

# Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings

## Caracterización y patogenicidad de un aislado de *Pythium aphanidermatum* causante de ‘damping off’ en plántulas de chile

Omar Jiménez-Pérez, Gabriel Gallegos-Morales\*, Francisco Daniel Hernández-Castillo, Melchor Cepeda-Siller, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México; Cesar Alejandro Espinoza-Ahumada, Instituto Tecnológico Superior De El Mante. Carretera Federal Libre Mante-Ciudad Valles Km 6.7, Congregación Quintero, Tamaulipas; C. P. 89930, México. \*Corresponding author: ggalmor@uaaan.edu.mx

Received: September 14, 2021.

Accepted: December 22, 2021.

Jiménez-Pérez O, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Cepeda-Siller M and Espinoza-Ahumada CA. 2022. Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 116-130.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-3>

First DOI publication: December 29, 2021.

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** The production of the pepper seedling (*Capsicum annuum*) is affected by the fungal complex that causes the ‘damping-off’, in which some species of the oomycete *Pythium* spp., stand out. The objective of the present study was to identify the causal agent of the death of pepper plants and evaluate its pathogenicity in

**Resumen.** La producción de plántula de chile (*Capsicum annuum*) es afectada por el complejo de hongos causantes del ‘damping off’, donde sobresalen especies del oomyceto *Pythium* spp. El objetivo del presente estudio fue identificar el agente causal de la muerte de plantas de chile y evaluar su patogenicidad en semillas y plántulas de chile. Se aisló un oomyceto de crecimiento rápido y agresivo en plantas de chile, identificado morfológicamente como *P. aphanidermatum* en base a sus estructuras de reproducción sexual y asexual y, mediante técnicas moleculares. Este aislamiento tuvo un alto grado de patogenicidad *in vitro* en pre-emergencia y post-emergencia en chile, mostrando el 100% de mortalidad. Además, presentó una tasa alta de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo (V8- Agar, Maíz Agar, Maíz Papa Agar, Papa Dextrosa Agar, Czapek y Avena Agar), siendo el medio V8-Agar el único medio donde desarrolló estructuras

pepper seeds and seedlings. A fast and aggressive growing oomycete was isolate from pepper plants, morphologically identified as *P. aphanidermatum* based on its sexual and asexual reproduction structures and, by molecular techniques. This isolate had a high degree of *in vitro* pathogenicity in pre-emergence and post-emergence in Chile, showing 100% mortality. In addition, it presented a high rate of mycelial growth in different culture media (V8-Agar, Corn Agar, Corn Potato Agar, Potato Dextrose Agar, Czapek & Oat Agar), being in V8-Agar medium the only medium where it developed reproduction structures sexual and asexual. The isolation presented a mycelial growth rate of  $58.3 \pm 0.3$  mm / day at  $26 \pm 2$  °C in PDA medium. Due to its rapid growth and its high degree of pathogenicity *in vitro*, it is an unusual and aggressive isolate for pepper seedlings.

**Key words:** growth, culture media, oomycete, virulence, reproduction.

In Mexico, the production of pepper seedlings is severely affected by the disease known as ‘damping off’, with losses ranging between 10 and 100%. The disease is caused by a complex of species of *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* and *Pythium* (Hernández, 2018), although the *Pythium* species are considered the main causal agent (Elshahawy *et al.*, 2018; Hernández, 2018). *Pythium* is an oomycete which is differentiated from true fungi in that it contains cellulose and  $\beta$ -glucans as the constituents of its cell wall. This genus is distributed globally, and it is favored by climates with high humidity levels and highly varied temperatures, depending on the species (Schroeder *et al.*, 2013). The initial infection can be triggered by the fragment of a mycelium in growth or the germination of zoospores, oospores and even a sporangium. In the

de reproducción sexual y asexual. El aislamiento, presentó una tasa de crecimiento micelial de  $58.3 \pm 0.3$  mm/día a  $26 \pm 2$  °C en el medio PDA. Por su rapidez de crecimiento y su alto grado de patogenicidad *in vitro*, es un aislado inusual y agresivo para plántula de Chile.

**Palabras clave:** crecimiento, medios de cultivos, oomiceto, virulencia, reproducción.

En México, la producción de plántula de Chile es severamente afectada por la enfermedad conocida como ‘damping off’ o ahogamiento, con pérdidas que oscilan del 10 al 100%. La enfermedad es causada por un complejo de especies de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y *Pythium* (Hernández, 2018), sin embargo, las especies de *Pythium* se les considera como el principal agente causal (Elshahawy *et al.*, 2018; Hernández, 2018). *Pythium* es un oomiceto que se diferencia de los hongos verdaderos al poseer celulosa y  $\beta$ -glucanos como constituyentes de su pared celular. Este género tiene distribución mundial y le favorecen climas con alta humedad y temperaturas muy variadas, dependiendo de la especie (Schroeder *et al.*, 2013). La infección inicial se puede originar por un fragmento de micelio en crecimiento o la germinación de zoosporas, oósporas y hasta de un esporangio. En la etapa de penetración, las especies de *Pythium* requieren de alta humedad y se introduce a través de heridas o ejerciendo presión mecánica y degradación enzimática de los tejidos de la planta. En raíces jóvenes penetra por las puntas de las raicillas (Agrios, 2005). Este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir como saprofito en restos de plantas y como parásito en más de 60 géneros de cultivos pertenecientes a las familias solanáceas, cucurbitáceas, entre otras (Agrios, 2005; Díaz *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2011). En el establecimiento de

stage of penetration, the *Pythium* species require high humidity levels and they introduce themselves through lesions or exerting mechanical pressure and via the enzymatic degradation of the plant tissues. In young roots it penetrates through the tips of the rootlets (Agrios, 2005). This microorganism can survive as a saprophyte in the remains of plants and as a parasite in over 60 genera of crops belonging to the Solanaceae, cucurbit families, and others (Agrios, 2005; Díaz *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2011). In the establishment of trays or seedbeds, the damage by *Pythium* spp. presents itself in the stage of pre- and post-emergence (Gómez *et al.*, 2011; Grijalba and Ridao, 2017), in which it causes the rotting of seeds, strangling of the base of the stem, root necrosis, wilt, lodging and the death of seedlings (Gómez and Melero, 2011; D'Angelo, 2016; Rivera and Fernández, 2017). Adult plants are generally affected at the level of roots with small lesions in the epidermis, although it may damage the fruits exposed to high levels humidity or in postharvest (Fry *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2018). This genus has a high growth rate (Schroeder *et al.*, 2013) of up to 7-34 mm a day, depending on the species, the temperature and the substrate in which it develops (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Approximately 160 species have been documented from the genus *Pythium* (Grijalba and Ridao, 2017), out of which the most important are *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum* and others (Díaz *et al.*, 2011; Grijalba *et al.*, 2015; Ríos and de Rocha, 2018; Grijalba *et al.*, 2020). The morphological identification of *Pythium* spp. is based on the shape and dimensions of the sexual and asexual reproductive structures, such as sporangia, oogonia, type of oospore (aplerotic or plerotic) and the number and position of the antheridium when attaching with the oogonium. Due to the

