Identificación de especies anamórficas de añublos polvorientos (Ascomycota: Orden Erysiphales) presentes en plantas ornamentales y aromáticas en Puerto Rico

Por
Laura Luisette Bonilla Avilés

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en
Protección de Cultivos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2012

Aprobado por:

_____ _____
Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D. Fecha
Presidente, Comité Graduado

_____ _____
Lydia I. Rivera Vargas, Ph. D. Fecha
Miembro, Comité Graduado

_____ _____
Belinda Román Avilés Ph. D. Fecha
Miembro, Comité Graduado

_____ _____
José Pablo Morales Payán, Ph. D. Fecha
Miembro, Comité Graduado

_____ _____
Yuri Rojas, Ph. D. Fecha
Representante Estudios Graduados

_____ _____
Hipólito O'Farrill Nieves, Ph. D. Fecha
Director Interino del Departamento

ABSTRACT

In surveys conducted during 2010 to 2012 in central and southwest Puerto Rico the causal agents of powdery mildews in ornamental and aromatic herbs were identified. Weeds associated with the crops surveyed infected with powdery mildew were collected to determine if they were wild hosts and the source of primary inoculum. The morphological characterization of powdery mildew was performed using light microscopy, humid chamber conditions and scanning electron microscope (SEM). Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of ITS region of the rDNA were used to identify the different species. Twenty samples were collected with symptoms and signs of powdery mildew, eighteen of ornamental plants and two herb species. We identified fifteen species of different genera affecting economically important crops. The most important genus identified was *Erysiphe*, a total of nine different species affecting ornamental plants. New reports of powdery mildew for Puerto Rico in ornamental and herb plants are *Podosphaera fusca* affecting *Gerbera jamesonii*, *Erysiphe acalyphae* in *Acalypha wilkesiana*, *E. quercicola* infecting *Angelonia augustifolia*, *E. peruviana* in *Tecoma capensis*, *E. polonica* in *Hydrangea macrophylla* and *Oidium poinsettia* on *Euphorbia heterophylla*. Within herb plants *E. heraclei* and *E. pisi* were identified in *Anethum graveolens* and *Eryngium foetidum* respectively. In common weeds and nurseries samples *E. rusellii* was identified as the causal agent of powdery mildew in *Oxalis barrelieri* and *Oidium poinsettia* in *Euphorbia heterophylla*, the same pathogen that was identified in *E. pulcherrima*. It is very clear that there is a high specificity between powdery mildew, hosts or between families; the case of the euphorbias, *E. pulcherrima* and *E. heterophylla* was identified *O. poinsettiae* as the causal agent of powdery mildew.

RESUMEN

En muestreos realizados durante el 2010 al 2012 en la zona central y suroeste de Puerto Rico se identificaron los organismos causantes de añublo polvoriento (Ascomycota: Orden Erysiphales) en plantas ornamentales y aromáticas. Se recolectaron malezas asociadas a los cultivos infectadas con añublo polvoriento para determinar si éstas eran hospederos silvestres y la fuente de inóculo primario. La identificación de los añublos polvorientos se realizó mediante caracterización morfológica y molecular. La caracterización morfológica incluyó microscopía de luz y electrónica de rastreo (SEM). Para el análisis de ADN se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de la región ITS del rADN. Se recolectaron veinte muestras con síntomas y signos de añublo polvoriento; 18 de ornamentales y dos de aromáticas. Se identificaron 15 especies diferentes de añublos polvorientos afectando a cultivos de importancia económica. El género de mayor importancia fue *Erysiphe* con un total de nueve especies. Nuevos reportes de añublo polvoriento para Puerto Rico en plantas ornamentales y aromáticas son: *Podosphaera fusca* afectando a *Gerbera jamesonii*, *Erysiphe acalyphae* en *Acalypha wilkesiana*, *E. quercicola* infectando a *Angelonia augustifolia*, *E. peruviana* en *Tecomaria capensis*, *E. polonica* en *Hydrangea macrophylla* y *Oidium poinsettia* en *Euphorbia heterophylla*. En las aromáticas como eneldo, *Anethum graveolens* y culantro, *E. foetidum* se encontraron los hongos *E. heraclei* y *E. pisi* respectivamente. En las malezas comunes se identificó a *E. ruselli* como al agente causal de añublo polvoriento en *Oxalis barrelieri* y a *Oidium poinsettia* en *Euphorbia heterophylla*; el mismo patógeno que se identificó en pascua (*E. pulcherrima*). Fue evidente la alta especificidad entre los añublos polvorientos y su hospedero o entre las familias de los hospederos, como lo fue en el caso de las euphorbias, *E. pulcherrima* y *E. heterophylla* que se identificó a *O. poinsettiae* como el agente causal de añublo polvoriento.

A mis queridos padres: Luis G. Bonilla y Mary A. Avilés por todo su esfuerzo y apoyo en mis años de formación académica.

A mi hermano Luis III Bonilla, su esposa Charlotte Tirado y Julia Isabel Bonilla, por todo su apoyo incondicional.

A mis abuelos: Carlos Avilés y Julia Lugo, por ser una fuente de energía para seguir luchando.

AGRADECIMIENTOS

- Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Consuelo Estévez de Jensen, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el proyecto T-STAR 126. Muchas gracias por su comprensión, apoyo, consejos y conocimiento que me brindó durante mis años de estudio.
- Gracias a la Dra. Lydia I. Rivera Vargas por sus valiosos consejos que me permitieron crecer profesional, personalmente y bridarme de su conocimiento en mis años de formación académica.
- En la parte molecular quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Belinda Román por haberme brindado de su tiempo y de su conocimiento.
- Al Dr. José Pablo Morales Payán por sus conocimientos y recomendaciones durante la investigación y formación academica.
- Al personal administrativo y técnico de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz por el desarrollo de la parte experimental en el campo, en especial al Agro. Carlos Almodóvar y al Agro. Ariel Aponte.
- A los Agrónomos Luis E. Collazo y Víctor M. González por su colaboración.
- A mi compañera de laboratorio Elena Latoni por su ayuda, entrega y conocimiento brindado durante mis años de maestría.
- A mis compañeros y amigos de investigación durante mis años de estudio Verónica Acevedo, Jessica Torres, Luz M. Serrato, Alberto Umpierre y Gabriela Romero.
- Gracias al Proyecto T-STAR 126 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) que financió este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS x

