

Identificación y diferenciación morfológica y molecular de *Olpidium* spp.

J. A. HERRERA VÁSQUEZ, M. C. CEBRIÁN, A. A. FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, C. JORDÁ

En este artículo se describe el desarrollo de un método multiplex PCR para detectar, diferenciar y confirmar la identificación morfológica de tres especies de *Olpidium* que infectan las raíces de las plantas, *O. bornovanus*, *O. brassicae*, y *O. virulentus*, ante la dificultad que presenta su diferenciación por características meramente morfológicas. Para tal fin, se examinaron 132 muestras de raíces, de las cuales 101 (76.5%) presentaron infección por *Olpidium* spp.. En base a la morfología de las esporas de resistencia, solamente se logró determinar la presencia de *O. bornovanus* en 27 muestras (20.5%), mientras que en el resto no fue posible determinar la especie de *Olpidium*. Por el contrario, mediante el método multiplex PCR, fue posible determinar la identidad de *Olpidium* spp. en todas las muestras infectadas, incluso cuando las esporas de resistencia no fueron observadas. Este método también fue efectivo en la detección de *Olpidium* spp. en muestras de agua. Adicionalmente, se evaluó la especificidad y sensibilidad de este método multiplex PCR, y el mismo fue validado con muestras de 9 cultivos diferentes procedentes de 11 países de América, Europa y África.

J. A. HERRERA VÁSQUEZ. Grupo de Virología, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, España. Dirección actual: Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Ctra. Panamericana, Los Canelos-Santa María, Herrera, Panamá, 0601 Chitré, Herrera, Panamá. Tel.: +507 9761265; fax: +507 9761349; e-mail: joshervs11@gmail.com

M. C. CEBRIÁN, A. A. FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, C. JORDÁ. Grupo de Virología, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, España. maicacm75@gmail.com, analf1@etsia.upv.es, mkorse19@hotmail.com, mjordag@gmail.com

Palabras clave: diagnóstico, especificidad, sensibilidad.

INTRODUCCIÓN

Las especies de quítridos *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling y *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang. sensu lato (sl) son parásitos obligados que infectan las raíces de las plantas, pero rara vez inducen síntomas obvios en las plantas huéspedes infectadas, y no se disponen de datos que evalúen las posibles pérdidas que dichos agentes fúngicos ocasionan en dichos huéspedes, imputables a

su propio parasitismo. Estas especies son consideradas económicamente importantes porque actúan como vectores de virus que causan enfermedades importantes en las plantas (ROCHON *et al.*, 2004; SASAYA y KOGANEZAWA, 2006). El término *O. brassicae* sl se utiliza para designar tanto a *O. brassicae*, una especie heterotática que infecta a las crucíferas, como a *Olpidium virulentus* (Sahtiyanci) Karling, una especie homotática que no infecta a las crucíferas (KOGANEZAWA *et al.*, 2005). Por

otro lado, la reproducción de *Olpidium* spp. envuelve la producción de zoosporangios, los cuales descargan las zoosporas como un medio de dispersión en el agua, junto con la producción *in situ* de las esporas de resistencia, que permiten la persistencia del hongo en el suelo, en condiciones adversas al mismo, durante un largo periodo de tiempo, así como también juegan un papel importante en la supervivencia de los virus asociados (HIRUKI, 1987; ROCHON *et al.*, 2004).

Como indicamos anteriormente, *Olpidium* spp. es un parásito obligado de las plantas y, por lo tanto, no puede ser cultivado en medio de cultivo artificial. Por consiguiente, la identificación de este tipo de hongos no es posible sin la realización de bioensayos largos y tediosos (JIANG y HIRUKI, 1996). En este sentido, las diferencias en el rango y especificidad de huéspedes, así como la transmisibilidad de virus, son reconocidas como las características más importantes para discriminar *O. bornovanus* de *O. brassicae* s.l (CAMPBELL y SIM, 1994; SASAYA y KOGANEZAWA, 2006). No obstante, la observación microscópica de las raíces, es generalmente el método utilizado para identificar estas especies, basado en la morfología de las esporas de resistencia (TOMLINSON y THOMAS, 1986), pero éstas no siempre son encontradas con facilidad. Por lo tanto, resulta fundamental disponer de un método de detección adecuado para el diagnóstico rutinario y fiable de *Olpidium* spp. en las raíces de las plantas, así como también en el agua de riego y en la solución re-circulante de los cultivos hidropónicos.

La región de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosómico (rDNA-ITS) ha sido usada en la identificación y diferenciación de hongos mediante técnicas moleculares (WHITE *et al.*, 1990; LEE y TAYLOR, 1992; SREENIVASAPRASAD *et al.*, 1996; CROUS *et al.*, 2001; DUNNE *et al.*, 2002). Esta región contiene secuencias menos conservadas que las altamente conservadas, correspondientes a los genes 18S, 5.8S y 28S del ADN ribosómico (KULARATNE *et al.*, 2004). En este sentido, el método PCR-RFLP se describe en la bibliografía como

adecuado para la detección y diferenciación de *Olpidium* spp. (JIANG y HIRUKI, 1996) y otros hongos, incluso hasta el nivel de subespecie (CUBETA *et al.*, 1991; WARD y AKROFI, 1994). Sin embargo, una de las dificultades que puede presentarse, en el caso de *Olpidium* spp., es que además de amplificar el ADN ribosómico específico del hongo a partir de una suspensión de zoosporas de *O. bornovanus*, se amplifique también el ADN ribosómico específico del huésped. Adicionalmente, mediante este método no se logró amplificar el ADN ribosómico de este hongo a partir de las raíces del huésped infectado. El principal factor implicado en este fenómeno podría ser la incompleta especificidad de los cebadores utilizados, ya que estos correspondían a la región rDNA-ITS, la cual tiene la limitante que solo puede ser usada con cultivos puros de hongos, debido a que el ADN de la planta también produce bandas (JIANG y HIRUKI, 1996). Por lo tanto, para evitar estos inconvenientes se requiere utilizar cebadores específicos que no presenten homología con el ADN de la planta, con la finalidad de detectar solamente el hongo deseado (KULARATNE *et al.*, 2004). El método multiplex PCR desarrollado en este trabajo permite detectar en un solo paso las tres especies de *Olpidium* (*O. bornovanus*, *O. brassicae*, y *O. virulentus*) utilizando cebadores específicos para cada una de ellas, los cuales amplifican solamente el ADN ribosómico específico del hongo, tanto de las suspensiones de zoosporas como de las raíces de las plantas. Por todo lo anterior, resulta necesario distinguir entre las raíces infectadas con una u otra especie de *Olpidium*, debido a las diferencias en el rango y especificidad de huéspedes, así como la transmisibilidad de diferentes virus que estas especies presentan.

Los objetivos de este estudio fueron, como ya se indicó anteriormente, (i) desarrollar un método multiplex PCR para detectar y distinguir tres especies de *Olpidium* en muestras de raíces y agua, (ii) determinar la especificidad y sensibilidad de este método y su uso en la detección de *Olpidium* spp. en suspensiones de zoosporas y directamente en raíces, (iii) y la utilización de dicho método

para confirmar la identificación morfológica de *Olpidium* spp..