charolas o almácigos, el daño por *Pythium* spp., se presenta en etapa de pre y post-emergencia (Gómez *et al.*, 2011; Grijalba y Ridao, 2017), en las que ocasiona pudrición de semillas, estrangulamiento de la base del tallo, necrosis de raíces, marchitamiento, acame y muerte de plántulas (Gómez y Melero, 2011; D'Angelo, 2016; Rivera y Fernández, 2017). Las plantas adultas generalmente son afectadas a nivel de las raíces con lesiones pequeñas en la epidermis, aunque puede llegar a dañar los frutos expuestos a alta humedad o en postcosecha (Fry *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2018). Este género tiene una alta tasa de crecimiento (Schroeder *et al.*, 2013), pudiendo ser entre 7-34 mm diarios, dependiendo de la especie, la temperatura y del sustrato en el que se desarrolla (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Se han documentado aproximadamente 160 especies pertenecientes al género *Pythium* (Grijalba y Ridao, 2017), donde las de mayor importancia son *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum* entre otras (Díaz *et al.*, 2011; Grijalba *et al.*, 2015; Ríos y de Rocha, 2018; Grijalba *et al.*, 2020). La identificación morfológica de *Pythium* spp., se basa en la forma y dimensiones de las estructuras de reproducción sexual y asexual como son, esporangios, oogonio, tipo de oóspora (aplerótica o plerótica) y el número y posición del anteridio con su unión al oogonio. Debido a que existe mucha variación de estas estructuras entre las especies, resulta difícil su identificación morfológica, por lo que se recurre a la identificación molecular para obtener una caracterización con mayor confiabilidad (Díaz *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2013). Durante un recorrido en Julio del 2019 en invernaderos establecidos con chile, en el municipio de Parras de la Fuente, Coahuila, México, se detectó la muerte de plántulas. En esta región no se cuenta con registros de patógenos en chile causantes de "damping off", por lo que se decidió identificar

high variation of these structures among species, their morphological identification is difficult, therefore we resort to molecular identification to obtain a more reliable characterization (Díaz *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2013). During a visit in July, 2019, to greenhouses with pepper plants in the municipal area of Parras de la Fuente, Coahuila, Mexico, dead seedlings were found. In this region there are no records of pathogens in pepper causing damping off, therefore we decided to identify the causal agent; preliminary studies indicated that the oomycete related to the disease displayed characteristics of the genus *Pythium*. Due to this, the present study was carried out with the following aims: A) to identify the causal agent of the deaths of pepper plants in the greenhouses in Parras, Coahuila, Mexico and B) to evaluate its pathogenicity in seeds and seedlings, as well as its behavior and growth rate in different culture media in the laboratory.

**Location of the experiment.** This work was carried out in the Microbiology Laboratory of the Department of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (Antonio Narro Autonomous Agrarian University - UAAAN) located in Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.

**Isolation of the phytopathogen.** Serrano pepper seedlings with the typical symptoms of ‘damping off’ were collected from three greenhouses in the area of Parras de la Fuente, Coahuila. The seedlings were taken to the laboratory, where they were washed with tap water and the roots were separated from the stems. Later, using a sterilized scalpel, they were cut into small pieces which were then disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 3 min, washed in three steps of sterile distilled water and left to dry on brown paper under

al agente causal, estudios preliminares indicaron que el Oomyceto asociado a la enfermedad mostró características del género *Pythium*. Por lo anterior se llevó a cabo el presente estudio con los siguientes objetivos. A) Identificar al agente causal de la muerte de plantas de chile en invernaderos de Parras, Coahuila, México y B) Evaluar su patogenicidad en semillas y plántulas además de su comportamiento y tasa de crecimiento en diferentes medios de cultivo en laboratorio.

**Ubicación del experimento.** Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicada en Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

**Aislamiento del fitopatógeno.** Se colectaron plántulas de chiles serrano con sintomatología típica de ‘damping off’ o ahogamiento en tres invernaderos de la región de Parras de la Fuente, Coahuila. Las plántulas se trasladaron al laboratorio, donde se lavaron con agua corriente y se separaron las raíces y tallos. Posteriormente, se cortaron en pequeños trozos con ayuda de un bisturí estéril, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, se lavaron en tres pasos de agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel estera estéril bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. Las porciones de raíz y tallo se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo V8- Agar (V8A) y se incubaron a  $26 \pm 2$  °C por 4 días, donde se presentó micelio hialino cenocítico, oogonios, anteridios y esporangios típicos del género *Pythium* (Van der Plaats-Niterink, 1981). Fragmentos de micelio se transfirieron a medio de cultivo agar agua (AA), 24 h después el aislamiento se purificó transfiriendo puntas de hifas a cajas Petri con medio V8A y se incubó a  $26 \pm 2$  °C con un

aseptic conditions in a laminar flow cabinet. The pieces of roots and stems were placed in Petri dishes with a V8-Agar (V8A) culture medium and incubated at  $26 \pm 2$  °C for 4 days, where cenocytic hyaline mycelium, oogonia, antheridia and typical sporangia of the genus *Pythium* (Van der Plaats-Niterink, 1981) appeared. Pieces of mycelium were transferred to water agar culture medium (AA) and 24 h later, the isolation was purified by transferring hypha tips into Petri dishes with V8A medium and incubated at  $26 \pm 2$  °C with a light period of 12:12 (light: darkness) for seven days for its identification, measurement of its growth rate and pathogenicity tests.

**Morphological identification.** This was carried out with direct observations of the mycelial growth, formation of sporangia, oogonia and antheridia developed over a sterilized seed, inoculated with a 3 mm piece of *Pythium* spp. cultivation placed on a Petri dish with AA culture medium and incubated for seven days in which the mentioned structures of this oomycete would form. Observations were carried out using a Keyence VHX-7000 digital microscope and a Motic BA210E compound microscope, in which microscopic preparations were observed. The identification was carried out following the descriptive keys by Van der Plaats-Niterink (1981).

**Molecular characterization.** The confirmation of the identity of the species of *Pythium* sp. was carried out based on the internal transcribed spacer (ITS's) sequences 1 and 4, including gene 5.8S rDNA, obtained in the National Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology Laboratory (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental - LANBAMA) in San Luis Potosí, Mexico. The samples were sequenced with the marked dideoxynucleotide method in the 3130

fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) durante siete días, para su identificación, medición de su tasa de crecimiento y pruebas de patogenicidad.