LISTA DE FIGURAS xii

1.0 JUSTIFICACIÓN 1

2.0 REVISIÓN DE LITERATURA 5

2.1 Clasificación Taxonómica 5

2.2 Síntomas y Signos 5

2.3 Reproducción asexual 6

2.4 Micelio, apresorio y haustorio 9

2.5 Reproducción sexual 11

2.6 Ciclo de vida 13

2.7 Géneros de importancia económica 14

2.8 Condiciones ambientales 15

2.9 Periodo de latencia 15

2.10 Rango de hospederos 16

2.11 Sistemática 17

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS 19

3.1 Estudio observacional sobre la incidencia de añublos polvorientos en plantas aromáticas 19

3.1.1 Predio Experimental 19

3.2 Monitoreo del predio experimental 21

3.3 Muestro de malezas asociadas al cultivo 21

3.4 Muestro en viveros 21

3.4.1 Recolección de añublos polvorientos 21

3.4.2 Procesamiento de muestras 23

3.4.3 Laminillas semipermanentes 24

3.4.4 Germinación de conidias 24

3.4.5 Microscopía Electrónica de Rastreo 24

3.5 Identificación molecular de los añublos polvorientos 25

3.5.1Extracción de ADN 25

3.5.2 Análisis del ADN 26

4.0 RESULTADOS 29

4.1 Sintomatología y caracterización morfológica de añublos polvorientos en plantas ornamentales 29

4.1.1 *Lagerstroemia indica* 29

4.1.2 *Gerbera jamesonii* 32

4.1.3 *Zinnia elegans* 35

4.1.4 *Rosa* spp. 38

4.1.5 *Hydrangea macrophylla* 41

4.1.6 *Euphorbia pulcherrima* 44

4.1.7 *Bixa orellana* 47

4.1.8 *Angelonia angustifolia* 50

4.1.9 *Anethum graveolens* 53

4.1.10 *Cleome viscosea* 56

4.1.11 *Helianthus annus* 58

4.1.12 *Acalypha wilkesiana* sub sp. *wilkesiana* 61

4.1.13 *Tecomaria capensis* 64

4.1.14 *Kalanchoe blossfeldiana* 67

4.1.15 *Begonia multinervia* 70

4.1.16 *Torenia fournieri* 73

4.1.17 *Oxalis barrelieri* 76

4.1.18 *Euphorbia heterophylla* 79

4.1.19 *Sonchus oleraceus* 82

4.1.20 *Eryngium foetidum* 85

4.2 Identificación molecular de añublos polvorientos 88

4.3 Filogenia 89

5.0 DISCUSIÓN 92

5.1 Caracterización morfológica de añublos polvorientos 92

5.1.1 *Erysiphe australiana* 92

5.1.2 *Podosphaera fusca* 93

5.1.3 *Golovinomyces cichoracearum* 93

5.1.4 *Podosphaera pannosa* 94

5.1.5 *Erysiphe polonica* 95

5.1.6 *Oidium poinsettiae* 95

5.1.7 *Oidium bixae* 96

5.1.8 *Erysiphe quercicola* 97

5.1.9 *Erysiphe heraclei* 98

5.1.10 *Podosphaera* sp. 98

5.1.11 *Erysiphe acalyphae* 99

5.1.12 *Erysiphe peruviana* 99

5.1.13 *Oidium calanchoeae* 100

5.1.14 *Erysiphe begoniicola* 101

5.1.15 *Erysiphe russellii* 101

5.1.16 *Erysiphe pisi* 102

5.2 Evaluación de la infección natural de añublo polvoriento en un predio experimental 102

5.3 Herbario 103

5.4 Amplificación de secuencias del ADN ribosomal 103

5.5 Secuencias analizadas mediante BLASTn 103

5.6 Filogenia 104

6.0 CONCLUSIONES 106

7.0 RECOMENDACIONES 107

8.0 LITERATURA CITADA 108

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de patrones superficiales de conidias de los añublos polvorientos bajo microscopía electrónica de rastreo descritas por Braun *et al*. 2002 7

Cuadro 2. Nombres científicos y comunes de especies de plantas aromáticas sembradas en Juana Díaz, P.R. para Enero 2010, Diciembre 2010 y Enero 2012 20

Cuadro 3. Localización geográfica de los lugares donde se realizó la recolección de muestras de añublos polvorientos en plantas ornamentales y aromáticas 22

Cuadro 4. Especies y números de accesiones tomadas del Centro Nacional para Información Biotecnológica (GeneBank) para llevar a cabo análisis filogenéticos 28

Cuadro 5. Observaciones morfológicas de *Erysiphe (*syn. *Uncinula) australiana* 29

Cuadro 6. Observaciones morfológicas de *Podosphaera fusca* 32

Cuadro 7. Observaciones morfológicas de *Golovinomyces cichoracearum* 35

Cuadro 8. Observaciones morfológicas de *Podospahera pannosa* 38

Cuadro 9. Observaciones morfológicas de *Erysiphe (Microsphaera) polonica* 41

Cuadro 10. Observaciones morfológicas de *Oidium poinsettiae* 44

Cuadro 11. Observaciones morfológicas de *Oidium bixae* 47

Cuadro 12. Observaciones morfológicas de *Erysiphe quercicola* 50

Cuadro 13. Observaciones morfológicas de *Erysiphe heraclei* 53

Cuadro 14. Observaciones morfológicas de *Podosphaera* sp 55

Cuadro 15. Observaciones morfológicas de *Golovinomyces cihoracearum* 58

Cuadro 16. Observaciones morfológicas de *Erysiphe acalyphae* 61

Cuadro 17. Observaciones morfológicas de *Erysiphe peruviana* 64

Cuadro 18. Observaciones morfológicas de *Oidium calanchoeae* 67

Cuadro 19. Observaciones morfológicas de *Erysiphe begoniicola* 70

Cuadro 20. Observaciones morfológicas de *Podosphaera* sp 73

Cuadro 21. Observaciones morfológicas de *Erysiphe russellii* 76

Cuadro 22. Observaciones morfológicas de *Oidium poinsettia* 79

Cuadro 23. Observaciones morfológicas de *Golovinomyces cichoracearum* 82

Cuadro 24. Observaciones morfológicas de *Erysiphe pisi* 85

Cuadro 25. Identificación molecular de añublos polvorientos utilizando la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal 89

FIGURAS

Figura 1. Mapa de Puerto Rico con los pueblos muestreados durante junio del 2010 hasta diciembre del 2011…….23

Figura 2. (A) Sintomatología en el campo. (B) Conidias elipsoidal. (C) Conidióforo simple. (D) (E) Germinación terminal de las conidias……..…..30

Figura 3. *Erysiphe (syn. Uncinula) australiana.* (A) Sintomatología en *Lagerstroemia indica*. (B) Conidias elipsoidales. (C) Conidióforo simple. (D) y (E) Germinación terminal de las conidias. Obsérvese desarrollo de múltiples tubos germinativos en posición terminal…….…….31

Figura 4. Gerbera jamesonii, planta ornamental comúnmente conocida como margarita africana. (A) Añublo polvoriento en la flor y (B) Arreglo de plantas en un vivero comercial en la zona central de Puerto Rico, obsérvese infección severa en las hojas. (C) Germinación de la conidia tipo Fuliginea (=*Magnicellulatae*). (D) Conidióforos en cadena y conidias con cuerpos de fibrosina (Microscopía de Nomarsky)…….……..33

Figura 5. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera fusca*. (A) Lado terminal de la conidia con anillos concéntricos, se observa además el septo donde estaba pegada al conidióforo (10000X). (B) y (C) Conidia deshidratada en la cual se observa una superficie ondulada. (D) Conidióforos en cadena y apresorio simples (500X)……..34

Figura 6. *Golovinomyces cichoracerum* (A) Inflorescencia de *Zinnia elegans* con un alto porcentaje de severidad del patógeno. (B) Planta adulta de *Zinnia elegans* infectada con añublo polvoriento en la cual se pueden observar coccinélidos alimentándose del patógeno. (C) Conidióforo en cadena (40x). (D) Conidia germinando por el extremo subterminal con apresorio simple (40x). (E) Conidia cubierta por el hiperparásito *Ampelomyces quisqualis* (40x)……36

Figura 7. Microscopía electrónica de rastreo para *Golovinomyces cichoracearum* en *Zinnia elegans*. (A) Conidia madura con extremos fibrilares (3500X). (B) Superficie rugosa de la conidia (5000X). (C) Lado terminal fibrilar (7500X). (D) Conidióforo en cadena deshidratado (1000X)……...……...……37

Figura 8. *Podosphaera pannosa* (A) Planta sintomática de *Rosa* spp. se observa la presencia de añublo polvoriento en brotes nuevos. (B) Conidias cilíndricas (40x). (C) Conidioforos en cadena (10x). (D) Conidias maduras con cuerpos de fibrosina (40x)……..39

Figura 9. Microscopía electrónica de ratreo para *Podosphaera pannosa*. (A) Conidia madura sobre tejido de rosa (5000X). (B) Conidias cilíndricas con extremos arrugados (1500X). (C) Apresorio apezonado en la hifa (5000X). (D) Conidióforo en cadena (750X)……..……..40

Figura 10. *Erysiphe (Microsphaera) polonica* (A) Planta sintomática de hortensia. (B) Conidióforo con célula basal recta. (C) Conidias maduras (40x). (D) Apresorios lobulados en hifa sobre tejido vegetal del hospedero (40x)……..42

Figura 11. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe (Microsphaera) polonica*. (A) Conidióforo simple con célula basal recta (1500X). (B) Conidia madura (3500X). (C) y (D) Apresorio multilobulado típico de ésta especie (3500X)……43

Figura 12. *Oidium poinsettiae*. (A) Hoja de pascua infectada. (B) (C) y (E) Se observan conidias con tubo germinativo terminal, presentando apresorio lobulado al final del tubo germinativo (40x). (D) Célula basal del conidióforo arqueada. (Técnica de Nomarsky)……..45

Figura 13. Microscopía electrónica de rastreo para *Oidium poinsettiae*. (A) Conidióforo simple tipo Euoidium (1500X). (B) Conidióforo en el cual se observa la base arqueada (1500X). (C) Conidia ovoide (5000X) (D) Apresorio lobulado en la hifa sobre la superficie del hospedero (1500X)……..……46

Figura 14. *Oidium bixae* (A) Hojas infectadas con añublo polvoriento en el haz y envés de la hoja. (B) Tubo germinativo alargado sin apresorio. (C) Conidias limoniformes, tubo germinativo sub-terminal luego de 5 horas (40x). (D) Tubo germinativo relativamente largo en algunos casos presentando apresorio bifurcado al final (10 horas) (40x)……...……..48

Figura 15. Microscopía electrónica de rastreo para *Oidium bixae*. (A) y (B) Conidias maduras, se observan lados terminales fibrilares y superficies rugosas (3500X). (C) Hifa deshidratada donde se observa el apresorio multilobulado (5000X). (D) Lado terminal de la conidia, donde se observan patrones fibrilares alrededor del septo (1000X)……....49

Figura 16. Sintomatología de añublo polvoriento *Erysiphe quercicola* en *Angelonia augustifolia*……51

Figura 17. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe quercicola*. (A) Conidia madura la cual presenta superficies laterales fibrilares y su superficie rugosa (5000X). (B) Apresorio de forma apezonada en la hifa (5000X). (C) y (D) Conidióforos en cadenas cortas (1000X)……...52