MATERIALES Y METODOS

Colecta y preparación de muestras de suelo

Se utilizaron 132 muestras de suelo recolectadas en un periodo de 10 años (1999 a 2008) y mantenidas en condiciones de aislamiento sanitario, procedentes dichas muestras de diferentes lugares geográficos, tales como, Brasil, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Portugal, España, Holanda, Túnez, Uruguay, y Estados Unidos. Dichas muestras fueron colectadas de la zona del sistema radicular de diferentes especies de cucurbitáceas [pepino, *Cucumis sativus* L.; melón, *Cucumis melo* L.; sandía, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai; calabacín, *Cucurbita pepo* L.], brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.), col (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* Zenk., *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C., y *Brassica campestris* L.), escarola (*Cichorium endivia* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas al aire libre, mostrando síntomas asociados a virus, y las mismas fueron usadas como fuentes de *Olpidium* spp. Las muestras de suelo (aproximadamente 100 g) fueron colocadas en bandejas y cubiertas con papel de celulosa para evitar contaminación. Posteriormente, estas muestras fueron secadas al aire durante una semana y tamizadas a través de una malla de 2 mm de luz/Ø, con la finalidad de separar los terrones del suelo, previo a su procesamiento. La presencia de *Olpidium* spp. en las muestras de suelo fue determinada mediante plantas trampa, tal y como se detalla en el siguiente apartado.

Aislamiento de *Olpidium* spp. mediante plantas trampa y especies de hongos miceliales

El aislamiento de *Olpidium* spp. se realizó mediante plantas trampa, que no es más que atrapar el hongo en las raíces de las plántulas (en estado de cotiledón) de la especie hospede

dante, en la cual la enfermedad se presenta en el campo (hospedante homólogo), tal y como se describe a continuación. Las semillas de los cultivos indicados anteriormente fueron germinadas en placas Petri estériles, las cuales contenían papel de celulosa, y las mismas fueron regadas con agua Milli-Q (Milli-Q® Ultrapure Water Purification System, Millipore™). Se transplantaron tres plántulas en estado de cotiledón por cada muestra, a macetas individuales de 0.5 litros de capacidad, las cuales contenían una mezcla de suelo de campo procedente de la zona del sistema radicular de las plantas de los cultivos indicados anteriormente y arena fina de sílice lavada y previamente autoclavada, en proporción 1:10, respectivamente (Fig.1). Las plantas se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado y fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con temperaturas de 26°C y 18°C, respectivamente, y un 60% de humedad relativa. El riego durante el ensayo fue realizado con agua Milli-Q. Como control negativo, se utilizaron macetas con una mezcla autoclavada de suelo libre de *Olpidium* spp. y arena, bajo las mismas condiciones descritas previamente (Fig. 1). Las macetas utilizadas como control negativo fueron intercaladas entre el resto de macetas, con la finalidad de determinar si las mismas se mantendrían libres de la infección por *Olpidium* spp. hasta el final del ensayo. A los 30 días después del transplante (d.d.t.), se procedió a retirar cuidadosamente una planta por cada maceta con ayuda de una espátula, para no dañar el sistema radicular. Las raíces fueron lavadas con agua destilada y se recogieron por separado aproximadamente 9 cm y unos 0.1 g de raicillas por cada planta, las cuales fueron, en el primer caso, examinadas mediante microscopía y, en el segundo caso, analizadas mediante multiplex PCR, para determinar la efectividad de ambos métodos en la identificación y diferenciación de *Olpidium* spp. Las otras dos plantas por cada maceta se mantuvieron en la cámara de ambiente controlado para trabajos posteriores.



Figura 1. Aislamiento de *Olpidium* spp. mediante plantas trampa: (A) Macetas conteniendo una mezcla de suelo de campo y arena, en proporción 1:10, respectivamente, (B) Macetas conteniendo solamente arena (control negativo). En ambos casos, se utilizó una planta por cada maceta, y tres repeticiones por muestra y control negativo

Adicionalmente, se incluyeron en el ensayo algunas especies de hongos miceliales que infectan las raíces de las plantas y que están presentes en los cultivos hidropónicos, de igual forma como ocurre con *Olpidium* spp. Dichos hongos corresponden a *Pythium intermedium* (aislado Carrotech 54), *P. sulcatum* (Carrotech 122B), *P. violae* (Carrotech 383), *P. sylvaticum* (Carrotech 86A), *Phytophthora cactorum* (10300), *P. ramorum* (8895), *Fusarium foetens* (10183), y *F. graminearum* (KIS-ISH 67/07), los cuales proceden de la colección del Centro de Investigación Bioforsk, División de Sanidad Vegetal y Protección Fitosanitaria, Noruega, y los mismos fueron proporcionados por la Dra. M. L. Herrero en forma de extractos de ADN. También se incluyeron *Pythium deliense* (aislado M1T2S), *Phytophthora cactorum* (Phy126), y *Fusarium oxysporum* fsp. *melonis* raza 1 (Fom4), los cuales proceden de la colección del Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, España, y los mismos fueron proporcionados por el Dr. J. C. Tello en forma de micelio en placas Petri cultivados en medio PDA (agar papa dextrosa).

Identificación morfológica de *Olpidium* spp.

Con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de esporas de resistencia de

Olpidium spp., las muestras de raíces fueron clarificadas mediante el método de JORDÁ *et al.* (2002). Posteriormente, éstas fueron colocadas en agua destilada y observadas bajo un microscopio de luz Nikon-YS 10 (Nikon Corporation, Tokio, Japón). Es importante destacar que *O. bornovanus* presenta esporas de resistencia de pared exterior lisa e interior con apariencia de panal de abejas, mientras que en *O. brassicae* si las esporas de resistencia presentan forma estrellada (LANGE e INSUNZA, 1977).

Preparación y extracción de ADN: detección de *Olpidium* spp. en raíces

Se desarrollaron dos procedimientos de extracción de ADN para determinar las condiciones óptimas de la multiplex PCR en la detección de *Olpidium* spp.. En el primer procedimiento, las zoosporas de *Olpidium* spp. fueron estimuladas para lograr su liberación, mediante la colocación de aproximadamente 0.05 g de raíces en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, conteniendo una solución GS (0.05 M de glicina y 1% de sacarosa a 4 °C) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las raíces fueron retiradas de los tubos y la suspensión de zoosporas fue centrifugada a 10000 rpm durante 15 minutos. Seguidamente, se descartaron nueve partes