**Identificación morfológica.** Se realizó por observaciones directas del crecimiento micelial, formación de esporangios, oogonios y anteridios desarrollados sobre una semilla esterilizada e inoculada con una porción de 3 mm de cultivo de *Pythium* spp., colocados en una caja Petri con medio de cultivo AA e incubada por siete días, tiempo en el que se formarían las estructuras mencionadas de este oomiceto. Las observaciones se realizaron con un microscopio digital Keyence VHX-7000 y un microscopio compuesto Motic BA210E, en este último se observaron preparaciones microscópicas. La identificación se realizó de acuerdo a las claves descriptivas de Van der Plaats-Niterink (1981).

**Caracterización molecular.** La confirmación de la identidad de la especie de *Pythium* sp., se realizó con base a las secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS's) 1 y 4, incluyendo el gen 5.8S DNAr, obtenidas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí, México. Las muestras fueron secuenciadas con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en un analizador automático de la serie 3500 Genic Analyzer. Para amplificar los genes se utilizó un termociclador Verity para PCR de punto final (Applied Biosystems) usando los oligos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCT-GCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Al-Sheikh, 2010; Jahén Rivera *et al.*, 2020).

**Pruebas de patogenicidad.** Se realizaron *in vitro* en cajas Petri con medio de cultivo AA, mediante dos metodologías; en pre-emergencia y post-emergencia. La primera se realizó mediante la técnica

Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequencer in an automatic Genic Analyzer series 3500. To amplify the genes, we used a Veriti thermocycler for Endpoint PCR (Applied Biosystems) with oligos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Al-Sheikh, 2010; Jahén Rivera *et al.*, 2020).

**Pathogenicity tests.** These were carried out *in vitro* in Petri dishes with AA culture medium, using two methods: in pre-emergence and post-emergence. The former was carried out with the technique used by Apodaca *et al.* (2002), which consisted in placing 10 Platino hybrid serrano pepper seeds in Petri dishes containing AA and inoculating them with a mixture of mycelium, oogonia, oospores and *Pythium* zoospores. The inoculated seeds were incubated at  $26 \pm 2$  °C with a light period of 12:12 (light: darkness) and the severity was evaluated every 24 h for 12 days. The second method was carried out using the technique proposed by Sánchez *et al.*, (1975) with slight modifications. Fifty seeds of the same hybrid were germinated in AA medium. After five days and once the hypocotyl (hp) developed, they were transferred axenically pure in groups of three seeds into new Petri dishes containing AA, two days later. When the development of their roots and cotyledons were observed, a piece of *Pythium* mycelium was transferred to the center of the Petri dishes along with culture medium, 3 mm in diameter, with 7 day's growth, from the Petri dishes with V8A. The Petri dishes were incubated at  $26 \pm 2$  °C with a light period of 12:12 (light: darkness) and the severity was evaluated five days after inoculation. In both methodologies, the visual severity scale described by Apodaca *et al.* (2002) was used, with modifications, where 0= no symptoms, healthy plant, 1= few small necrotic spots in the hp or on cotyledons, 2= necrotizing on the base of the hp, 3=

utilizada por Apodaca *et al.* (2002), que consistió en colocar 10 semillas de chile serrano híbrido Platino en cajas Petri conteniendo AA e inocularlas con una mezcla de micelio, oogonios, oósporas y zoosporas de *Pythium*. Las semillas inoculadas se incubaron a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) y se evaluó la severidad cada 24 h por 12 días. La segunda metodología se realizó mediante la técnica propuesta por Sánchez *et al.* (1975) con ligeras modificaciones; se germinaron 50 semillas del mismo híbrido en medio AA, transcurridos cinco días y una vez que se desarrolló el hipocótilo (hp), se transfirieron axenicamente puras en grupos de tres semillas, a nuevas cajas Petri conteniendo AA, dos días después, cuando se observó el desarrollo de su raíz y cotiledones, se transfirió en el centro de las cajas Petri una porción de micelio de *Pythium* con medio de cultivo de 3 mm de diámetro de siete días de crecimiento que procedía de cajas Petri conteniendo V8A. Las cajas Petri se incubaron a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) y se evaluó la severidad a los cinco días después de la inoculación. En ambas metodologías se utilizó la escala visual de severidad descrita por Apodaca *et al.* (2002), con modificaciones, donde 0= sin síntomas planta sana, 1= pocos puntos pequeños necróticos en el hp o en cotiledones, 2= necrosamiento en la base del hp, 3= hp necrosado hasta en un 50%, 4= semilla, hp o planta completamente necrosada. Los dos tratamientos (uno con inoculación y el otro sin inoculación) se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con tres repeticiones y dos tratamientos. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) en el programa estadístico R versión 3.3.1.

**Desarrollo de *Pythium* en diferentes medios de cultivo.** Se utilizaron los medios de cultivos V8-

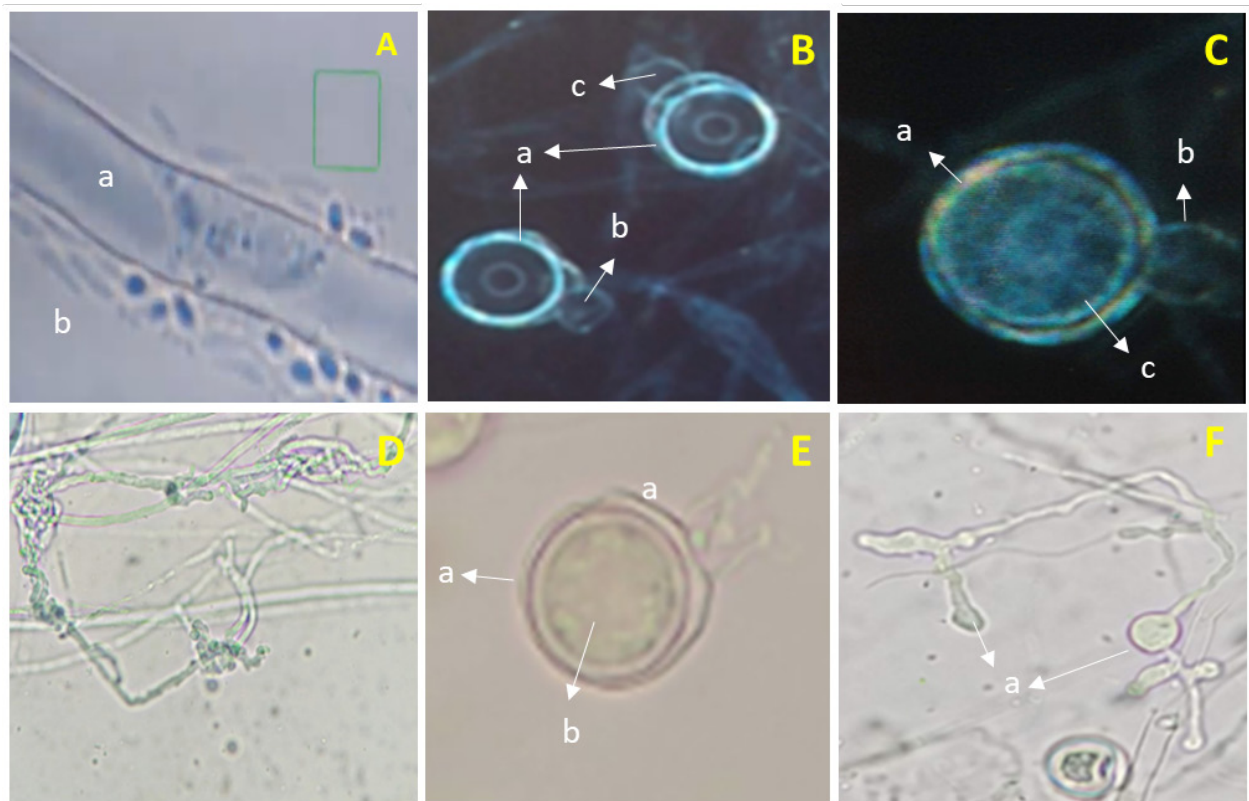
hp necrotized by up to 50%, 4= seed, hp or plant completely necrotized. Both treatments (one with inoculation, the other without inoculation) were distributed in a completely random arrangement with three repetitions and two treatments. The data underwent an analysis of variation (ANOVA) and a Tukey means comparison test ( $p \leq 0.05$ ) in the R statistical program, version 3.3.1.

