et al., 2021), al utilizar secuencias de otras accesiones del GenBank correspondientes a *P. cinnamomi* (Cuadro 3). El análisis fue respaldado con el mejor modelo TIM+F+I+G4 (Tamura et al., 2021). El árbol filogenético muestra el 99 % (de 1000 réplicas) de arranque en el nodo del clado 7 y el máximo soporte (100 %) de MV entre especies de *P. cinnamomi*. Se considera un sub clado

monofilético entre las especies referencia del GenBank (accesiones: GU221969, KP183226 y HM041799, MH358972 con marcadores *Cox2* y *EF1- α* respectivamente) y los aislados obtenidos (Figura 8). En el árbol filogenético generado se observa que el clado 1 y 2 tienen 92 % de soporte, considerados lejanos fenotípicamente, se encuentran especies como *P. capcisi*, *P. infestans*, *P. citrícola*, *P. phaseoli*, *P. nicotianae* todos ellos con esporangios papilados. *Pythium* sp. como grupo externo está muy alejado, demostrándose que es evolutivamente divergente, por lo que la topología del árbol tiene consistencia.

Los resultados, son similares a lo hallado por Abad et al. (2023b) quienes manifiestan que el clado 7 se caracteriza por presentar esporangios no papilados en esporangióforos simples o

raramente ramificados. Es así como *P. cinnamomi* se ubica en el clado 7c, siendo un patógeno muy agresivo que ataca plantas perennes, ornamentales y árboles silvestres (Burgess et al., 2017). El aislado PC7 de *P. cinnamomi* obtenido de la raíz de *Persea americana* de la localidad de Huaral probablemente sea la misma cepa que ataca chirimoya, comparando nuestro aislado con las del NCBI para el gen *Cox2*, corresponden a *P. cinnamomi* strain 1401, es decir, se trataría de la misma cepa que ataca aguacate y chirimoya.

Este estudio representa el primer informe de *P. cinnamomi* afectando raíces de plantas de chirimoya en varias localidades de la costa central del Perú, tiene otros hospedantes importantes

como el arándano (Huarhua et al., 2018) y el aguacate (Gastañadui et al., 2021). Los huertos de este frutal que se manejan en las localidades descritas son tradicionalmente mediante riego por inundación, con frecuencias distanciadas, por lo que el agricultor para garantizar la persistencia de la humedad del suelo por más tiempo se ven obligados a inundar sus campos favoreciendo la propagación del patógeno. En el campo, se observó que los síntomas de mayor severidad, como marchitez, amarillamiento y decaimiento de las plantas, ocurren entre diciembre y abril. Este período coincide con las temperaturas más altas del suelo en las zonas de estudio (24-25 °C) y con suelos de textura pesada, factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad.

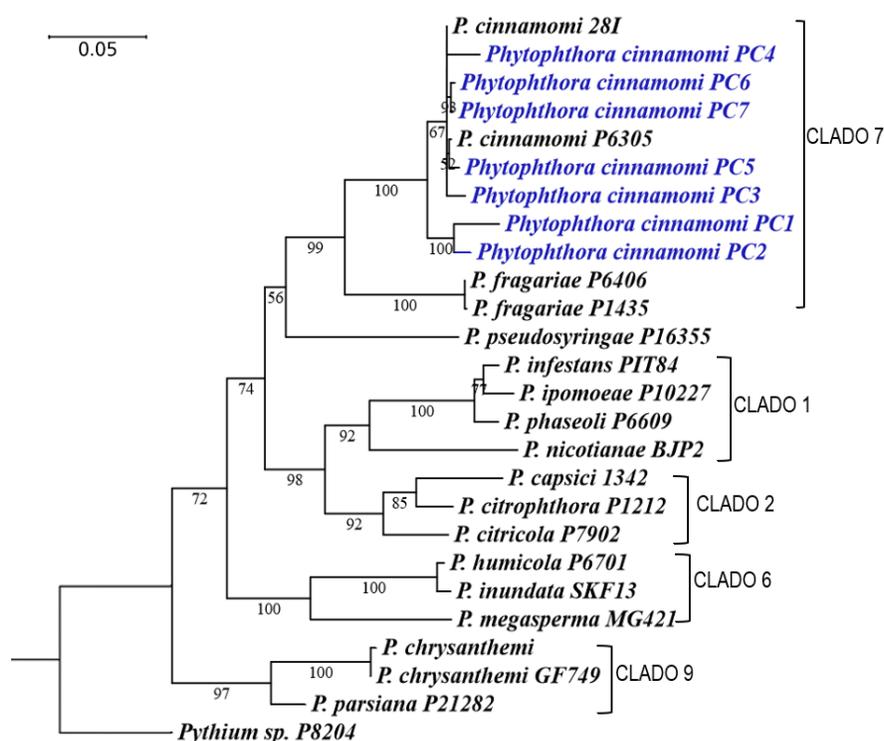


Figura 8. Árbol filogenético de los aislados de *Phytophthora cinnamomi* (azul) a partir de las secuencias de nucleótidos concatenadas de las regiones citocromo oxidasa II (*Cox2*) y factor de elongación alfa 1 (*EFl-α*), utilizando como mejor modelo TIM+F+I+G4 y máxima verosimilitud inferido con IQ-TREE v. 2 y editado en Mega 11. El número de strain de cada especie corresponde al de *Cox2*. Se utilizó *Pythium* sp como grupo externo.