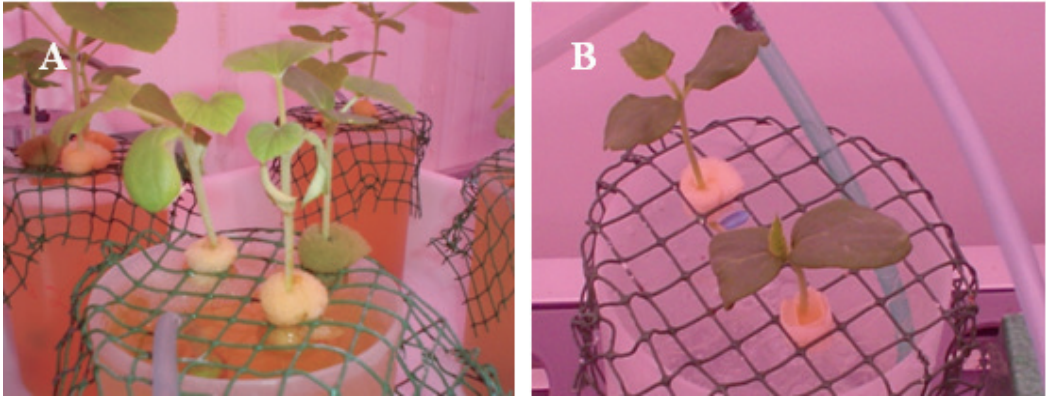


Figura 2. Cultivo de melón hidropónico: (A) Macetas conteniendo solución re-circulante y lixiviado de suelo de un cultivo de melón al aire libre, (B) Maceta conteniendo solamente solución re-circulante (control negativo)

del sobrenadante (modificado de TOMLINSON y THOMAS, 1986), mientras que la suspensión resultante conteniendo las zoosporas fue almacenada a -20°C para su posterior análisis. El número de zoosporas de la suspensión fue estimado mediante el método de CAMPBELL (1988), y el mismo estuvo en el rango de 1×10^5 a 1×10^6 zoosporas/ml. En el segundo procedimiento, aproximadamente 0.05 g de las raíces fueron colocadas en bolsas plásticas pequeñas y maceradas con ayuda de un pistilo. En el caso de los otros hongos, el micelio fue raspado de la superficie del agar, transferido directamente a tubos de microcentrifuga y macerado con ayuda de un micropistilo. Posteriormente, el ADN total fue extraído a partir de estas preparaciones usando el E.Z.N.A® Plant DNA Miniprep Kit (OMEGA Biotech, Doraville, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Los extractos fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis.

Detección de *Olpidium* spp. en agua

Para determinar la efectividad de la multiplex PCR en la detección de *Olpidium* spp. en muestras de agua, un suelo con una historia previa de *Olpidium* spp., procedente de un cultivo de melón al aire libre, fue mezclado con sustrato estéril, en proporción 1:10, respectivamente, en una maceta de capacidad de

2.5 l, la cual fue regada con 2000 ml de agua Milli-Q, a razón de 500 ml cada ocho días. A los ocho días después del último riego, se colectaron 750 ml del lixiviado, se filtraron con papel Whatman no. 4, y se incorporaron 250 ml a la solución re-circulante de un cultivo de melón hidropónico (Fig. 2). El resto del lixiviado (500 ml) fue almacenado a $4-8^{\circ}\text{C}$ e incorporado gradualmente a la solución re-circulante, a razón de 100 ml cada 4 días. Como control negativo, se utilizó un cultivo de melón hidropónico al cual no se le añadió lixiviado. Diez días después de la última aplicación del lixiviado, se colectaron muestras de 1.5 ml de la solución re-circulante, las cuales fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos, descartando seguidamente nueve partes del sobrenadante. Posteriormente, se procedió a extraer el ADN total de la suspensión resultante (conteniendo un rango de 1×10^5 a 1×10^6 zoosporas/ml), así como de las raíces de las plantas de melón del cultivo hidropónico, bajo las mismas condiciones descritas previamente. Adicionalmente, las raíces de las plantas fueron observadas al microscopio para determinar la presencia de esporas de resistencia de *Olpidium* spp.

Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos para las tres especies de *Olpidium* analizadas en

este estudio. Para ello, las secuencias correspondientes a la región rDNA-ITS de *O. bornovanus* (Nos. de accesoión de GenBank AB205214-AB205215), *O. brassicae* (Nos. de accesoión de GenBank AB205209 a AB205213), y *O. virulentus* (Nos. de accesoión de GenBank AB205203 a AB205208), publicadas previamente por SASAYA y KOGANEZAWA (2006) y en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), fueron alineadas con ayuda del programa CLUSTAL X versión 1.83 (JEANMOUGIN *et al.*, 1998). Dichas secuencias fueron analizadas con ayuda del software OLIGO versión 4.0 (National Bioscience Inc., Plymouth, MA), obteniendo tres parejas de cebadores: un cebador reverso común para las tres especies de *Olpidium* y tres cebadores directos específicos para cada una de estas especies (Cuadro 1).

Amplificación mediante multiplex PCR

Para confirmar la identificación morfológica de *Olpidium* spp., los extractos de raíces y agua fueron analizados mediante multiplex PCR. Las concentraciones finales de cada reactivo en la reacción fueron las siguientes: 1x tampón PCR (conteniendo 2 mM MgCl²), 0.4 mM dNTP mix, 1x PVP-40, 1x mezcla de ce-

badores (a una concentración final de 0.2 mM cada cebador), 5 unidades de NETZYME® ADN polimerasa (NEED SL, Valencia, España), aproximadamente 0.01-0.05 mg µl⁻¹ de extractos de ADN total, y agua PCR esterilizada hasta alcanzar un volumen de 50 µl. El ADN de *Olpidium* spp. fue amplificado con ayuda de un termociclador Mastercycler personal 5332 (Eppendorf, Alemania), el cual fue programado para llevar a cabo un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación a 55 °C durante 1 minuto, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Adicionalmente, se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos, este último con la finalidad de sintetizar todos los fragmentos que posiblemente quedaron incompletos, seguido de un paso de enfriamiento a 10 °C hasta que las muestras fueron recuperadas. Como controles negativos, se utilizaron extractos de ADN de raíces de distintas especies de plantas hospederas, las cuales se encontraban libres de *Olpidium* spp., así como micelio de diferentes hongos de suelo y agua PCR, los cuales fueron analizados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los productos amplificados mediante multiplex PCR (5 µl), fueron sometidos a electro-

Cuadro 1. Secuencias de nucleótidos de cebadores específicos de *O. bornovanus*, *O. virulentus*, y *O. brassicae*, diseñados a partir de secuencias de la región rDNA-ITS

Especie	Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Localización en la secuencia (nt)	Tamaño esperado del fragmento (pb)	No. de accesoión GenBank
<i>O. bornovanus</i>	OLPborF ^a	CCGAGGAAATGAGAGAGATGACA	160-1137	977	AB205215
	OLPR ^b	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA			
<i>O. virulentus</i>	OLPvirF ^a	AACCCAAGACCTGCCCAAAAAG	53-632	579	AB205208
	OLPR	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA			
<i>O. brassicae</i>	OLPbraF ^a	AGCTATAGCTCACCTCTTT	396-600	204	AB205213
	OLPR	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA			

^aCebadores directos específicos de cada una de las especies de *Olpidium*

^bCebador reverso común

foresis en un gel de agarosa al 1.2% en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM de EDTA pH 8.0) a 100 voltios durante aproximadamente 1 hora, y los mismos fueron teñidos posteriormente con bromuro de etidio ($0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$). El tamaño de los fragmentos amplificados fue determinado mediante comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler® DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilna, Lituania).

Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN espectrofotométrica fue estimada a partir de extractos de raíces de plantas infectadas de forma individual con *O. bornovanus*, *O. brassicae*, y *O. virulentus*. Dicha estimación fue realizada de esta forma debido a que la unidad de muestreo está conformada por la raíz más el hongo, ya que *Olpidium* spp. no puede ser cultivado en medios sintéticos (GERIK, 1992). Adicionalmente, se estimó la concentración de ADN a partir de extractos de zoosporas, con la finalidad de obtener una medición más exacta del ADN fúngico.