**Development of *Pythium* in different culture media.** The culture media used were V8- Agar (V8A), Maize Agar (MA), Maize Potato Agar (MPA), Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek (Czp) and Oat Agar (AvA), in Petri dishes, all 9 cm in diameter. In each one of the media, a piece of *Pythium* mycelium, 3 mm in diameter, was placed after two days growing in V8A. The mycelial growth was measured 24 h after planting. A completely randomized design was used, with four repetitions (four Petri dishes). The data underwent an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey means comparison test ( $p \leq 0.05$ ) in the R statistical program, version 3.3.1.

**Morphological identification of *Pythium* sp.** The isolation obtained from pepper plants with symptoms of damping off presented hyaline coenocytic toruloid hyphae with diameters between 5 and 7  $\mu\text{m}$  (Figure 1-Aa and Da), spherical terminal oogonia, flat ones with a diameter of 25-28  $\mu\text{m}$  (Figure 1- Ba, Ca and Ea), with an aplerotic oospore with a diameter between 24 and 26  $\mu\text{m}$  (Figure 1Cc and Eb), declinate or monoclinal antheridia, one per oogonium (Figure 1-Bbc and Cb), filamentous, lobulated and irregular sporangia, (Figura 1-Fa) and zoospores (Figure 1Ab). These characteristics coincided, when using the taxonomic keys by Van der Plaats-Niterink (1981) and Tsuneo (2010), with those of *Pythium aphanidermatum*. However, although the morphological characteristics

Agar (V8A), Maíz Agar (MA), Maíz Papa Agar (MPA), Papa Dextrosa Agar (PDA), Czapek (Czp) y Avena Agar (AvA), en cajas Petri de 9 cm de diámetro. En cada uno de los medios se transfirió una porción de micelio de 3 mm de diámetro de *Pythium* de dos días de crecimiento en V8A. La medición del crecimiento micelial se realizó a las 24 h después de la siembra. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones (cuatro cajas Petri). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) en el programa estadístico R versión 3.3.1.

**Identificación morfológica de *Pythium* sp.** El aislamiento obtenido de plantas de chile con síntomas de damping off, presentó hifas toruloides cenocíticas hialinas con diámetro de 5-7  $\mu\text{m}$  (Figura 1-Aa y Da), oogonios terminales esféricos, lisos de 25-28  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1- Ba, Ca y Ea), con oóspora aplerótica de 24-26  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1Cc y Eb), anteridios declinos o monoclinos uno por oogonio (Figura 1-Bbc y Cb), esporangios filamentosos, lobulados e irregulares (Figura 1-Fa) y zoosporas (Figura 1Ab). Estas características concordaron al usar las claves taxonómicas de Van der Plaats-Niterink (1981) y Tsuneo (2010) con las de *Pythium aphanidermatum*. Sin embargo, aunque las características morfológicas observadas en *Pythium* concuerdan con las descritas por estos dos autores existen diferencias con los tamaños de algunas estructuras; por ejemplo Van der Plaats-Niterink (1981) describe a la hifa con un diámetro de 10  $\mu\text{m}$ , oogonios que miden de 20-25  $\mu\text{m}$  con oóspora aplerótica de 18-22  $\mu\text{m}$  y de uno a dos anteridios por oogonio, mientras que en esta investigación se encontraron hifas de un diámetro de 5-7  $\mu\text{m}$ , oogonios con diámetro de 25-28  $\mu\text{m}$  con oóspora aplerótica de 24-26  $\mu\text{m}$  y con un solo anteridio por oogonio. Las características observadas en



**Figure 1. *Pythium aphanidermatum*.** A) a- cenocytic hypha and b- Zoospores. B) a- Smooth spherical terminal oogonia, b and c- Dicline antheridia. C) a- Oogonium, b- Monoclone antheridium and c- Aplerotic oospore. D) a- Toruloid hypha. E) a- Terminal oogonium and b- Aplerotic oospore. F) a- Lobulated sporangia.  
**Figura 1. *Pythium aphanidermatum*.** A) a- hifa cenocítica y b- Zoosporas. B) a- Oogonios terminales esféricos lisos, b y c- Anteridios diclinos. C) a- Oogonio, b- Anteridio monoclino y c- Oóspora aplerótica. D) a- Hifas toruloides. E) a- Oogonio terminal y b- Oóspora aplerótica. F) a- esporangios lobulados.

observed in *Pythium* coincide with those described by these authors, there are differences with the sizes of some structures. For example, Van der Plaats-Niterink (1981) describes the hypha as having a 10  $\mu\text{m}$  diameter, oogonia that measure 20-25  $\mu\text{m}$  with an aplerotic 18-22  $\mu\text{m}$  oospore and one or two antheridia per oogonium, whereas this study found hyphae with diameters of 5-7  $\mu\text{m}$ , oogonia with diameters of 25-28  $\mu\text{m}$  with aplerotic oospores of 24-26  $\mu\text{m}$  and with only one antheridium per oogonium. The characteristics observed in this study were similar to those observed by Díaz *et al.* (2011), who found oogonia with a diameter of

este estudio fueron similares a las observadas por Díaz *et al.* (2011) donde observó oogonios de 27.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y solo un antheridio por oogonio, al igual con Al-Sheikh (2010), que reporta esporangios irregulares, oogonios terminales esféricos de 24  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, con oóspora aplerótica de 24-26  $\mu\text{m}$  y un antheridio diclino o monoclino.