Figura 18. *Erysiphe heraclei* en eneldo (*Anethum graveolens*). (A) Planta con añublo

polvoriento en la base del tallo. (B) (D) y (E) Conidias cilíndricas germinadas por el extremo terminal con tubo germinativo moderadamente largo sin apresorio al final (40x). (C) Conidióforo simple de *Erysiphe heraclei* (40x)…….……54

Figura 19. *Podosphaera* sp. en cleome (*Cleome viscosa*). (A) Predio donde se sembraron las plantas medicinales en la Estación Experimental de Juana Díaz; se puede observar la agresividad de la planta en el predio. (B) Planta infectada con añublo polvoriento. (C) y (D) Germinación tipo Fuliginea (=*Magnicellulatae*) (40x)…….……..56

Figura 20. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera* sp. (A) Conidia deshidratada donde se observa la superficie ondulada (5000X). (B) Parte terminal de la conidia, se observan anillos concéntricos (7500X). C. Apresorio de forma apezonada (3500X)……..57

Figura 21. *Golovinomyces cichoracearum* en girasol (*Helianthus annuus*). (A) y (B) Síntomas y signos de añublo polvoriento ocasionado por *Golovinomyces* sp. en *Helianthus annus*. (C) Conidióforo con célula basal recta (40x). (D) Conidias maduras con lados terminales subtruncados (40x)……59

Figura 22. Microscopía electrónica de rastreo para *Golovinomyces cichoracearum*. (A) Conidia madura donde se observa la superficie rugosa y lados terminales subtruncados (3500X). (B) Parte terminal de la conidia donde se observa la superficie fibrilar de la conidia y superficie rugosa (2000X). (C) Conidióforo en cadenas cortas 3 a 4 conidias (500X). (D) Conidias maduras en la parte termianl del conidióforo (1500X)……60

Figura 23. *Erysiphe acalyphae* en *Acalypha wilkesiana*. (A) Síntomas del añublo polvoriento en hojas. (B) y (C) Múltiples tubos germinativos tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*) (40x). (D) Conidióforo simple con célula basal recta (40x). (E) Conidias maduras de forma ovoide a cilíndrica (40x)……..…….62

Figura 24. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe acalyphae*. (A) Conidias maduras con extremos subtruncados (B) y (C) Conidias maduras parasitadas por *Ampelomyces quisqualis*, (3500X). (D) Apresorio de forma apezonada (5000X)……63

Figura 25. *Erysiphe peruviana* en *Tecomaria capensis*. (A) Arbusto donde se observa la presencia del patógeno en hojas nuevas. (B) Flor y hojas maduras. (C) Conidia madura presentando tubo germinativo sub-terminal moderadamente largo sin apresorio (40x)……65

Figura 26. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe peruviana*. (A) y (B) Conidias maduras de *E. peruviana*, se observan los lados terminales fibrilares y la superficie de la conidia

rugosa (2000X). (C) Apresorio lobulado (3500X)……66
Figura 27. *Oidium calanchoeae* en bruja, *Kalanchoe blossfeldiana*. (A) Incidencia de añublo polvoriento en hojas maduras. (B) Conidióforos en cadenas simples con célula basal recta. (C) Germinación de la conidia por el extremo lateral-subterminal (4horas) (40x). (D) Germinación sin apresorio al final de tubo germinativo (12 horas) (40x)……..……68
Figura 28. Microscopía electrónica de rastreo de *Oidium calanchoeae*. (A) y (B) Apresorio lobulado a multiloblado en la hifa sobre la superficie del hospedero (3500X). (C) Conidia madura pegada al conidióforo, donde se observa una superficie lisa (2000X)……69
Figura 29. *Erysiphe begoniicola* en begonia (*Begonia multinervia*). (A) Sintomatología de añublo polvoriento en la begonia silvestre. (B) Germinación tipo *Pseudoidium* (=Polygoni), tubo germinativo corto sin apresorio. El desarrollo del tubo germinativo se observa en los lados sub-terminales de las conidias maduras……..……..71
Figura 30. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe begoniicola* (A) Conidia madura, donde se observa la conidia con superficie arrugada (3500X). (B) Conidióforos rectos y cortos, apresorio multilobulado en la hifa sobre la superficie del hospedero (3500X). (C) Conidióforos típicos de un *Pseudoidium* y apresorio lobulado (750X). (D) Apresorio multilobulado en la hifa (3500X)……..……72
Figura 31. *Podosphaera* sp. en *Torenia fournieri*. (A) Planta sintomática (B) y (C) Conidias maduras con cuerpos de fibrosina (40x). (C) Conidia germinada por el extremo lateral sin apresorio conspicuo tipo Pannosa (=*Fribroidium*) (40x). (E) Conidióforo en cadena típico de *Podosphaera* sp. (10x)……..……74
Figura 32. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera* sp. (A) Conidióforos en cadena típico de la tribu Cystotheceae y apresorio indistinto en micelio epifito (750X). (B) y (C) Conidióforos en cadena de *Podosphaera* sp. (750X). (D) Conidia cilíndrica madura (3500X)...75
Figura 33. *Erysiphe russellii* en oxalis (*Oxalis barrelieri*). (A) Planta infectada con añublo polvoriento. (B) y (C) Tipo de germinación Cichoracearum (=*Reticuloidium*) el cual presenta tubo germinativo terminal o en ocasiones un poco lateral, su tamaño va de corto a moderadamente largo con apresorio bifurcado (40x). (D) Conidióforo de *E. russellii* con célula basal curva (40x)……...……77
Figura 34. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe russellii*. (A) Conidióforo con célula basal curva (2000X). (B) Conidia con bordes lisos y superficie levemente rugosa

(3500X)…….……78
Figura 35. *Oidium poinsettiae* en leche vana (*Euphorbia heterophylla*). (A) Planta con alta severidad de añublo polvoriento. (B) Conidia cilíndrica con germinación terminal-lateral (40x). (C) Apresorio lobulado en hifa (40x). (D) Conidióforo tipo Pseudoidium con célula basal curva (40x)……..…….80
Figura 36. Microscopía electrónica de rastreo para *Oidium poinsettiae*. (A) y (B) Conidióforos con célula basal curva (2000X). (C) Apresorio lobulado en la hifa (5000X)……...…….81
Figura 37. *Golovinomyces cichoracearum* en (*Sonchus oleraceus*). (A) y (B) Vivero de pascuas en Aibonito. Se puede observar la presencia de la maleza *Sonchus oleraceus* L. debajo de los bancos y en algunos casos entrelazada en la planta de pascua. (C) Conidias de *G. cichoracearum* con microscopia de luz (40x). (D) Apresorio apezonado en hifa (40x). (E) Germinación tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*), tubo germinativo corto sin apresorio (40x)…….83
Figura 38. Microscopía electrónica de rastreo para *Golovinomyces cichoracearum* (A) y (D) Conidióforos de maduros de *G. cichoracearum* en cadenas (1000X). (B) Conidia madura donde se observa lados terminales fibrilares y superficie rugosa (2000X). (C) Conidióforo típico de *Golovinomyces* sp. se observa también apresorio apezonado (papilado) en la hifa (1500X)…....84
Figura 39. *Erysiphe pisi* en recao (*Eryngium foetidium*). (A) Planta infectada de añublo polvoriento mayormente en hojas maduras. (B) Corte de tejido donde se observan los conidióforos simples (10x). (C) Conidia con germinación bifurcada (40x). (D) Conidias germinadas donde se observa la germinación por lados terminales (40x)……....86
Figura 40. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe pisi*. (A) Conidióforo corto típico de *E. pisi* (1500X). (B) Conidia donde se observa la superficie arrugada (3500X). (C) Apresorio lobulado a multilobulado en hifa (3500X). (D) Lado terminal de la conidia fibrilar (10000X)....87
Figura 41. Gel de agarosa del producto de PCR de la región ITS del ADNr utilizando los primers ITS1/ITS4. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; segunda fosa aislado LB39 de *Podosphaera pannosa*; tercera fosa aislado LB51 de *Podosphaera fusca*; cuarta fosa aislado 691 de *Ery siphe pisi*; quinta fosa aislado LB52 de *Erysiphe australiana*……...88
Figura 42. Árbol filogenético generado por el método neigbor-joining de secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de diferentes especies de añublos polvorientos (Orden Erysiphales). Se utilizó un parámetro de bootstraps con 1000 repeticiones……...….90

Figura 43. Árbol filogenético generado por el método de Maximun Likelihood Tree con secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de diferentes especies de añublos polvorientos (Orden Erysiphales). Se utilizó un parámetro de bootstraps con 1000 repeticiones……...…..91

1.0 Justificación

Las plantas ornamentales se cultivan y se comercializan con un propósito principal, mostrar su belleza (Whistler, 2000). En Puerto Rico la producción de plantas ornamentales aportó para el año fiscal 2010-2011, $36,592 millones de dólares (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2010). Los pueblos de mayor producción de plantas ornamentales y aromáticas se encuentran mayormente en el centro de la isla en los municipios de Aibonito, Barranquitas, Vega Alta, Dorado y Patillas. La aportación de las plantas aromáticas y/o medicinales para el año fiscal 2010-2011, fue de $6,620 millones de dólares (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2010). Muchas de las ornamentales son importadas de países extranjeros como Costa Rica, Taiwan, República Dominicana, Holanda, China, Ecuador, Israel, México, Colombia, India, Filipinas, Cánada y Nicaragua alcanzando una cifra de $3,754,143 y de los Estados Unidos para el año fiscal 2011 fue de $3,251,06, para un total de $7,005,204 (External Trade Statistics, 2011).