Secuenciación y análisis

Para confirmar la identidad de *O. bornovanus*, *O. brassicae*, y *O. virulentus*, se purificaron dos productos de PCR para cada una de estas especies, con ayuda del High Pure PCR Product Purificación Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), y los mismos fueron secuenciados directamente con los cebadores directos específicos de cada especie, con ayuda del Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing Kit, en un analizador genético (secuenciador) 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas con el Instrumento de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), con secuencias de *Olpidium* spp. disponibles en la base de datos del NCBI. La variación de las secuencias de ADN entre las tres especies de *Olpidium* y dentro de una sola especie fue calculada con el programa DNAMAN versión 4.02 Lynnon Biosoft© 1994-98 (Institute of Plant Patho-

logy, BBA, Alemania). Las secuencias de *O. bornovanus*, *O. brassicae*, y *O. virulentus* obtenidas en este trabajo fueron depositadas en la base de datos de la NCBI bajo los números de acceso EU934039/EU937731, EU981906/EU981907, EU981901/EU981902, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica de *Olpidium* spp.

La identificación morfológica de *Olpidium* spp. fue realizada mediante microscopía (Cuadro 2), determinando su presencia en 52 plantas (39.4%). A lo anterior, basado en la morfología de las esporas de resistencia, *O. bornovanus* (Fig. 3A) y *O. brassicae* sl (Fig. 3B) fueron observados en 27 (20.5%) y 25 (18.9%) de estas plantas, respectivamente (Cuadro 2). Cabe destacar en este sentido, que las esporas de resistencia estrelladas fueron referidas a *O. brassicae* sl, debido a que *O. brassicae* no puede ser distinguido de *O. virulentus* mediante esta característica morfológica (KOGANEZAWA *et al.*, 2005). Por otro lado, se observó una infección mixta, *O. bornovanus*/*O. brassicae* sl (Cuadro 2) en 4 plantas (3.0%), siendo éste el primer reporte de dicha situación, según la literatura consultada. Adicionalmente, en 49 muestras (37.1%) solamente se observaron zoosporangios de *Olpidium* spp. (Fig. 4). Por lo tanto, debido a que los zoosporangios de *O. bornovanus* son similares a los de *O. brassicae* sl (HERRERA-VÁSQUEZ *et al.*, 2007), en dichas muestras no fue posible la identificación hasta el nivel de especie (Cuadro 2), debido a la ausencia de las esporas de resistencia, las cuales no siempre son observadas en las raíces examinadas (KOGANEZAWA *et al.*, 2005). Por consiguiente, la identificación morfológica de *Olpidium* spp. no siempre es posible (HERRERA-VÁSQUEZ *et al.*, 2007), debido a que la característica más importante para diferenciar estas especies es la morfología de las esporas de resistencia (CAMPBELL y SIM, 1994), como

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de *Olpidium* spp

Huésped original	País	Plantas trampa ^a	Identificación morfológica mediante observación microscópica				Detección molecular mediante multiplex PCR			
			<i>O. bor</i> ^b	<i>O. bra</i> sl ^c	<i>O. bor/O. bra</i> sl ^d	<i>Olpidium</i> spp. ^e	<i>O. bor</i> ^f	<i>O. vir</i> ^g	<i>O. bra</i> ^h	<i>O. bor/O. vir</i> ⁱ
Pepino	España	3	3	0	0	0	3	0	0	0
	Brasil	4	0	0	0	3	3	0	0	0
	Guatemala	15	3	0	0	11	13	1	0	1
	Honduras	8	4	1	1	2	6	1	0	1
	México	5	0	1	0	5	4	2	0	1
Melón	Panamá	11	8	0	0	1	9	0	0	0
	España	28	6	3	2	6	12	3	0	2
	Túnez	2	0	2	0	2	2	2	0	2
	Uruguay	1	0	1	0	1	1	1	0	1
	USA	2	0	0	0	2	2	0	0	0
Sandía	Guatemala	3	0	0	0	2	2	0	0	0
	Honduras	3	0	0	0	2	2	0	0	0
	México	2	0	0	0	2	2	0	0	0
	España	10	2	2	1	6	8	2	0	1
Calabacín	España	2	1	0	0	0	1	0	0	0
Brócoli	España	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Col	Portugal	2	0	2	0	0	0	0	2	0
	España	4	0	1	0	2	0	0	3	0
	Holanda	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Escarola	España	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Lechuga	Portugal	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	España	7	0	4	0	1	0	5	0	0
Tomate	Portugal	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	España	13	0	5	0	1	0	6	0	0
Total		132	27	25	4	49	70	25	6	9

^aLas plantas trampa corresponden a la misma especie que el huésped original (huésped homólogo). El número de plantas analizadas corresponden al número de muestras de suelo recogidas en campo

^bMuestras de raíces con esporas de resistencia de *Olpidium bornovanus*

^cMuestras de raíces con esporas de resistencia de *Olpidium brassicae* sl.

^dMuestras de raíces con esporas de resistencia de *O. bornovanus* y *O. brassicae* sl.

^eMuestras de raíces con zoosporangios de *Olpidium* spp.

^fMuestras de raíces positivas a *O. bornovanus*

^gMuestras de raíces positivas a *Olpidium virulentus*

^hMuestras de raíces positivas a *O. brassicae*

ⁱMuestras de raíces positivas a *O. bornovanus* y *O. virulentus*

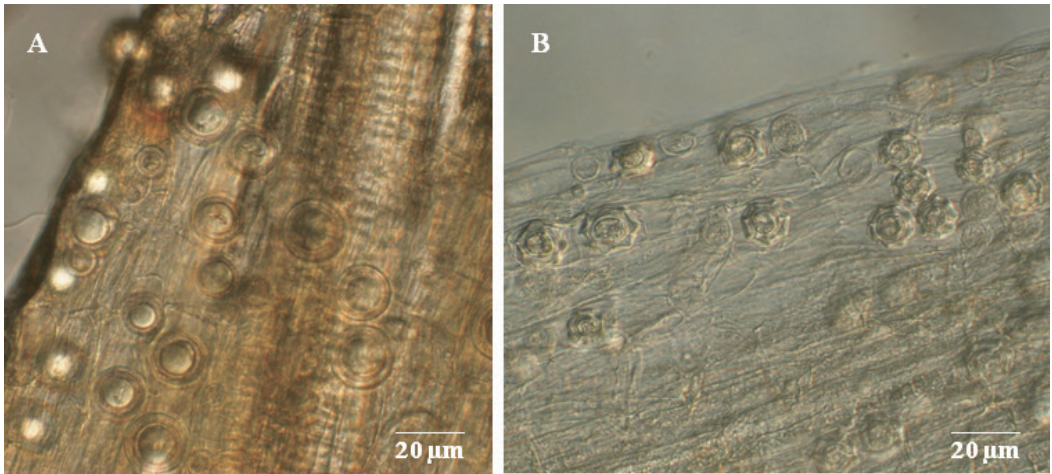


Figura 3. Esporas de resistencia: (A) *Olpidium bornovanus*, (B) *Olpidium brassicae* s.l. Observación 40x

indicamos previamente. No obstante, la identificación morfológica de *Olpidium* spp. resulta tediosa y debe ser realizada por personal cualificado (JIANG y HIRUKI, 1996).