CONCLUSIONES

La caracterización morfológica, pruebas de patogenicidad, identificación molecular y la topología consistente del árbol filogenético basado en máxima verosimilitud de las regiones *Cox2* y

EFl-α permitieron la identificación fehaciente de *Phytophthora cinnamomi* como patógeno de *Annona cherimola*. Este estudio reveló por primera vez a *P. cinnamomi* como causante de la pudrición de raíces en plantas de chirimoya en varias localidades de la costa central del Perú, esta

identificación del agente causal será útil para diseñar estrategias efectivas para su manejo.

LITERATURA CITADA

1. Abad, G., I. Burgess, T. Bourret, K. Bensch, S. Cacciola, B. Scanu et al. 2023a. *Phytophthora*: taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Studies in Mycology* 106: 259-348.
2. Abad, Z.G., T.I. Burgess, J. Redford, J.C. Bienapfl, R. Mathew, K. Srivastava y K. Jennings 2023b. IDphy: An international online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora*. *Plant Disease* 107(4): 987-998.
3. Bapat, V.A., U.B. Jagtap, S.B. Ghag y T.R. Ganapathi. 2019. Molecular approaches for the improvement of under-researched tropical fruit trees: jackfruit, guava, and custard apple. *International Journal of Fruit Science* 20(3): 233-281.
4. Blair, J.E., D. Coffey, Y. Park, M. Geiser y S. Kang. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45(3): 266-277.
5. Bregant, C., A. Mulas, G. Rossetto, A. Deidda, L. Maddau, G. Piras y T. Linaldeddu. 2021. *Phytophthora mediterranea* sp. nov., a new species closely related to *Phytophthora cinnamomi* from nursery plants of *Myrtus communis* in Italy. *Forests* 12: 682.
6. Burgess, T., J. Scott, K. Mcdougall, M. Stukely, C. Crane, W. Dunstan et al. 2017. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Global Change Biology* 23: 1661-1674.
7. Buse, T.E., Ch.M. Chong y M.J. Salazar. 2015. Modelo de gestión empresarial asociativo para PROACHIRKO, comunidad de Huanangui, Perú. *Industrial Data* 18(2): 14-19.
8. Del Castillo-González, L., S. Soudani, N. De La Cruz-Gómez, J.A. Manzanera y M. Berrocal-Lobo. 2024. An improved method to study *Phytophthora cinnamomi* Rands zoospores interactions with host. *BMC Plant Biology* 24(1): 508.
9. Dos Santos, R., A. Leita, M. da Silva, A. Fernandes y A. Falqueto. 2016. Evaluation of in vitro inhibition of mycelial growth of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by different products in Brazil. *African Journal of Microbiology Research* 10(47): 1992-1998.
10. Drenth, A. y B. Sendall. 2004. Isolation of *Phytophthora* from infected plant tissue and soil, and principles of species identification. In: Drenth and D.I. Guest (ed.). *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR. Canberra, Australia. pp. 94-102.
11. Durán, A.G., M.T. Gutiérrez, F.J. Mejías, J.M. Molinillo y F.A. Macías. 2021. An overview of the chemical characteristics, bioactivity and achievements regarding the therapeutic usage of acetogenins from *Annona cherimola* Mill. *Molecules* (Basel, Switzerland) 26(10): 2926.
12. Erwin, D.C. y O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathology Society. Saint Paul, Minnesota, USA. 592 p.
13. Fajardo, S.N., S. Valenzuela, A.F. Dos Santos, M.P. González y E.A. Sanfuentes. 2017. *Phytophthora pseudosyringae* associated with the mortality of *Nothofagus obliqua* in a pure stand in central-southern Chile. *Forest Pathology* 47(6): e12361.
14. Gastañadui, P., R. Moreno, P. Quiroz-Delgado y W. Apaza-Tapia. 2021. Control of avocado root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* with different *Trichoderma* strains at Chavimochic Irrigation Project. *Peruvian Journal of Agronomy* 5(3): 78-86.
15. Gayoso B. y Ch. Chang. 2017. *Annona cherimola* Mill. "chirimoya" (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldia* 24(2): 619-634.
16. Gentile, C., G. Mannino, E. Palazzolo, G. Gianguzzi, A. Perrone, G. Serio y V. Farina. 2020. Pomological, sensorial, nutritional and nutraceutical profile of seven cultivars of chirimoya (*Annona cherimola* Mill). *Foods* (Basel, Switzerland) 10(1): 35.