**Identificación molecular de *Pythium* sp.** La secuenciación de la región del ADNr ITS-1- del gen 5.8S- ITS-4 del oomiceto mostró un porcentaje de 99.15% de similitud con la secuencia clave de



27.5  $\mu\text{m}$  and only one antheridium per oogonium, as well as Al-Sheikh (2010), who reported irregular sporangia, spherical terminal oogonia with an average diameter of 24  $\mu\text{m}$ , with an aplerotic oospore measuring 24-26  $\mu\text{m}$  and a declive or monocline antheridium.

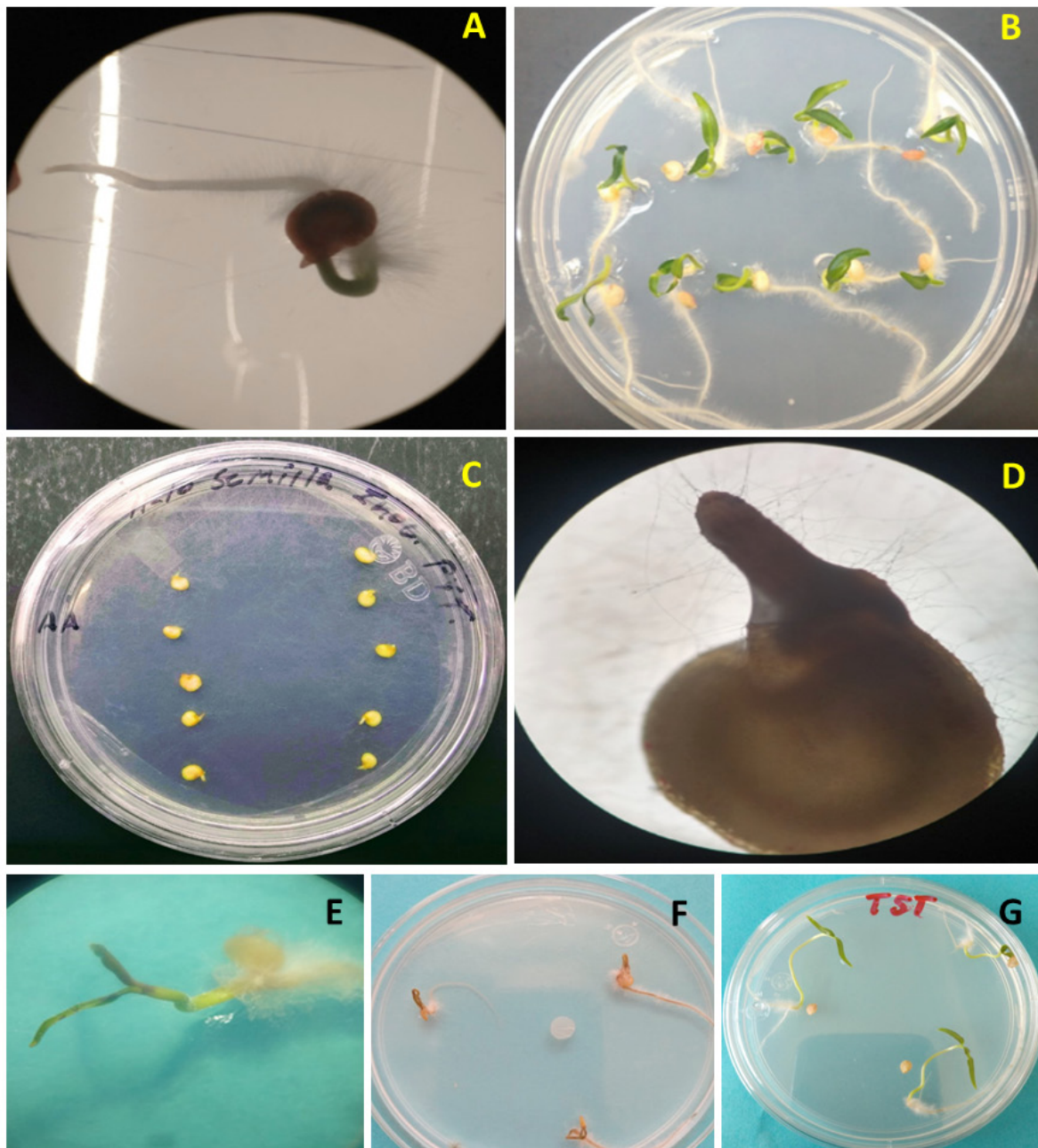
**Molecular identification of *Pythium* sp.** The sequencing of the region of the rDNA ITS-1- of gene 5.8S- ITS-4 of the oomycete displayed a similarity of 99.15% with accession key sequence JN695786.1., of the GenBank, corresponding to *P. aphanidermatum*. This provided certainty regarding the identity of the causal agent of the damping off found in pepper plants in greenhouses in Parras de la Fuente. Other investigators, in order to characterize this species, have used different oligos such as ITS4 and ITS5, ITS1 and ITS2. Such was the case for Al-Sheikh, (2010) and Díaz *et al.* (2011), whereas Grijalba *et al.* (2015) used oligos ITS4 and ITS5, confirming the identity of the species *P. aphanidermatum* as the cause of damping off in wheat, tomato and ornamental plants, unlike this study, which reports the isolation of plantlets in pepper plants in greenhouses.

**Pathogenicity tests.** In pre-emergence, the seeds inoculated with *P. aphanidermatum* displayed the growth of whitish mycelia 24 h after inoculation, which did not occur in the control seeds. Five days after inoculation, the formation of the hypocotyl (hp) was observed in inoculated and non-inoculated treatments, but only the control treatment developed a root (Figure 2A and C). Twelve days after inoculation, the treatments inoculated with *P. aphanidermatum* did not display the growth of cotyledons or roots, and its hypocotyl was necrotized and contained mycelia (Figure 2D). Out of the 30 seeds inoculated, only three displayed no development of the hypocotyl, whereas in the

acceso JN695786.1., del Gen Bank, correspondiente a *P. aphanidermatum*. Lo anterior, permitió tener certidumbre de la identidad del agente causal del “damping off” de plantas de chile en invernaderos de Parras de la Fuente. Otros investigadores para caracterizar esta especie han empleado oligos diferentes como ITS4 e ITS5, ITS1 e ITS2 tal es el caso de Al-Sheikh, (2010) y Díaz *et al.* (2011), mientras que Grijalba *et al.* (2015) utilizaron los oligos ITS4 e ITS5, confirmando la identidad de la especie *P. aphanidermatum* como causante del ahogamiento de plantas de trigo, jitomate y ornamentales, a diferencia de este estudio que reporta el aislamiento de plántulas de chile en invernadero.