Detección molecular de *Olpidium* spp. en muestras de raíces

Olpidium spp., como hemos indicado en repetidas ocasiones, juega un papel importan-

te como vector de diferentes virus de plantas (ROCHON *et al.*, 2004; SASAYA y KOGANEZAWA, 2006), por lo tanto, resulta necesario disponer de un método de detección específico y sensible que permita la identificación de este hongo. Es importante indicar, en este sentido, que la distribución de *Olpidium* spp. en las raíces de las plantas es al azar, por consiguiente se deben coleccionar varias raicillas del sistema ra-

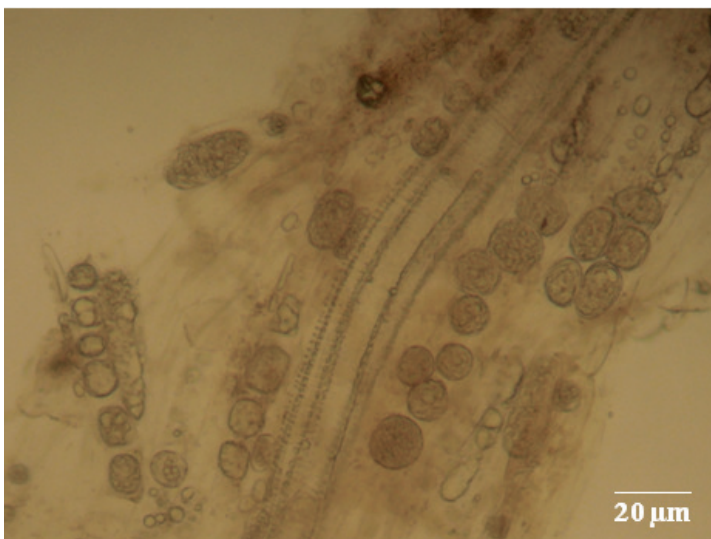


Figura 4. Zoosporangios de *Olpidium* spp. Observación 40x

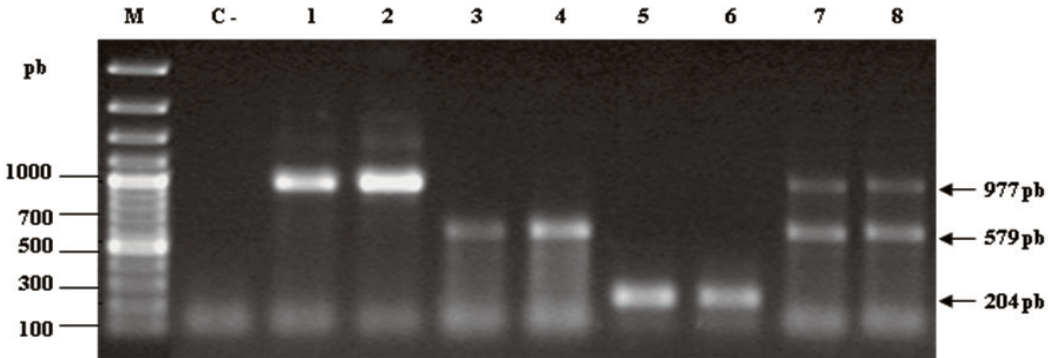


Figura 5. ADN de *Olpidium* spp. amplificados mediante multiplex PCR a partir de raíces de plantas trampa. Líneas 1-2, *O. bornovanus*; 3-4, *O. virulentus*; 5-6, *O. brassicae*; 7-8, Infección mixta *O. bornovanus/O. virulentus*; C-, Control negativo (agua estéril); M, Marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler® DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilna, Lituania)

dicular de las plantas para aumentar la probabilidad de recogida de este tipo de hongos en dichas raíces.

En este trabajo se desarrollaron dos procedimientos de extracción de ADN a partir de raíces y zoosporas, y ambos fueron usados en la detección de *Olpidium* spp. mediante multiplex PCR en todas las muestras analizadas. En general, se detectaron tres especies de *Olpidium* en 101 plantas (76.5%), independientemente del procedimiento de extracción usado, *O. bornovanus*, *O. virulentus*, y *O. brassicae*, los cuales fueron detectados individualmente en 70 (53.0%), 25 (18.9%) y 6 (4.5%) plantas, respectivamente (Cuadro 2). Adicionalmente, se detectó un infección mixta, *O. bornovanus/O. virulentus*, en 9 plantas (6.8%) (Fig. 5, Cuadro 2). Por otro lado, las muestras identificadas como *Olpidium* spp. mediante microscopía, fueron identificadas hasta el nivel de especie mediante multiplex PCR (Cuadro 2). Aunque la técnica multiplex PCR ha sido utilizada previamente para la detección de diferentes especies de hongos, entre ellos, *Monilinia* y *Monilia* en manzana (CÔTÉ *et al.*, 2004), *Eutypa lata* y *Eutypella vitis* en vid (CATAL *et al.*, 2007), y *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* y *P. graminis* f. sp. *tepidi* en cebada y trigo (VAIANOPOULOS *et al.*, 2007), hay que hacer notar, que en el caso de

Olpidium spp., este es el primer reporte de la detección de este hongo mediante dicho método de diagnóstico.

El ADN de *Olpidium* spp. fue amplificado con éxito en ambos procedimientos de extracción, como indicamos previamente. Sin embargo, las bandas obtenidas a partir de las suspensiones de zoosporas presentaron una débil intensidad en comparación con las obtenidas a partir de raíces, ya que en este tejido además de zoosporas podrían estar presentes zoosporangios y esporas de resistencia. Por lo tanto, utilizando este último procedimiento, la concentración de ADN de *Olpidium* spp. resulta ser mayor que el de las zoosporas. Además, el método de extracción a partir de raíces es más sencillo y usualmente se obtienen bandas de mayor intensidad tras la multiplex PCR.

En relación al huésped, *O. bornovanus* fue detectado exclusivamente en cucurbitáceas procedentes de todas las regiones geográficas estudiadas. Por el contrario, *O. virulentus* fue detectado en algunas cucurbitáceas (melón y sandía), así como en lechuga y tomate provenientes de la mayoría de los países incluidos en este estudio. Sin embargo, *O. brassicae* presentó una distribución más restringida en comparación a *O. bornovanus* y *O. virulentus*, y solamente se detectó en brócoli y col procedentes de Portugal y España. En el caso de la

escarola, la cual procedía de España, todas las muestras analizadas resultaron negativas a la infección por *Olpidium* spp. (Cuadro 2).

Por todo lo anterior, el método multiplex PCR desarrollado en este trabajo permite la detección simultánea y diferenciación de *Olpidium* spp., así como la determinación de infecciones naturales mixtas de *O. bornovanus* y *O. virulentus*, que son infecciones no descritas previamente para este tipo de hongos. Adicionalmente, mediante dicho método fue posible la identificación de *Olpidium* hasta el nivel de especie, incluso cuando las esporas de resistencia no fueron observadas.