La exportación de algunas especies de ornamentales a los Estados Unidos y países extranjeros, exige que además de poseer características deseadas, las plantas estén libres de plagas y enfermedades. En la isla la producción está enfocada mayormente al mercado local como floristerías, jardinería paisajista, mercados orgánicos y tiendas por departamento; aunque también muchas son exportadas a los Estados Unidos, Islas Vírgenes y países extranjeros. La exportación total de las plantas ornamentales fue de $287,330 para el año fiscal 2011 (External Trade Statistics, 2011). Esta enfermedad ocasiona pérdidas de aproximadamente $1,400.00/ ha en los Estados Unidos (Gent *et al*., 2008). Lo que ha provocado en los últimos años pérdidas económicas en la industria (Bushnell, 2002). En muchas ocasiones productores locales incurren en realizar una eliminación del material propagativo enfermo o de plantas enfermas con el

propósito de no incurrir en gastos de fungicidas, lo que ocasiona pérdidas económicas (Comunicación personal, Caribbean Nursey, 2011).

En Puerto Rico las plantas ornamentales normalmente se cultivan al aire libre en viveros, con una protección ligera bajo plásticos o en invernaderos con ventilación artificial. Esta industria aporta al desarrollo económico de la isla y de las áreas de ornato en las ciudades. Las plantas ornamentales son afectadas por enfermedades, algunas de las cuales producen el deterioro de su colorido, estética y valor comercial. Igualmente las plantas aromáticas y/o medicinales se cultivan en viveros de plantas ornamentales, alrededor de la isla y son valoradas por su sabor y aroma.

En la isla muchos de los organismos patógenos que atacan a las plantas ornamentales y aromáticas han sido identificados, sin embargo los añublos polvorientos son conocidos simplemente por su estado asexual. Estos parásitos obligados o biótrofos del Filum Ascomicota, Orden Erysiphales, ocasionan grandes pérdidas económicas a la industria de las ornamentales. Estos se propagan vegetativamente y sus esporas tienen un periodo de vida muy corto (Bushnell, 2002). Los añublos polvorientos se observan con mayor incidencia cuando el clima es más fresco (23-25ºC) y en presencia de alta humedad relativa (60-100%) (Spencer, 1978). Las conidias son uninucleadas con vacuolas que contienen una gran cantidad de agua, posiblemente esto contribuye a que la conidia germine en ausencia de agua libre (Glawe, 2008). Los añublos polvorientos afectan a un amplio rango de plantas principalmente cuando hay poca circulación de aire y alta densidad de siembra. Se presentan generalmente en el haz de las hojas pero también se puede observar en el envés de las mismas, además de tallos, frutos jóvenes y retoños florales (Agrios, 1997).

El impacto económico que ocasionan los añublos polvorientos se ha reflejado en la necesidad de entender la interacción del patógeno en la resistencia o susceptibilidad de la planta (Bushnell, 2002). La revisión reciente de la taxonomía de los añublos polvorientos realizada por Bélanger, (2002) indica que las técnicas moleculares y la microscopía electrónica de rastreo han sido cruciales en la identificación de especies. Esta investigación pretende identificar los Erysiphales más frecuentes en plantas ornamentales y aromáticas en Puerto Rico.

En Puerto Rico se desconoce la identificación de las diferentes especies de añublos polvorientos que afectan a las plantas ornamentales y aromáticas. La importación de las plantas madres, esquejes (material propagativo) y el ingreso del turismo ha provocado un incremento de las enfermedades nuevas en la isla. Es de suma importancia identificar los agentes causantes de los añublos polvorientos a nivel de género y especie. En ésta investigación se utilizaron las herramientas mencionadas anteriormente para realizar una correcta identificación, para reportar especies patógenas que no están presentes y las que están ocasionando daños actualmente en la isla con el propósito de evitar la dispersión de géneros de importancia para la industria de ornamentales y aromáticas en la isla.

Objetivos

1. Caracterizar morfologicamente las especies de añublos polvorientos afectando plantas ornamentales y aromáticas.
2. Identificar los anamórfos de los añublos polvorientos afectando plantas ornamentales y aromáticas utilizando técnicas de microscopía de luz y electrónica de rastreo y análisis molecular.
3. Preparar un herbario de los especímenes colectados, a fin utilizarlos como referencia en investigaciones futuras.

2.0 REVISION DE LITERATURA

2.1 Clasificación Taxonómica

Los añublos polvorientos son parásitos obligados, lo que significa que son estrictamente dependientes de un organismo vivo. Los mismos infectan hojas, tallos, flores y frutos de más de 10,000 especies de angiospermas (Glawe, 2008). Taxonómicamente los añublos polvorientos están clasificados de la siguiente manera (Bélanger, 2002). Reino: Mycota, Subreino: Dikaria, Filum: Ascomycota, Clase: Leotiomicetes, Orden: Erysiphales y comprende de varios géneros: *Blumeria, Erysiphe, Leveillula, Microsphaera, Podosphaera, Spaerotheca,* y *Uncinula* entreo otros.

2.2 Síntomas y Signos

Los añublos polvorientos son usualmente identificados por criterios morfológicos del agente causal (signos), raramente son diagnosticado por respuesta del hospedero (síntomas) (Spencer, 1978). Se puede reconocer fácilmente por su apariencia polvorienta o micelio blanco a grisáceo sobre la superficie de hoja. En las plantas afectadas se observa clorosis, hojas arrugadas y distorsionadas, aborto de flores y frutos, y se presenta senescencia prematura de la planta (Jones y Benson, 2001). En muchas de las ornamentales y aromáticas el tejido suculento joven es el más susceptible a la infección (Jones y Benson, 2001). En hospederos que son incompatibles o resistentes el patógeno causa necrosis o una reacción hipersensitiva en el punto de penetración, ésta necrosis se extiende hacia células no invadidas del punto de infección (i.e. necrosis en uvas causada por *Uncinula necator* (Spencer, 1978).

2.3 Reproducción asexual

La infección es iniciada cuando la ascospora o las conidias caen sobre una planta susceptible, éstas germinan, forman el tubo germinativo que se alarga y forma la hifa con el apresorio, hifa de penetración y el haustorio (Glawe, 2008). Después de la infección la hifa se alarga y ramifica formando colonias circulares. Las hifas jóvenes son transparentes y en su proceso de maduración se tornan de color grisáceo, rojizo y hasta marrón (Braun, 2002). Las hifas de la mayoría de los añublos polvorientos crecen sobre la superficie de la hoja hospedera como epífitas aunque algunas especies crecen dentro (endófitas) del tejido vegetal como las de la tribu Phyllactinieae. Algunas especies se pueden diferenciar por las hifas secundarias que pueden ser filiformes a falcadas como en *Cystotheca*, bifurcadas en *Queirozia*, falcadas en *Blumeria* y simples en *Caespitotheca* (Braun, 2002). La producción de las conidias comienza varios días después de la infección en el hospedero (Glawe, 2008).

Las conidias de los añublos polvorientos son unicelulares, hialinas, uninucleadas y vacuoladas conteniendo una gran cantidad de agua lo que contribuye a que la conidia pueda germinar en ausencia o en cantidades limitadas de agua (Yarwood, 1952). Las conidias se pueden producir en cadenas tipo euoidium (i.e. *Oidium*) o simples tipo pseudoidium (i.e. *Oidiopsis*, *Ovulariposis* y *Stretopodium*) (Belanger, 2002). Las conidias tienen formas variadas desde ovoides, cilíndricas a elipsoidales (Glawe, 2008) y en algunas especies las conidias son dimórficas (i.e. *Leveillula*, *Pleochaeta* y *Phyllactinia*). En especies como *Sawadaea* son sinanamorfas, o sea producen macroconidias y microconidias las cuales difieren dramáticamente en su tamaño (Belanger, 2002). En la tribu Cystotheceae (i.e. *Cystotheca*, *Podosphaera* y *Sawadaea*) las conidias contienen cuerpos de fibrosina (Belanger, 2002).

La ornamentación de la superficie de las conidias puede variar. Estas características y rasgos se pueden observar utilizando el microscopio electrónico de rastreo. La apariencia de la superficie de las conidias varía de acuerdo al clima si está fresco o seco (Belanger, 2002).