**Pruebas de patogenicidad.** En pre-emergencia, las semillas inoculadas con *P. aphanidermatum*, mostraron el crecimiento de micelio blanquecino a las 24 h después de la inoculación, lo que no ocurrió en las semillas testigo. Cinco días después de la inoculación se observó la formación del hipocótilo (hp) en los tratamientos sin inocular e inoculado, pero sólo el tratamiento testigo desarrolló la raíz (Figura 2A y C). Doce días después de la inoculación se observó que los tratamientos inoculados con *P. aphanidermatum* no mostraron desarrollo de cotiledones, ni de raíz y su hipocótilo se encontraba necrosado y con presencia de micelio (Figura 2D), de las 30 semillas inoculadas sólo tres no mostraron desarrollo del hipocótilo, mientras que en el tratamiento testigo las semillas desarrollaron raíz, tallo y cotiledones sin síntomas ni signos del microorganismo (Figura 2B).

En el caso de post-emergencia, en todos los tratamientos inoculados con una porción de micelio de 3 mm de diámetro del cultivo de *Pythium*, se observó crecimiento micelial a las 24 h después de la inoculación, excepto en el testigo. Tres días después de la inoculación, las plantas mostraron síntomas de necrosis en cotiledones y raíces, además,



**Figure 2.** *P. aphanidermatum* pathogenicity test's in serrano pepper seeds and seedlings. A) Control treatment, seed five days after planting (dap), B) Treatment control 12 dap, C) Seeds inoculated with *P. aphanidermatum* five days after inoculation (dai), D) Seed inoculated with *P. aphanidermatum*, 12 dai, E) Necrosis of cotyledons and abundant mycelium in the root 3 dai, F) Total necrosis of seedlings 5 dai, G) Control treatment with symptom-free seedlings.

**Figura 2.** Pruebas de patogenicidad de *P. aphanidermatum* en semillas y plántulas de chile serrano. A) Tratamiento testigo, semilla de cinco días después de la siembra (dds), B) Tratamiento testigo 12 dds, C) Semillas inoculadas con *P. aphanidermatum* cinco días después de la inoculación (ddi), D) Semilla inoculada con *P. aphanidermatum* de 12 ddi, E) Necrosis de los cotiledones y abundante micelio en la raíz 3 ddi, F) Necrosis total de las plántulas 5 ddi, G) Tratamiento testigo con plántulas sin síntomas.

control treatment, the seeds developed roots, stems and cotyledons without signs or symptoms of the microorganism (Figure 2B).

In the case of post-emergence, in all treatments inoculated with a piece of mycelium with 3 mm in diameter from the *Pythium* culture, mycelial growth was observed 24 h after inoculation, except in the control. Three days after inoculation, plants displayed symptoms of necrosis in cotyledons and roots, as well as abundant mycelia (Figure 2E) and after five days, they displayed total necrosis (Figure 2F), whereas the controls presented no symptoms (Figure 2G). The isolation characterized as *P. aphanidermatum* displayed a high pathogenicity in pre- and post-emergence, since it caused a mortality rate of 100% in serrano pepper seeds and seedlings, which is similar to the data reported by Grijalba *et al.* (2015) and Grijalba *et al.* (2020) in tomato and soybean seedlings, respectively. At a temperature above 25 °C, as in reports by Al-Sheikh (2010), *P. aphanidermatum* caused 100% of ‘damping off’ in both pre- and post-emergence in wheat. Meanwhile, Valdez *et al.* (2011) reported a reduction of 65% in the germination of *Jatropha* seeds inoculated *in vitro* with the same oomycete.

According to the severity scale by Apodaca *et al.* (2002), the damage observed in the inoculated treatments was placed in the highest level (4) of the scale, since necrosis was found, along with seed rot and death of the seedling, whereas the controls were located in level 0 of the scale, due to the absence of signs or symptoms of the microorganism. Given this, the isolation identified as *P. aphanidermatum* was considered a severe causal agent of damping off in pre- and post-emergence in pepper seedlings and seeds.

**Development of *Pythium aphanidermatum* in different culture media.** Table 1 shows that 24 h after the microorganism was planted, it presented

de abundante micelio (Figura 2E) y a los cinco días mostraron necrosis total (Figura 2F), mientras que los testigos no presentaron síntomas (Figura 2G).

El aislamiento caracterizado como *P. aphanidermatum* mostró alta patogenicidad en pre y post-emergencia al causar el 100% de mortalidad de las semillas y plántulas de chile serrano, datos similares a los reportados por Grijalba *et al.* (2015) y Grijalba *et al.* (2020) en plántulas de jitomate y soya respectivamente. A temperatura superior a 25 °C, al igual que Al-Sheikh (2010) reportó que *P. aphanidermatum* causa 100% de ‘damping off’ tanto en pre y post-emergencia en trigo. Mientras que Valdez *et al.* (2011) reportó una reducción del 65% de la germinación de semillas de *Jatropha* inoculadas con el mismo oomiceto *in vitro*.

De acuerdo a la escala de severidad de Apodaca *et al.* (2002), el nivel de daño observado en los tratamientos inoculados se ubicó en el nivel más alto (4) de la escala; donde se detectó necrosis, pudrición de semillas y muerte de la plántula, mientras que los testigos se ubicaron en el nivel 0 de la escala por no presentar signos ni síntomas del microorganismo. Dado lo anterior, se consideró al aislado identificado como *P. aphanidermatum* como un agente causal severo de “damping off” en pre y post-emergente de plántulas y semillas de chile.

**Desarrollo de *Pythium aphanidermatum* en diferentes medios de cultivo.** En el cuadro 1 se observó que 24 h después de la siembra del microorganismo presentó diferencia significativa del crecimiento micelial en los distintos tratamientos, siendo V8A el medio donde *P. aphanidermatum* logró el mayor crecimiento micelial con 67.7 mm/día, siendo estadísticamente superior al resto de los tratamientos con un incremento del 18% con respecto al tratamiento MA que fue el que obtuvo el menor crecimiento con 57.3 mm/día. Estos crecimientos fueron superiores al reportado por Van der Plaats-

**Table 1. *P. aphanidermatum* mycelial growth rate after 24 h in different culture media.**  
**Cuadro 1. Tasa de crecimiento micelial de *P. aphanidermatum* en 24 h en distintos medios de cultivo.**

Medio de Cultivo	Media del Crecimiento (mm ± DS)
V8A	67.7± 0.7 a <sup>2</sup>
MPA	60.2± 0.7 b
PDA	58.3± 0.3 bc
Czp	58.2± 0.5 bc
AvA	58.1± 0.3 c
MA	57.3± 1.8 c

<sup>2</sup>Means with different letters are significantly different (Tukey; p≤0,05). /

<sup>2</sup>Medias con letras distintas son significativamente diferentes (Tukey; p≤0,05).

a significant difference in mycelial growth in the different treatments, V8A being the medium in which *P. aphanidermatum* achieved the highest growth rate, with 67.7 mm/day, making it statistically higher than the rest of the treatments with an 18% increase in regard to the MA treatment, which had the lowest growth rate, with 57.3 mm/day. These growth rates were higher than the one reported by Van der Plaats-Niterink (1981), who mentions a growth rate of 30 mm/day for this species, which may be a factor involved in the high pathogenic ability observed on pepper seeds and seedling.