Detección de *Olpidium* spp. en muestras de agua

Para determinar la efectividad de la multiplex PCR en agua, se analizaron muestras procedentes de un cultivo de melón hidropónico, al cual se le había añadido previamente, para su infección, lixiviado de suelo de un cultivo de melón al aire libre con una historia previa de *Olpidium* spp. En dichas muestras de agua solamente se detectó *O. bornovanus*, así como también se detectó este hongo en las raíces de las plantas de melón del cultivo

hidropónico, las cuales también fueron analizadas mediante multiplex PCR (Fig. 6). No se observaron bandas en el control negativo. Adicionalmente, dichas raíces fueron examinadas mediante microscopía y en las mismas solamente se observó esporas de resistencia de *O. bornovanus*. En este sentido, GÓMEZ y VELASCO (1991) identificaron a *O. bornovanus*, mediante la observación microscópica de raíces procedentes de plantas de melón de Almería (España), las cuales habían sido regadas previamente con agua proveniente de embalses destinados al riego de cultivos de cucurbitáceas. Sin embargo, en este trabajo se reporta por primera vez la detección de este hongo directamente en muestras de agua.

Especificidad de la multiplex PCR

La especificidad de la multiplex PCR fue determinada mediante la amplificación de un solo fragmento, en el caso de las raíces infectadas con una única especie de *Olpidium*, en comparación con la amplificación de varios fragmentos, en el caso de infecciones mixtas naturales y artificiales, utilizando en la mezcla de reacción de la multiplex PCR todos los cebadores de *Olpidium* spp. descritos

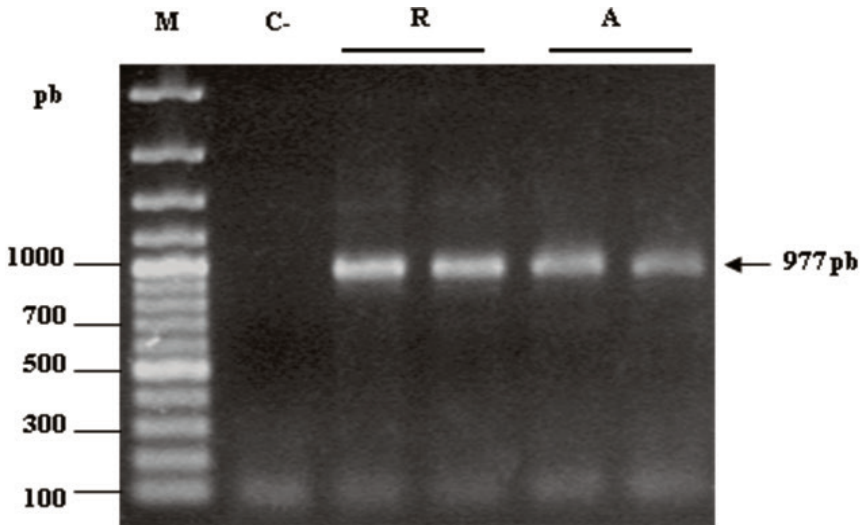


Figura 6. ADN de *O. bornovanus* amplificados mediante multiplex PCR a partir de muestras de raíces (R) y agua (A) de un cultivo de melón hidropónico; C-, Control negativo (agua estéril); M, Marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler® DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilna, Lituania)

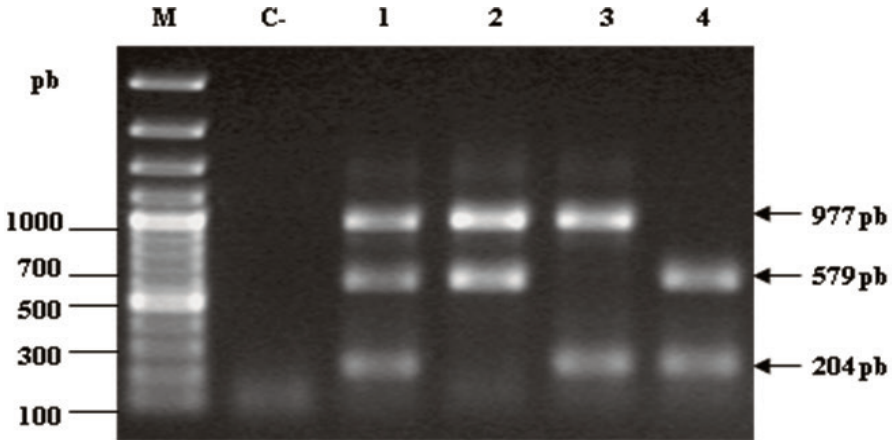


Figura 7. Especificidad de la multiplex PCR. ADN de *Olpidium* spp. amplificados a partir de infecciones artificiales mixtas procedentes de extractos de raíces infectados individualmente con cada especie de *Olpidium*. Línea 1, Infección triple *O. bornovanus*/*O. virulentus*/*O. brassicae*; 2, Infección doble *O. bornovanus*/*O. virulentus*; 3, Infección doble *O. bornovanus*/*O. brassicae*; 4, Infección doble *O. virulentus*/*O. brassicae*; C-, Control negativo (agua estéril); M, Marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler® DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilna, Lituania)

anteriormente. En este sentido, se observaron cuatro patrones de bandas diferentes a partir de las combinaciones realizadas de los extractos infectados (Fig. 7). En el primer caso, se observaron tres bandas de 977, 579 y 204 pb, correspondientes a *O. bornovanus*, *O. virulentus* y *O. brassicae*, respectivamente, y dicho patrón de bandas fue obtenido tras mezclar el ADN de las tres especies de *Olpidium* (Fig. 7). En el segundo, tercero y cuarto caso, se observaron dos bandas específicas, y dicho patrón fue obtenido luego de mezclar el ADN de dos especies de *Olpidium*, en diferentes combinaciones (Fig. 7). Estos resultados fueron comprobados mediante secuenciación de ADN, tal y como se describe posteriormente. Adicionalmente, para determinar si dichos cebadores eran específicos de *Olpidium* spp., se analizaron otros hongos que usualmente están presentes en las raíces de las plantas de campo y en el agua de los cultivos hidropónicos. En este sentido, solamente *Olpidium* spp. fue identificado con estos cebadores en las muestras analizadas, independientemente de la planta hospedera y el origen geográfico estudiado. Por lo tanto, los cebadores diseñados en este trabajo permitieron identificar y

diferenciar la población mundial de *O. bornovanus*, *O. virulentus*, y *O. brassicae*. Sin embargo, es importante indicar que en este trabajo solamente se consideraron las tres especies de *Olpidium* conocidas como vectores de virus de plantas (ROCHON *et al.*, 2004; SASAYA y KOGANEZAWA, 2006).