Cuadro 1. Características de los patrones superficiales de las conidias de los añublos polvorientos utilizando microscopía electrónica de rastreo descritas por Braun *et al*., (2002).

Añublo Polvoriento Taxonomía	**Características de los extremos de la conidia**	**Pared externa de la conidia: Turgida**	**Pared externa de la conidia: Arrugada**
Tribu Blumerieae *Oídium*-subge. *Oidium(Blumeria)*	Anular	Equinulada	Minuciosamente polygonal
Tribu Phyllactinieae			
Oidiopsis (Leveillula)	Suave o verrugoso	Verrugoso, verrugas simples	Angular
Ovulariopsis (Phyllactinia)	Suave o verrugoso en la pared basal	Verrugoso, verrugas en grupos; más densos hacia la hélice.	Angular
Streptopodium (Pleochaeta)	Suave	Verrugoso, verrugas simples en la hélice, más densas hacia la parte externa.	Angular

Tribu Cystotheceae O. subgen. Setoidium (*Cystotheca)* and *Fibroidium (Podosphaera, Sphaerotheca)* *O.* subgen. *Octagoidium (Sawadaea)*	 Verticiladas/Rizada Verticiladas/Rizada	 Suave Dendríco	 Al azar o transversal Serpentina
Tribu Golovinomyceteae *O.*subgen. *Gracilooidium (Arthocladiella)* *O*. subgen *Reticuloidium (Golovinomyces)* *O.* subgen *Striatoidium (Neoerysiphe)*	 Fibrilar Fibrilar Fibrilar	 Suave Gruesa Estriado	 Débilmente dendrítico Poligonal/reticulado Linear
Tribu Erysipheae *O*. subgen *Pseudoidium* (*Erysiphe,* *Microsphaera Uncinula)* *Erysiphe australiana*	 Fibrilar Fibrilar	 Rugoso Estriado	 Angular/ rectangular Pliegues

Las conidias de los añublos polvorientos se desarrollan de forma individual o en cadenas cortas de hasta cuatro conidias y en cadenas de hasta seis a siete conidias, germinan fácilmente en comparación con otros hongos y no requieren grandes cantidades de agua para la germinación. Para la identificación de estados anamorfos de *Oidium* spp. se utilizan los patrones de germinación de las conidias; ya sea terminal, sub-terminal o lateral, producción de apresorio y el tiempo que requiere para la producción de los tubos germinativos (Cook, 2009). El tubo germinativo puede ser corto a moderadamente largo, terminando con un apresorio lobulado y la posición de la germinación puede ser lateral o terminal como es el caso de *Pseudoidium* (tipo polygoni) que requiere de un periodo de cinco horas de desarrollo. Para el tipo *Reticuloidium*

(tipo cichoracearum) el tubo germinativo puede ser corto o largo, aunque es mayormente largo terminando con un apresorio apezonado, su germinación es mayormente terminal. Sólo en algunas ocasiones se produce de forma lateral y su desarrollo es lento de ocho a diez horas. Para el tipo *Fibroidium* (tipo pannosa) el tubo germinativo es moderadamente largo a muy largo, con apresorio inconspicuo, germinación lateral raramente terminal. La conidia usualmente contiene cuerpos de fibrosina y su desarrollo es lento más de diez horas. En el tipo *Magnicellulatae* (tipo Fuliginea) el tubo germinativo siempre es corto, típicamente ramificado para ambos lados pero con apresorio simple. Su germinación es lateral, siempre con cuerpos de fibrosina y su desarrollo es lento, más de diez horas (Cook, 2009). Braun en el 1987 incluyó otro tipo de germinación que es un intermediario entre *Fibroidium/Magnicellulatae* el cual posee un tubo germinativo siempre corto y ancho, no ramificado, la germinación es lateral y las conidias siempre presentan cuerpos de fibrosina (Cook, 2009).

2.4 Micelio, apresorio y haustorio

El micelio primario de los añublos polvorientos es dicariótico, hialino, septado y posee una pared delgada. Existen tres clases de micelio tales como epífito, hemiendófito y endófito. En el epífito se encuentran la mayoría de los géneros excepto *Phyllactinia, Pleochaeta, Leveilulla* y algunas especies de *Cystotheca.* El hemiendófito produce hifas desarrolladas superficialmente las cuales penetran las hojas por las estomas y entonces forma el micelio interno. *Phyllactinia, Pleochaeta* y rara vez *Cystotheca* poseen este tipo de micelio. En *Leveillula* se observa micelio endófito, creciendo en el interior del tejido vegetal (Braun, 2002).

El apresorio es un crecimiento lateral de la hifa y su función estructural es adherir el micelio a la superficie del hospedero y luego iniciar la producción del haustorio. Esta estructura

se observó por primera vez en *Uncinula necator* (Braun, 1987). El apresorio también está al final del tubo germinativo en las conidias (Braun, 2002). Se conocen cinco tipos de apresorios: de forma apezonada, elongada o en forma de gancho, multilobulado, moderadamente lobulado e indistinto (Boesewinkel 1977). Boesewinkel (1980) introdujo otro tipo de apresorio llamado "multi-lobulado ramificado" que es característico en especies de *Leveillula* (Braun, 2002). Este término fue cambiado a "ramificado tipo coral" (Gorter 1988; Braun 1995; Braun, 2002).

- *Apresorio indistinto* – Se puede observar cuando la hifa se ensancha (Boeswinkel 1977). Es encontrado mayormente en varias especies de *Podosphaera* y *Sphaerotheca* como por ejemplo: *P. epilobii, P. fugax* y *P. fusca* (Braun, 1987).
- *Apresorio distinto de forma apezonada* – Este tipo está ampliamente distribuido en la familia Erysiphaceae; ejemplo: *Arthrocladiella, Golovinomyces* y algunas especies de *Podosphaera* y *Sphaerotheca.*
- *Apresorio distinto, lobulado* – El apresorio es lobulado, su forma es un poco variable, va desde ligeramente lobulado a multilobulado, característico de *Microsphaera*, *Uncinula* y *Neoerysiphe.*
- *Apresorio distinto, ramificado en forma de coral* – Es muy típico en especies de *Leveillula*, fue introducido por Gorter (1988).

El haustorio es un órgano de alimentación descubierto por Bary y Woronin en el 1870 (Braun, 1987). El haustorio comienza su proceso de formación luego del apresorio. Se origina por debajo del apresorio una hifa de penetración muy fina de aproximadamente 1 a 2 µm de ancho, la misma penetra las células epidermales por degradación enzimática de la cutícula y por penetración mecánica (Blumer 1967; Edwards y Allen 1970; Ellingboe 1972; Webster 1980 y 1983). En especies con micelio endófito como *Leveillula* el haustorio surge de la hifa interna y se

forma en capas más internas del tejido vegetal como lo es el mesófilo. En muchas especies de la familia Phyllactinieae el haustorio es una estructura globosa o en forma de pera y mide aproximadamente de 6 a 32 µm de diámetro (Blumer 1967; Boesewinkel 1980; Braun, 2002). El haustorio multi-lobulado es característico de *Blumeria graminis* (Braun, 1987).

2.5 Reproducción sexual

Braun en el 2002 propone el término chasmotecio para distinguir el ascocaropo de los añublos polvorientos de otros ascomicetos. El chasmotecio es de color claro en sus primeras etapas, adquiriendo un color amarillento y al final marrón oscuro a negro en su madurez (Glawe, 2008). Anteriormente se utilizaba el termino cleistotecio ya que el ascocarpo no posee ostiolo. Durante la descarga de las ascosporas el chasmotecio desarrolla una hendidura vertical para liberarlas. El rompimiento surge por un aumento en la presión de turgor que se desarrolla cuando el agua es absorbida por el chasmotecio (Glawe, 2008). En *Phyllactinia guttata* el peridio, el cual consiste de una masa de células melanizadas, se abre de forma horizontal para liberar las ascas. Las medidas del chasmotecio sin los apéndices están en un rango de 50 µm a 400 µm; siendo mayoría de 100 a 200 µm de diámetro (Glawe, 2008). En estudios realizados con *Blumeria graminis* se concluyó que si los nutrientes suministrados por la planta son bajos durante las primeras etapas de desarrollo del chasmotecio, la estructura puede seguir desarrollándose ya que el micelio posee reservas suficientes. Cuando el ascocarpo está maduro se encuentra contenido y delimitado por el peridio (Braun, 2002).

En los Erysiphales ocurren especies homotálicas y heterotálicas (Braun, 2002). La reproducción sexual de los añublos polvorientos es iniciada por la producción de los gametangios. El gametangio masculino es conocido como anteridio y el femenino como

ascogonio. Durante la plasmogamia o sea la fusión del citoplasma de dos células gametangiales, el núcleo se mueve del anteridio al ascogonio. A este proceso se conoce como dicariotización, porque resulta en células binucleadas o dicarióticas. Tras la dicariotización, las hifas monocariotas producidas por las células de la base del ascogonio se desarrollan formando el peridio protegiendo la masa de ascosporas. El desarrollo del asca proviene de células dicarióticas. La cariogamia y la meiosis ocurren en etapas tempranas del desarrollo de las ascas. El número de ascosporas por ascas difiere de acuerdo a la especie, pero se encuentran en un rango de dos a ocho.