17. Ghezzi, I. 2011. El análisis composicional en el estudio de la producción y distribución de la cerámica prehispánica. Bulletin de l'Institut français d'études andine 40(1):1-29.
18. Goker, M., H. Voglmayr, A. Riethmüller y F. Oberwinkler. 2007. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. Fungal Genetics and Biology 44(2): 105-122.
19. Hardham, A.R. y L.M. Blackman. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 19(2): 260-285.
20. Huarhua, M., J. Flores, R. Acuña y W. Apaza. 2018. Morphological and molecular identification of *Phytophthora cinnamomi* Rands as causal agent of crown and root rot in Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Peru. Peruvian Journal of Agronomy 2(2):14-21.
21. Kumar, S., P. Chowdappa, V. Krishna y H. Sandhya. 2015. Induction of defense-related proteins and growth promotion in tomato by mixture of *Trichoderma harzianum* OTPB3 and *Bacillus subtilis* OTPB1 and *Pseudomonas putida* OPf1 against *Phytophthora infestans*. African Journal of Microbiology Research 9(2): 96-110.
22. Larach, A., X. Besoain y E. Salgado. 2009. Crown and root rot of highbush blueberry caused by *Phytophthora cinnamomi* and *P. citrophthora* and cultivar susceptibility. Ciencia e Investigación Agraria 36: 433-442.
23. Martin, F. y P. Tooley. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. Mycologia 95(2): 269-284.
24. Martin, F., Z. Abad, Y. Balci y K. Ivors. 2012. Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. Plant Disease 96(8): 1080-1103.
25. MINAGRI. Ministerio de Agricultura y Riego. 2019. Anuario estadístico de producción agrícola 2018. Dirección General de Seguimiento y Evaluación de Políticas. Lima, Perú. 370 p.
26. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. y Z. Banihashemi. 2016. Species-specific PCR identification and detection of *Phytophthora drechsleri*, *P. cryptogea* and *P. erythroseptica*. Iranian Journal of Plant Pathology 51(4): 541-553.
27. Naher, L., M.A. Ali y S. Sheheli. 2016. Effect of Seed Treatment on Seed Borne Fungi of Rice. Progressive Agriculture 27: 48-56.
28. Nechwatal, J., A. Schlenzig, T. Jung, D.E. Cooke, M. Duncan y W.F. Osswald. 2001. A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. Forest Pathology 31(2): 85-97.
29. Olson, H., y D. Benson. 2011. Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 95(8): 1013-1020.
30. Quesada-Ocampo, L., C. Parada-Rojas, Z. Hansen, G. Vogel, C. Smart, M. Hausbeck et al. 2023. *Phytophthora capsici*: Recent progress on fundamental biology and disease management 100 years after its description. Annual Review of Phytopathology 61: 185-208.
31. Scagel, C.F., J.E. Weiland, R.B. Beck y J.N. Mitchell. 2023. Temperature and fungicide sensitivity in three prevalent *Phytophthora* species causing *Phytophthora* root rot in Rhododendron. Plant disease 107(10): 3014-3025.
32. Scanu, B., G. Hunter, B. Linaldeddu, A. Franceschini, L. Maddau, T. Jung et al. 2014. A taxonomic re-evaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species. Forest Pathology 44(1): 1-20.
33. Scarlett, K., D. Collins, L. Tesoriero, L. Jewell, F. Van Ogtrop y R. Daniel. 2016. Efficacy of chlorine, chlorine dioxide and ultraviolet radiation as disinfectants against plant pathogens in irrigation water. European Journal of Plant Pathology 145: 27-38.
34. Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10: 512-526.

35. Tamura, K., G. Stecher y S. Kumar. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
36. Tineo, J. 2019. Caracterización morfológica y análisis de la variabilidad genética de la colección nacional de germoplasma de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) del Perú. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Lima, Perú. pp. 2.
37. Wang, T., X. Wang, X. Zhu, Q. He y L. Guo. 2020. A proper PiCAT2 level is critical for sporulation, sporangium function, and pathogenicity of *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 21(4): 460-474.
38. Zelaya-Molina, L., M. Ortega y A. Dorrance. 2011. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnology Letters* 33(4): 715-720.
39. Zentmyer, G., J. Leary, L. Klure y G. Grantham. 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology* 66: 982-986.
40. Zhou, J., Y. Qi, J. Nie, L. Guo, M. Luo, H. McLellan et al. 2022. A *Phytophthora* effector promotes homodimerization of host transcription factor StKNOX3 to enhance susceptibility. *Journal of Experimental Botany* 73(19): 6902-6915.
41. Zumaila, F., A. Jeevalatha y C.N. Biju. 2023. Genetic diversity, mating type and pathogenicity of two *Phytophthora* species infecting black pepper in India. *3 Biotech* 14(1): 1.