Sensibilidad de la multiplex PCR

La sensibilidad de la multiplex PCR a partir de infecciones mixtas artificiales de *O. bornovanus*/*O. virulentus*/*O. brassicae*, fue analizada para determinar si la presencia de un coctel de cebadores en la mezcla de reacción de la multiplex PCR podría afectar el límite de detección de *Olpidium* spp.. Para ello, se estimó la concentración de ADN total a partir de los extractos indicados anteriormente, cuantificando por igual aproximadamente $0.137 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de cada extracto infectado, y determinando la cantidad mínima de ADN total (raíz + hongo) necesaria para producir una banda visible tras la multiplex PCR. Posteriormente, estos extractos fueron mezclados por igual en un único tubo de 1.5 ml y, a continuación, se realizaron diluciones seriadas de 1/5 en agua estéril, las cuales fueron analizadas mediante

multiplex PCR, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. En total, se evaluaron doce diluciones seriadas de esta mezcla, observándose *O. bornovanus* y *O. brassicae* hasta la dilución 5^{-9} (aproximadamente $7.0 \times 10^{-8} \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN total). Sin embargo, en el caso de *O. virulentus*, éste fue observado hasta la dilución 5^{-6} (aproximadamente $8.8 \times 10^{-6} \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN total) (Fig. 8A). Adicionalmente, se estimó la concentración de ADN a partir de las suspensiones de zoosporas, para determinar la cantidad mínima de ADN necesaria para producir una banda visible tras la multiplex PCR. En este sentido, se cuantificó aproximadamente $0.137 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de las suspensiones de zoosporas, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. En este sentido, *O. bornovanus* fue observado hasta la dilución 5^{-2} (aproximadamente $5.5 \times 10^{-3} \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN de zoosporas). No obstante, *O. virulentus* y *O. brassicae* fueron observados hasta la dilución 5^{-1} (aproximadamente $2.7 \times 10^{-2} \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN de zoosporas) (Fig. 8B).

La sensibilidad de la multiplex PCR resultó difícil de determinar debido a que *Olpidium* spp. es un parásito obligado de las raíces de las plantas y, por lo tanto, probablemente no es posible determinar la concentración de ADN exacta para este tipo de hongos (JIANG y HIRUKI, 1996). En este sentido, el límite de detección de *Olpidium* spp. fue mayor al analizar las raíces infectadas con el hongo, al contrario que el análisis realizado directamente a las suspensiones de zoosporas, debido a que en las raíces además están presentes zoosporangios y esporas de resistencia, como indicamos anteriormente. En ambos casos, el límite de detección fue diferente para las tres especies de *Olpidium* spp. analizadas, debido probablemente a que la concentración de ADN es variable en este tipo de hongos, por las razones descritas previamente. Por otro lado, JIANG y HIRUKI (1996) indican que el ADN obtenido a partir de las suspensiones de zoosporas podría resultar contaminado con restos de tejido de las raíces del huésped (fragmentos de células epidérmicas). Por lo tanto, la concentración de ADN a partir de las suspensiones de zoosporas proba-

blemente no es muy precisa. En este sentido, Campbell (1988) indica que la cantidad exacta de zoosporas de *Olpidium* resulta muy difícil de determinar y, por lo tanto, la mayoría de los autores utilizan un rango para estimar el número de zoosporas en una suspensión (TOMLINSON y FAITHFULL, 1979; TOMLINSON y THOMAS, 1986; KOGANEZAWA *et al.*, 2005).

Análisis de secuencias de *Olpidium* spp.

Las secuencias de *Olpidium* spp. obtenidas en este estudio fueron comparadas con secuencias publicadas en la base de datos del NCBI. En todos los casos, las secuencias de ADN obtenidas fueron las esperadas. En este sentido, la homología a nivel de secuencia de nucleótidos entre aislados de *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus* fue de 97.3%, 99.4% y 99.8% en la zona del genoma estudiada (rDNA-ITS), respectivamente, mientras que la homología entre *O. virulentus* y *O. brassicae* estuvo en el rango de 81.7-82.3%. No obstante, la homología de secuencias entre estas dos especies y *O. bornovanus* estuvo en el rango de 50.0%-50.6% y 39.1%-42.3%, respectivamente. Por otro lado, *Olpidium* spp. identificado mediante microscopía en muestras de melón y col (Cuadro 2), fue detectado hasta el nivel de especie mediante multiplex PCR, como *O. bornovanus* y *O. brassicae*, respectivamente. Ambas muestras presentaron una similitud de secuencia de 100% con *O. bornovanus* (No. de accesoión de GenBank EU934039) y *O. brassicae* (No. de accesoión de GenBank EU981906) (secuencias obtenidas en este trabajo), respectivamente. Por lo tanto, dichas secuencias no fueron depositadas en la base de datos del NCBI.

Los métodos permiten tres propuestas relevantes: El método multiplex PCR desarrollado en este trabajo resultó ser específico y sensible a las especies de *Olpidium* analizadas en este estudio, y representa un avance significativo en el diagnóstico rutinario de *Olpidium* spp. en muestras de raíces y agua, debido a que antiguamente solamente se realizaba la identificación de este hongo mediante

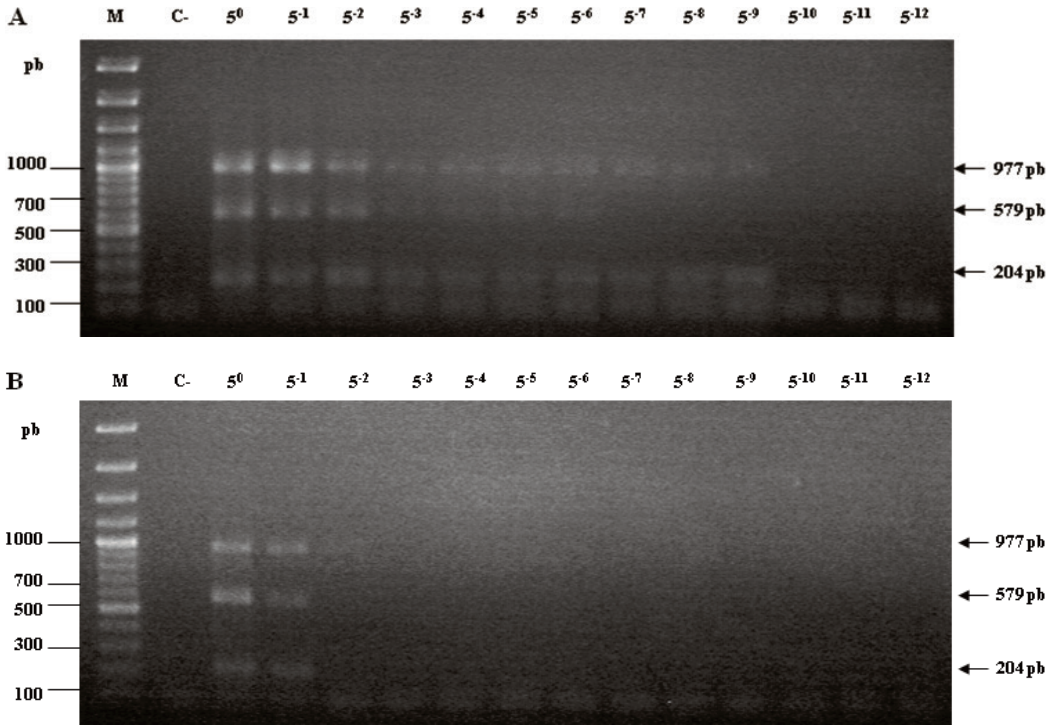


Figura 8. Sensibilidad de la multiplex PCR. ADN de *Olpidium* spp. amplificados a partir de infecciones artificiales mixtas procedentes de: (A) extractos de raíces y (B) extractos de zoosporas infectados individualmente con cada especie de *Olpidium*. Línea 5⁰, aproximadamente 0.137 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de: (A) ADN total (raíz + hongo) y (B) ADN de zoosporas; En ambas figuras, 5¹ a 5¹² se refieren a diluciones seriadas a partir de 5⁰; C-, Control negativo (agua estéril); Las bandas de 977, 579, y 204 pb corresponden a

O. bornovanus, *O. virulentus*, y *O. brassicae*, respectivamente; M, Marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler® DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilna, Lituania).

morfología, pero este último método, además de resultar tedioso, ofrecía la posibilidad de realizar un diagnóstico incorrecto.