The behavior of *P. aphanidermatum* after 32 h in the different culture media appears in Figure 3, in which white and cotton-like mycelia are visible, with the exception of the Czp medium (Figure 3A), in which mycelium was scarce and superficial, at the level of the culture medium. In the MA medium (Figure 3B), *P. aphanidermatum* presented dense mycelium, yet lower growth than in MPA (Figure 3C), V8A (Figure 3F) and AvA (Figure 3D). In the latter medium, the oomycete developed the most abundant and dense mycelia. However, it was in V8A where cellular differentiation took place, and sexual and asexual reproduction structures were observed.

Niterink (1981) quien menciona un crecimiento de 30 mm/día para esta misma especie, lo cual pudiera ser un factor implicado en la elevada capacidad patogénica observada sobre semilla y plántulas de Chile.

El comportamiento de *P. aphanidermatum* a las 32 h en los distintos medios de cultivo se observa en la Figura 3, donde se aprecia que presentó micelio blanco y algodonoso, excepto en el medio Czp (Figura 3A), donde su micelio fue escaso y superficial al ras del medio de cultivo. En medio MA (Figura 3B), *P. aphanidermatum* presentó micelio denso, pero menor crecimiento que en MPA (Figura 3C), V8A (Figura 3F) y AvA (Figura 3D). En este último medio, el oomiceto logró desarrollar el micelio más abundante y denso. Sin embargo, fue en V8A donde se presentó la diferenciación celular y se observaron estructuras de reproducción asexual y sexual.

Es importante resaltar que la formación de estructuras de reproducción de *Pythium aphanidermatum* como esporangios, oogonios y zoosporas sólo ocurrió en el medio V8A en 96 h después de la siembra, ningún de los demás tratamientos estudiados (medios de cultivo) desarrollaron estructuras de reproducción sexual o asexual hasta las 168 h de

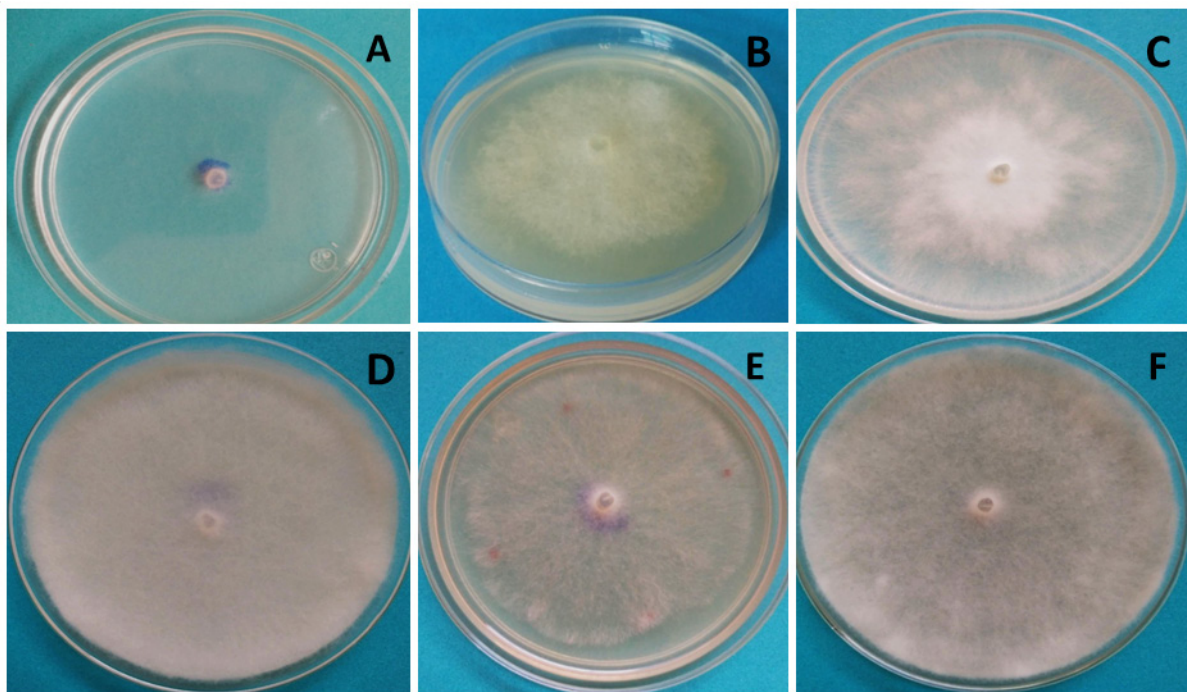


Figure 3. Growth of *Pythium aphanidermatum* after 32 h of incubation; A) Czp medium, B) MA medium, C) MPA medium, D) AvA medium, E) PDA medium, F) V8A medium.

Figure 3. Crecimiento de *Pythium aphanidermatum* a las 32 h de incubación; A) Medio Czp, B) Medio MA, C) medio MPA, D) Medio AvA, E) Medio PDA, F) Medio V8A.

It is worth highlighting that the formation of reproductive structures in *Pythium aphanidermatum* such as sporangia, oogonia and zoospores only took place in the V8A medium 96 h after planting, and no other treatments studied (culture media) developed sexual or asexual reproductive structures before 168 h of incubation. Therefore, the amount of nutrients in V8A promoted the growth and formation of sexual and asexual structures in *P. aphanidermatum*, as reported by Ko (1998) and González *et al.* (2014), who claim that culture media with high sugar levels (glycerides) and vitamins promote the production of *Pythium* and *Phytophthora* oospores and antheridia. Also observed was the growth of cotton-like mycelia, typical of *P. aphanidermatum*, in the PDA culture medium (Grijalba *et al.*, 2015; Al-Sheikh, 2010).

incubación. Por lo que el V8A por su contenido de nutrientes favoreció el crecimiento y formación de estructuras sexuales y asexuales de *P. aphanidermatum*, tal y como lo reporta Ko (1998) y González *et al.* (2014), que medios de cultivo con altos contenidos de azúcares (gliceridos) y vitaminas favorecen la producción de oósporas y anteridios de *Pythium* y *Phytophthora*. También se observó el crecimiento de micelio algodónoso característico de *P. aphanidermatum* en el medio de cultivo PDA (Grijalba *et al.*, 2015; Al-Sheikh, 2010). Este fitopatógeno al crecer en medio Czapek mostró un pobre desarrollo al igual que en PDA, siendo en AvA y V8A donde se favoreció el crecimiento de micelio algodónoso.