La estructura peridial del chasmotecio varía a través de los grupos taxonómicos (Braun, 2002). En muchas especies el peridio consiste de varias capas de células. Las células internas del peridio son delgadas e hialinas, pero las áreas externas son melanizadas además de poseer una pared más gruesa (Glawe, 2008). Los apéndices son formados en la capa externa de células. En *Cystotheca* el peridio consiste en dos capas que son separadas fácilmente. En *Brasiliomyces* el peridio es más reducido y casi transparente. La superficie topográfica externa de cada peridio varía de acuerdo a la especie (Braun, 2002).

Las ascas generalmente son consideradas unitunicadas, aunque existe controversia entre otros autores que las consideran bitunicadas (Glawe, 2002). Las paredes de las ascas varían desde delgadas a gruesas dependiendo de la especie. La descarga de las ascosporas es a través de una pared fina. La forma de las ascosporas varía según la especie, estas pueden ser simples en forma de globo a ovoide y raramente curvas. Muchas ascosporas son hialinas, aunque existen especies con ascosporas de coloración amarilla y vacuoladas (Braun, 2002).

2.6 Ciclo de vida

La ruptura del chasmotecio libera las ascosporas que actúan como el inóculo primario, siendo las conidias el inóculo secundario. Las conidias son producidas en cadenas o simples, y el micelio de la mayoría de los añublos polvorientos se encuentra sobre la superficie del hospedero, absorbiendo nutrientes por medio del haustorio dentro de las células epidermales en las hojas u otro tejido susceptible (Schumann, 2010). El estado asexual se puede observar a simple vista sobre el hospedero y es la forma más fácil de dispersión. En el chasmotecio o cuerpo fructífero se encuentran las ascas y ascosporas que corresponden al estado sexual, además es utilizado como estructura de sobrevivencia (Schumann, 2010). Las células y conidias de los añublos polvorientos son similares a las de los otros ascomicetes. Poseen pared celular, núcleo, vacuola, algunos presentan cuerpos de fibrosina que son estructuras de naturaleza aún desconocida que se encuentran en el citoplasma de las conidias de algunos Erysiphales (Ulloa, 2006). Los añublos polvorientos son pleomórficos, formando múltiples distinciones morfológicas en sus esporas. Su ciclo de vida envuelve ambos estados sexuales, el estado sexual (teleomorfo) incluye a géneros como *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Sphaeroteca* y *Uncinula*. El estado asexual (anamorfo) incluye miembros del género *Acrosporium*, *Oidiopsis*, *Oidium* y *Ovulariopsis*. En las especies *Brasiliomyces*, *Typhulochaeta* y *Parauncinula* el estado anamorfo es aún desconocido o sea sólo se conoce sobre su reproducción sexual, la producción del chasmotecio o ascocarpo (Belanger, 2002). En el subgénero *Microidium* dentro de la especie *Oidium* el estado telomorfo aún no se ha reportado. En lugares de climas cálidos y tropicales los estados teleomorfos de algunas especies no son conocidos, como por ejemplo, en *Erysiphe berberidis* (Glawe, 2008).

2.7 Géneros de importancia económica

A continuación se describen los géneros de importancia económica que afectan las ornamentales y aromáticas (Braun, 1987).

- *Podosphaera* spp. – Produce micelio ectofítico, los estados anamórficos pertenecen a los géneros *Oidium*. Presenta conidias en cadenas, apresorio indistinto o en forma apezonada, cuerpos de fibrosina, el chasmotecio pigmentado y contiene una sola asca por ascocarpo.
- *Erysiphe* spp. – Produce micelio ectofítico, con apresorios simples a lobulados, en algunos casos ligeramente multilobulados y el haustorio está presente en las células epidermales. La hifa mide 2 a 12µm de ancho, es ramificada y septada. Los estados anamórficos pertenecen al género *Oidium*, los conidióforos erectos surgen del micelio externo, las conidias pueden producirse en cadenas o de forma simple. La forma y tamaño de la conida es variable sin cuerpos de fibrosina. El chasmotecio es oscuro y globoso con apéndices simples o ramificados irregularmente (Braun, 1987).
- *Sphaerotheca* spp. – Produce micelio ectofítico, sus estados anamorfos pertenecen al género *Oidium*. Las conidias se presentan en cadenas con cuerpos de fibrosina. El chasmotecio es globoso, el peridio es de color oscuro, su tamaño es variable, puede medir de 50 a 130 µm en diámetro. El chasmotecio posee pocos apéndices y en algunos casos no los posee. Las ascosporas son hialinas o amarillas, de tamaño y forma variables (Glawe, 2008).

2.8 Condiciones ambientales

La mayoría de los añublos polvorientos producen esporas que son llevadas por el aire e infectan plantas en condiciones ambientales óptimas. La temperatura diurna óptima para la infección típicamente es de 26℃ con una humedad relativa de 40 a 70%, en las noches la temperatura óptima es de 15℃ con una humedad relativa de 95 a 99%. No requieren de agua sobre la superficie de la planta para germinar e infectar como la mayoría de los hongos. Los añublos polvorientos prefieren climas secos y temperaturas frescas. Esto ocurre porque sus esporas están libres, germinan y causan la infección cuando la humedad relativa del aire es bastante alta y no hay agua sobre la superficie de la hoja. Al comenzar la infección el micelio continua propagándose sobre la planta sin importar las condiciones de humedad (Martínez, 2002).

2.9 Periodo de latencia

El periodo de latencia es el proceso de transición de un periodo activo a uno de actividad restringida (Glawe, 2008). Como los añublos polvorientos son parásitos obligados, éstos deben ser capaces de sobrevivir en las diferentes estaciones del año aun cuando el tejido susceptible no está infectado (Glawe, 2008). El chasmotecio sirve como estructura de resistencia en regiones de temperaturas frías, ya que es donde se ha reportado el estado sexual. El hongo también puede sobrevivir en forma de micelio cuando se encuentra dentro de las yemas latentes de la planta. Las yemas infectadas pueden poseer hifas con haustorios, conidióforos y conidias. Después de romper la dormancia las yemas infectadas son cubiertas con la esporulación del micelio, que es el principal suministro de inóculo para iniciar el ciclo de la enfermedad. Estudios indican que

brotes infectados tienen menos probabilidad de sobrevivir a bajas temperaturas resultando así en una reducción del inóculo durante el periodo de alta infestación (Glawe, 2008).

2.10 Rango de hospederos

Los añublos polvorientos son muy comúnes en muchas de las plantas ornamentales como zinnias, begonias, crisantemos, pascua, hortensia y muchas otras (Martínez, 2002). El primer reporte de añublo polvoriento en la pascua (*Euphorbia pulcherrima*) fue en México y Puerto Rico a finales del 1980, en los Estados Unidos en el estado de Pennsylvania y en el noreste del Pacífico en el 1990 (Benson, 2002). El patógeno es un *Oidium* spp. y no se reportó su estado sexual (Benson, *et al*., 2001). En el 1950 en África y Kenya se reportó *Leveillula clavata* en la pascua (Daughtrey, *et al*., 1995). En la margarita africana (*Gerbera jamesonii*) se han reportado diferentes géneros entre estos: *Golovinomyces cichoracearum* y *Shaerotheca fusca* en Italia y *G. cichoracearum* en América del Norte, Argentina y Suiza (Troisi, *et al*., 2010). En hortensia (*Hydrangea macrophylla*) se han reportado *Erisyphe polygoni, Erisyphe lagerstroemiae, Microsphaera friessi, M. penicillata, M. polonica, Oidium hortensiae* y *Oidium* spp. (Daughtrey, *et al*., 1995). La petunia (*Petunia hybrida*) es hospedera de *Oidium longipes* en Holanda, Alemania, Suiza y Argentina (Kiss, *et al*., 2008). En el maní forrajero o maní ornamental (*Arachis hypogaea*) está reportado *Oidium arachidis* (Porter, 1993). En la rosa (*Rosa* spp.) Wallroth en el 1819 describió por primera vez el hongo causante de la enfermedad como *Alphitomorpha pannosa*, luego pasó a ser *Erysiphe pannosa* en el 1829 y finalmente fue descrito como *Sphaerotheca* en 1851 (Horst, 1995). En el 1914 Woronichine reconoce dos variedades dentro del género *Sphaerotheca*, una de ellas afecta al cultivo de la rosa cuya variedad *rosae* y la segunda es la variedad *persicae* afectando al melocotón y la almendra (Horst, 1995). Actualmente es reportanda en diversos países como *Podosphaera* (Braun y Takamatsu, 2000).