El método múltiple PCR, combinado con un rápido y fácil procedimiento de extracción de ADN, podría permitir el análisis rutinario y fiable de un mayor número de muestras para determinar la presencia de *Olpidium* spp., que muchas veces no es posible mediante los métodos convencionales.

El método multiplex PCR permite identificar infecciones simples y múltiples de *Olpidium* spp. en cultivos al aire libre y en cultivos hidropónicos, por lo tanto, este método de diagnóstico podría ser utilizado para determinar el rango y especificidad de hués-

pedes, así como la transmisibilidad de virus por este tipo de hongos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, España, periodo 2004-2007) y del Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, periodo 2007-2010) otorgada a José Angel Herrera Vásquez. Agradecemos también a

la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (DNSV-MIDA, Panamá) por el apoyo vehicular parcial para la realización de los muestreos en cultivos de cucurbitáceas de Panamá. Igualmente, agradecemos a la Dra. M. L. Herrero (Bioforsk, División de Sanidad Vegetal y Protección Fitosanitaria, Noruega) y al Dr. J.C. Tello (Departamento de Producción Vegetal de

la Universidad de Almería, España) por proporcionar los aislados fúngicos utilizados para determinar la especificidad de la multiplex PCR, y al Dr. R. Beltrán por proporcionar las muestras de suelo procedentes de Brasil. Este trabajo fue realizado como parte del Proyecto AGL 2005-06682-C03-01 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CI-CYT), España.

ABSTRACT

HERRERA VÁSQUEZ, J. A., M. C. CEBRIÁN, A. A. FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, C. JORDÁ. 2012. Morphological and molecular identification and differentiation of *Olpidium* spp. *Bol. San. Veg. Plagas*, **38**: 371-386

A multiplex PCR method has been developed to detect, differentiate, and confirm the morphological identification of three root infecting *Olpidium* spp.: *O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. Of the 132 root samples examined, 101 samples (76.5%) were infected by *Olpidium* spp.. Based on the morphology of resting spores, the presence of *O. bornovanus* was confirmed in 27 samples (20.5%), whereas species identity could not be determined for the remaining samples because they failed to reproduce sexually. With multiplex PCR, it was possible to determine the *Olpidium* identity of all the infected samples, even when resting spores were not formed. This method was also effective for detecting *Olpidium* spp. in water samples. In addition, the specificity and sensitivity of multiplex PCR were evaluated. The multiplex PCR method was validated with samples of 9 different crops from 11 countries of America, Europe, and Africa.

Keywords: diagnosis, specificity, sensitivity.

REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.
- CAMPBELL, R.N. 1988. Cultural characteristics and manipulative methods. In: Cooper, J.I., Asher, M.J.C. (eds), *Viruses with Fungal Vectors*. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, U.K, pp. 153-165.
- CAMPBELL, R.N., SIM, S.T. 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany*, **72**: 1136-1143.
- CATAL, M., JORDAN, S.A., BUTTERWORTH, S.C., SCHILDER, A.M.C. 2007. Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. *Phytopathology*, **97**: 737-747.
- CÔTÉ, M.J., TARDIF, M.C., MELDRUM, A.J. 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*, **88**: 1219-1225.
- CROUS, P.W., HONG, L., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. 2001. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on *Myrtaceae*. *Mycological Research*, **105**: 425-431.
- CUBETA, M.A., ECHARDI, E., ABERNETHY, T., VILGALYS, R. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology*, **81**: 1395-1400.
- DUNNE, C.P., GLEN, M., TOMMERUP, I.C., SHEARER, B.L., HARDY, G.E. 2002. Sequence variation in the rDNA ITS of Australian *Armillaria* species and intra-specific variation in *A. luteobubalina*. *Australian Plant Pathology*, **31**: 241-251.
- GERIK, J.S. 1992. Zoospore obligate parasites of roots. In: Singleton, L.L., Mihail, J.D., Rush, C.M. (eds), *Methods for Research on Soilborne Phytopathogen-*

- ic Fungi. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 18-24.
- GÓMEZ, J., VELASCO, V. 1991. Presencia de *Olpidium radiale* en los embalses para riego en Almería. *Phytoma-Spain*, **33**: 23-27.
- HERRERA-VÁSQUEZ, J.A., CEBRIÁN, M.C., ALFARO-FERNÁNDEZ, A., JORDÁ, C. 2007. Molecular variability of different isolates of *Olpidium bornovanus*. In: XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italy, p. 275.
- HIRUKI, C. 1987. Recovery and identification of *Tobacco stunt virus* from air-dried resting spores of *Olpidium brassicae*. *Plant Pathology*, **36**: 224-228.
- JEANMOUGIN, F., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J.M., GOUY, M., HIGGINS, G. 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**: 403-405.
- JIANG, L., HIRUKI, C. 1996. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radiale* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, **26**: 87-93.
- JORDÁ, C., ARMENGOL, J., GISBERT, J., OSCA, J.M., LACASA, A., VELÁSQUEZ, B. 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *Phytoma-Spain*, **138**: 118-121.
- KOGANEZAWA, H., INOUE, H., SASAYA, T. 2005. Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae sensu lato* and its related *Olpidium* sp. *Bulletin of the National Agricultural Research Center for Western Region*, **4**: 39-59.
- KULARATNE, H.A.G.C., LAWRIE, A.C., BARBER, P.A., KEANE, P.J. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research*, **108**: 1476-1493.
- LANGE, L., INSUNZA, V. 1977. Root-inhabiting *Olpidium* species: the *O. radiale* complex. *Transactions of the British Mycological Society*, **69**: 377-384.
- LEE, S.B., TAYLOR, J.W. 1992. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 636-653.
- ROCHON, D.A., KAKANI, K., ROBBINS, M., READE, R. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology*, **42**: 211-241.
- SASAYA, T., KOGANEZAWA, H. 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Tobacco stunt virus*, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology*, **72**: 20-25.
- SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P.R., MEEHAN, B.M., BROWN, A.E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, **39**: 499-512.
- TOMLINSON, J.A., FAITHFULL, E.M. 1979. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Olpidium brassicae*. *Annals of Applied Biology*, **93**: 13-19.
- TOMLINSON, J.A., THOMAS, B.J. 1986. Studies on *Melon necrotic spot virus* disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radiale*). *Annals of Applied Biology*, **108**: 71-80.
- VAIANOPOULOS, C., BRAGARD, C., MOREAU, V., MARAITE, H., LEGRÈVE, A. 2007. Identification and quantification of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f. sp. *tepida* on barley and wheat. *Plant Disease*, **91**: 857-864.
- WARD, E., AKROFI, A.Y. 1994. Identification of fungi in the Gaeumannomyces-Phialophora complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycological Research*, **98**: 219-224.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds), PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

(Recepción: 9 abril 2012)

(Aceptación: 12 junio 2012)