Se aisló e identificó morfológica y molecularmente a una cepa del oomiceto *Pythium aphanidermatum* causante de la muerte de plántulas de Chile

This phytopathogen, due to its growth in Czapek medium, displayed poor development, as it did in PDA, being AvA and V8A where the growth of cotton-like mycelia was promoted.

A strain of the oomycete *Pythium aphanidermatum*, which caused the death of pepper seedlings in a greenhouse in Parras de la Fuente in Coahuila, Mexico, was isolated and morphologically and molecularly identified. The isolated strain presented a high virulence *in vitro* in pre-emergence over the seeds and in post-emergence in serrano pepper seedlings. The isolated strain has a quick development in different culture media, being V8A the medium in which it displayed a better development. In addition, this culture medium, which is composed of tomato juice, plant extracts and CaCO<sub>3</sub>, allowed it to form sexual and asexual reproductive structures.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the CONACYT for the scholarship granted to study a Master's in Science degree with a specialty in Agricultural Parasitology.

#### LITERATURE CITED

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5a Ed., Academic Press. 922 pp.
- Al-Sheikh H. 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. Saudi Journal of Biological Sciences 17(4): 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.001>
- Apodaca SMÁ, Zavaleta ME, Garcia ER, Osada KS y Valenzuela UJG. 2002. Frecuencia de Campos Infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su Control. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1): 1-7. <http://www.Reddalyc.org/articulo.oo?id=61220101>
- Cotilla PL, Díaz RA, Berroa NG y Rodríguez RR. 2007. Influencia de cuatro medios de cultivo sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl. Centro Agrícola 34(2):49-52. [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V34-Numero\\_2/cag102071543.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V34-Numero_2/cag102071543.pdf)
- D'Angelo OR. 2016. Enfermedad de marchitamiento fúngico en plántulas de lechuga: Un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. Revista en invernadero de Parras de la Fuente en Coahuila, México. Se determinó que la cepa aislada presentó alta virulencia *in vitro* en preemergencia sobre semillas y en postemergencia en plántulas de chile serrano. La cepa aislada tiene un rápido desarrollo en diferentes medios de cultivo, siendo en V8A donde presentó mejor desarrollo, además, fue capaz de formar estructuras de reproducción sexual y asexual en dicho medio de cultivo el cual está elaborado a base de jugo de tomate, extractos vegetales y CaCO<sub>3</sub>.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar estudios de Maestría en Ciencias con Especialidad en Parasitología Agrícola.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias 13(3): 680-685. <http://hdl.handle.net/1049818505>

Díaz CM, Rodríguez AG, Silva RHV, Pedraza SME, Salgado GR y Fernández PSP. 2011. Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(3): 431-443. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_pi&id=S2007-09342011000900003&lng=es&nrn=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_pi&id=S2007-09342011000900003&lng=es&nrn=iso). ISSN 2007-0934

Elshahawy I, Abouelnasr HM, Lashin SM and Darwesh OM. 2018. First report of *Pythium aphanidermatum* infecting tomato in Egypt and its control using biogenic silver nanoparticles. Journal of Plant Protection Research 58(2): 137-151. <http://dx.doi.org/10.24425/122929>

Fry W, Grünwald N y Ocotlán JM. 2010. Introducción a los Oomicetes. Editado por Alberto Valencia-Botín. The Plant Health Instructor. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2012-0220-01>

Gómez JR, Hernández FLM, Cossio VLE, López AJG y Sánchez LR. 2011. Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico Núm. 19, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. <https://es.readkong.com/page/enfermedades-fungosas-y-bacterianas-del-cultivo-de-tomate-9739198?p=1>

Gómez J y Melero JM. 2011. Patogenia de *Pythium aphanidermatum* y *Pythium* spp. sobre plántulas de pepino: I Influencia del cultivar y del sustrato en la gravedad de

- la enfermedad. Boletín de Sanidad Vegetal 37: 207-223. <http://hdl.handle.net/10261/84091>
- González PFD, Costales MD y Falcón RAB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal 29(1): 33-41. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&nrm=iso). ISSN 1010-2752
- Grijalba PE, Zapata RL, Palmucci HE y Baron C. 2015. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 50(1): 11-15. <http://dx.doi.org/10.31055/1851.2372.v50.n1.10843>
- Grijalba PE y Ridao ADC. 2017. Control químico de *Pythium* spp. en plántulas de soja. RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias 43(1): 67-71. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86451165010>
- Grijalba PE, Ridao ADC and Steciow M. 2020. Damping off on soybean (*Glycine max*) caused by *Pythium aphanidermatum* in Buenos Aires Province (Argentina). Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias *UNCuyo* 52(2): 282-288. [http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFC\\_A/artic/view/3027](http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFC_A/artic/view/3027)
- Hernández HEJ, Hernández RI, Almaraz SJJ, López LA, Torres AM, y Morales FFJ. 2018. Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del Damping off en chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9(3): 525-537. <http://dx.doi.10.29312/remexca.v9i3.335>
- Jahén Rivera SN, Gomez Rivera O and Espinosa Victoria D. 2020. Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*). Revista Mexicana de Fitopatología 38 (2): 269-279. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2001-6>.
- Ko, WH. 1998. Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. Botanical Bulletin of Academia Sinica 39: 81-86. <https://pdfs.semanticscholar.org/eb6a/e91e160c2071b24177c26742e14b76d21e21.pdf>
- Lévesque, CA and De Cock, AWAM. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research 108(12): 1363-1383. <http://dx.doi.org/10.1017/s0953756204001431>
- Rios TL and De Rocha JRS. 2018. Potencial patogênico de especies do complexo *Pythium* (Oomycota) para a agricultura familiar no estado do piauí. Pesquisas Botânica 71: 147-158. <http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/botanica71/012.pdf>
- Rivera FCH y Fernández PS. 2017. Técnica de evaluación para damping-off en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) infectado por *Pythium aphanidermatum*. Tecnociencia Chihuahua 11(2): 41-47. <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/156>
- Sánchez LE, Endo RM and Leary JV. 1975. A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing crown and root rot of tomato. Phytopathology 65(6): 726-727. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1975Articles/Phyto65n06\\_726.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1975Articles/Phyto65n06_726.PDF)
- Schroeder KL, Martin FN, De Cock AWAM, Lévesque CA, Spies CFJ, Okubara PA and Paulitz TC. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. Plant Disease 97(1): 4-20. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-03-12-0243-fe>
- Tsuneo W. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRC Press\_Taylor & Francis, Group Boca Raton London New York. pp. 26-68. ISBN 9781439804193.
- Valdés ROA, Garcia ER, Sánchez, SO y Pérez VA. 2011. Aislamiento y patogenicidad de un posible *Pythium aphanidermatum* en *Jatropha Curcas* L. no tóxica. Tropical and subtropical agroecosystems 14(2): 649-660. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-04622011000200022](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200022)
- Van der Plaats-Niterink AJ. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21:1-242. <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim21/full%20text.htm>