En la acalifa (*Acalypha wilkesiana*) fue reportado *G. cichoracerum* en Brasil (Mafia *et al*., 2005). En *Kalanchoe blossfeldiana* fue reportado *Podosphaera fuliginea* al noreste del Pacífico por Glawe, 2003.

Dentro de las plantas aromáticas y/o medicinales susceptibles, en el romero (*Rosmarinus officinalis*), se ha reportado *Leveillula* spp. en Europa y *Podosphaera fuliginea* en los Estados Unidos. Además se ha reportado a *Neoerysiphe galeopsidis* en Europa, Nueva Zelandia, África del Sur y recientemente en Japón. El último reporte fue *Golovinomyces biocellatus* en Asia (Park, *et al*., 2009). En la salvia (*Salvia scabra*) se ha reportado *Oidium* dentro del subgénero *Pseudoidium*, al norte de Italia, previamente habían sido reportados *Erysiphe polygoni* y *E. cichoracearum*; ambas especies de *Oidium* dentro del subgénero *Reticuloidium* (Garibaldi, 2004). En campos comerciales de California se reportó en la menta (*Mentha piperita*) a *Golovinomyces biocellatus* y en la yerba buena (*Mentha spicata*) a *Erysiphe orontii* (Marcum, 2010; Koike, 1999). El eneldo (*Anethum graveolens*) es muy susceptible a la enfermedad, durante muestreos anuales en Egipto se observó el mismo afectando las hojas, inflorescencias y frutos, reportándose a *Erysiphe heraclei* (Zeidan, 2010).

2.11 Sistemática

En la actualidad los sistemas taxonómicos utilizados para la identificación de los añublos polvorientos en adición a la información morfológica, se realizan inferencias de sus relaciones filogenéticas basándose en evidencias provistas mediante análisis molecular. Los reportes comenzaron para el 1990 utilizando las regiones ITS y 18s rDNA para inferir sobre las relaciones filogenéticas de los Erysiphales y de otros ascomicetos. El análisis de las secuencias 18s rDNA, ITS1-5.8S-ITS2 y 28S rDNA organizaron a los Erysiphales en la clase

Leotiomycetes junto con los ordenes Cyttariales, Heliotales y Rhytismatales (Hibbett *et al*., 2007; Glawe, 2008).

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio observacional sobre la incidencia de añublos polvorientos en plantas aromáticas

3.1.1 Predio experimental

El predio experimental se estableció en la Subestación Experimental Agrícola de Juana Díaz de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. La Subestación Experimental Agrícola de Juana Díaz se encuentra ubicada en la zona sur de Puerto Rico en la Carr. # 510 km. 3.2, en el Barrio Sabana Llana, en la latitud N 18° 01.468’ y longitud W 066° 31.630’, a una elevación de 76 metros sobre el nivel del mar (m.s.m.m). Los suelos pertenecen al orden Mollisol, serie San Antón y su textura es franco-arcilloso. Son de alta fertilidad y ligeramente ácidos.

Cuadro 2. Nombres científicos y comunes de especies de plantas aromáticas sembradas en Juana Díaz para Enero 2010, Diciembre 2010 y Enero 2012.

Nombre científico	**Nombre común**
1. *Anethum graveolens*	Eneldo, Variedad: Bouquet
2. *Petroselinum crispum*	Perejil
3. *Brassica oleracea* L.	Brócoli, Variedad: Packman
4. *Thymus vulgaris*	Tomillo
5. *Menta piperita*	Menta
6. *Salvia officinalis*	Salvia
7. *Tagetes patula*	French Marigolds Variedad: Tangerine
8. *Coriandrum sativum*	Cilantro
9. *Allium schoenoprasum*	Cebollín
10. *Daucus carota*	Zanahoria
11. *Ocimum basilicum*	Albahaca
12. *Matricaria chamonilla*	Manzanilla
13. *Rosmarinus officinalis*	Romero
14. *Melissa officinalis*	Toronjil
15. *Eryngium foetidium*	Recao
16. *Pelargonium crispum*	Geranio de olor
17. *Helianthus annuus*	Girasol

3.2 Monitoreo del predio experimental

Las plántulas de eneldo, perejil, brócoli, tomillo, menta, salvia, cilantrillo, cebollín, margarita, zanahoria, albahaca, manzanilla, romero, toronjil, recao y geranio de olor fueron trasplantadas en hileras de 20” x 3”. Se realizaron monitoreos semanales con la finalidad de observar síntomas de añublo polvoriento en hojas nuevas y senescentes, tallos y flores. Las plantas con síntomas y signos de añublo polvoriento se colocaron en bolsas plásticas y se transportaron a la Clínica de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz. Se realizaron cortes de tejido, laminillas semi-permanentes y cámaras húmedas para confirmar la presencia del hongo. Se documentó fotográficamente los añublos polvorientos encontrados.

3.3 Muestreo de malezas asociadas al cultivo

Durante septiembre del 2009 hasta julio del 2011, se realizaron muestreos en viveros de plantas ornamentales en ocho municipios de la isla (Cuadro 3). Se incluyeron en la recolección las malezas que presentaban síntomas y signos de añublos polvorientos. Una vez identificado el lugar, se estableció la localización a través del sistema de posicionamiento satelital, utilizando un GPSmap 60CSx (Garmin, USA). Luego mediante el programa Google maps, se transformaron los puntos a un formato gráfico (Figura 1).

3.4 Muestreo en viveros

3.4.1 Recolección de añublos polvorientos

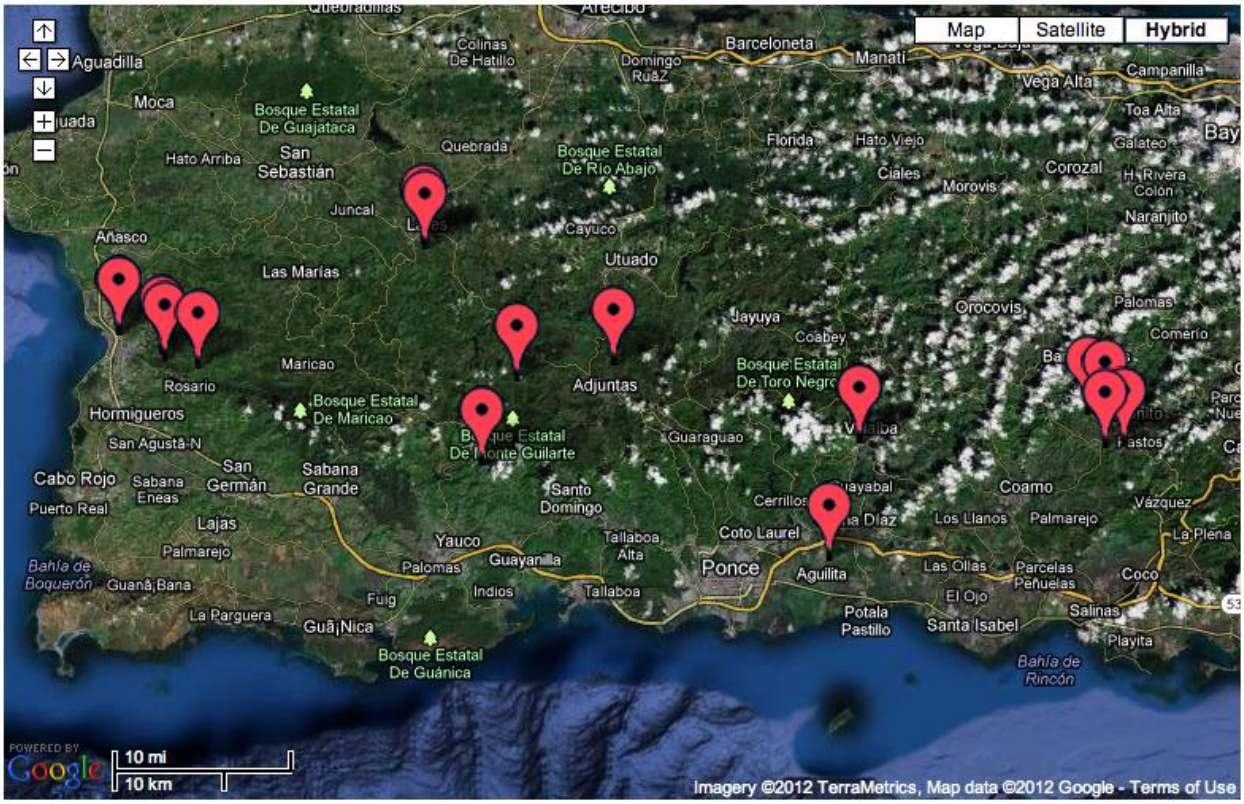
La recolección de las muestras de los añublos polvorientos se realizó en fincas comerciales, viveros de plantas ornamentales, aromáticas o medicinales de Puerto Rico. Los muestreos se realizaron en los municipios del centro de la isla como Aibonito, Adjuntas, Lares, Barranquitas y Utuado, además de otros pueblos de la zona central (Cuadro 5). Las muestras se

recolectaron durante junio del 2010 hasta febrero del 2012. Se describieron los síntomas y se documentó mediante fotografía la planta infectada. Se recolectó tejido infectado y se colocó en bolsas plásticas trasparentes debidamente selladas e identificadas. Las muestras se colocaron en una nevera portátil, luego las mismas fueron procesadas en el laboratorio de la Clínica de Diagnóstico en la Subestación Experimental Agrícola de Fortuna en Juana Díaz, Puerto Rico.

Cuadro 3. Localización geográfica de los lugares donde se realizó la recolección de muestras de añublos polvorientos en plantas ornamentales y aromáticas.

Lugar de Muestreo	**Fecha**	**Latitud**	**Longitud**	**Elevación (m.s.n.m)**
Adjuntas	27-Oct.-2010	N 18° 10.416’	W 066° 47.929’	1,916 ft
	29-Feb.-2011			
	23-Jun.-2011			
Aibonito	6-Feb.-2010	N 18° 08.623’	W 066° 17.324’	1,631ft
	17-Nov.-2010	N 18° 07.145’	W 066° 17.351’	2,042ft
	16-Feb.-2011	N 18° 08.736’	W 066° 18.235’	2,054ft
	16-Feb.-2011	N 18° 07.165’	W 066° 16.322’	2,058ft
	3-Jun.-2010	N 18° 11.170’	W 066° 42.839’	1, 841ft
	13-Abr.-2011			
Barranquitas	14-May.-2011	N 18º 06.234’	W 066º 49.675’	1, 483ft
Juana Díaz	26-Abr.-2011	N 18° 17.864’	W 066° 09.987’	76ft
	15-Jun.-2011			
Lares	23-Ene.-2011	N 18° 16.891’	W 066° 52.649’	1,367ft
	23-Ene.-2011	N 18° 17.190’	W 066° 52.759’	1,258ft
	11-Abr.-2011			
	25-Abr.-2011			
Maricao	6-Abr.-2010	N 18° 12.721’	W 066° 10.041’	1,183ft
Mayagüez	3-Ene.-2011	N 18° 12.657’	W 066° 08.504’	
	1-Jun.-2011			
	31-Ene.-2011	N 18° 12.651’	W 067° 08.614’	58ft
	1-Feb.-2011	N 18° 12.636’	W 067° 08.596’	95ft
		N 18° 11.45’	W 067° 06.21’	102ft
Villalba	28-Nov.-2010	N 18° 16.401	W 066° 50.507’	1, 042ft

Figura 1. Mapa de Puerto Rico con los pueblos muestreados durante junio de 2010 hasta enero de 2012.



3.4.2 Procesamiento de muestras

De las muestras colectadas se seleccionaron tres secciones de tejido foliar con presencia de micelio, el tejido fue cortado con un bisturí en secciones de aproximadamente 1 a 3 mm. Estas secciones se utilizaron para la preparación de laminillas semipermanentes. Se realizaron pruebas de germinación de conidias y extracción de DNA genómico utilizando el kit de REDExtract-N-Amp™ (Sigma, St. Louis, USA) y DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, California, USA).

3.4.3 Laminillas semipermanentes

Se tomó una sección de tejido foliar infectado y se raspó con un bisturí estéril. Luego se colocó la porción de esporas y micelio en la laminilla preparada previamente con una o dos gotas de lactofenol y azul de algodón (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) para observar estructuras presentes en el tejido (Kiss, 2001). Las observaciones se realizaron en un microscopio de luz (Olympus Modelo CX31, Melville, N.Y.) y se utilizaron claves taxonómicas para su clasificación (Cook *et al*., 2009; Braun *et al*., 2002).

3.4.4 Germinación de conidias

Se prepararon cámaras húmedas que consistieron de placas petri de cristal donde se colocó una columna de vidrio y una laminilla sobre un papel de filtro humedecido con agua estéril. La laminilla se preparó con agua destilada estéril para observar la germinación de la conidia, tubo germinativo y producción de apresorio al final del tubo germinativo. Las cámaras húmedas se colocaron a luz indirecta a temperatura ambiente. Luego de un periodo de 5 a 24 horas se observaron los tubos germinativos de las conidias y se tomaron datos sobre su morfología. Además se observó el desarrollo del tubo germinativo terminal o lateral, la presencia de cuerpos de fibrosina, los diferentes tipos de apresorio y conidióforos. También se registró la forma y tamaño de las conidias ya que son muy importantes en la clasificación de los anamórfos (Cook, 1997).

3.4.5 Microscopía Electrónica De Rastreo (Scanning Electron Microscopy: SEM)

Se recolectaron hojas, pétalos, tallos con la presencia de añublo polvoriento de las diferentes plantas ornamentales, aromáticas y malezas asociadas al cultivo. Se cortaron secciones de tejido de 7 a 8 mm y se colocaron en una solución de gluteraldehído al 3 % en amortiguador

de fosfato 0.1M (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) en un pH de 7.2, durante 24 horas. Luego de las 24 horas se realizaron dos lavados de 15 minutos cada uno, en amortiguador de fosfato a 0.1M a un pH de 7.2. Posteriormente se deshidrataron las muestras en diferentes concentraciones de alcohol etílico desde 10 % hasta 99.9 %, incrementando 10% cada vez, durante 15 minutos para cada concentración. Luego se realizaron tres lavados con alcohol etílico durante 15 minutos. Al finalizar la deshidratación se realizó el secado crítico (critical point drying) durante dos horas, utilizando un equipo EMS 850 (Electron Microscopy Sciences, Washintong, PA). Posteriormente las muestras se colocaron en placas metálicas de aluminio con cubierta de carbón de un tamaño de 10 mm de diámetro, luego la muestra se cubrió con una película de oro durante 10 minutos, utilizando un equipo EMS 550X (Electron Microscopy Sciences, Washingtong, PA). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico de rastreo (Modelo JSM-5410 LV Jeol Ltd., Tokio, Japón) en las facilidades del Centro de Microscopía del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

3.5 Identificación molecular de los añublos polvorientos

Las muestras colectadas y debidamente identificadas fueron procesadas en la Clínica de Diagnostico de la EEA de Juana Díaz.

3.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de los añublos polvorientos se utilizó el kit Plant REDExtract-N-Amp (Sigma, St. Louis, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN, se realizaron diluciones a concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 utilizando agua molecular (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) y luego se colocó a -

20°C. Además se utilizó el DNeasy Plant Mini kit (Quiagen, California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción se raspó aproximadamente 0.003 a 0.004 g de micelio desarrollando sobre el tejido vegetal y se colocó en un tubo de colección (Eppendorf) de 1.5ml de capacidad. Se colocaron tres esferas de cristal de 3 mm de diámetro por cada tubo (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) y se realizó la extracción del ADN utilizando el DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN que fue extraído se mantuvo a -20°C.

3.5.2 Análisis del ADN

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región ITS1 – 5.8S rADN – ITS4, utilizando los primers ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), e ITS4 (5' TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG-3') descritos por White et al., 1990. El volumen total de la reacción de PCR fue de 25 µl, conteniendo: 12.5 µl Green Taq PCR Master Mix (Promega) (2x), 2.5 µl de cada primer 0.2µM, 2.5 µl de agua ultra pura (Sigma), 5 µl de ADN (5-8 ng/µl). Para la amplificación del ADN se utilizó un termociclador (Modelo T 3000, Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). Los ciclos y tiempos de la amplificación que se utilizaron para los primers ITS1 e ITS4 consistieron de una desnaturalización a 94℃ durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94℃ por 30 segundos (desnaturalización), 55℃ por 30 segundos (hibridación), 72℃ por 1 minuto (extensión) y seguido de un ciclo final de extensión a 72℃ por 10 minutos (Kiss, 2001).

En adición, se realizó la reacción en cadena de polimerasa anidada ("nested PCR") con los primers PMITS1 (5'- TCG GAC TGG CCY AGG GAG A-3') y PMITS2 (5'- TCA CTC GCC GTT ACT GAG GT-3'). Los ciclos y tiempos de la amplificación que se utilizaron para los

primers PMITS1 y PMITS2 consistieron de una desnaturalización a 95℃ durante 2 minutos, 30 ciclos de 30 segundos a 95℃ (hibridación), 30 segundos a 52℃ ó 55℃ (extensión) y seguido de un ciclo final de extensión a 72℃ por 7 minutos (Takamatsu, 2003).

Los productos de la amplificación del PCR fueron visualizados en un gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 1.2%, teñido con bromuro de etidio (10mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). Luego se realizó una electroforesis a 100 V y 400 Amp. durante 40 minutos, utilizando el buffer Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la visualización de la gel se utilizó un visualizador de rayos ultravioletas y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El producto de PCR fue purificado utilizando el kit comercial de QIAGEN (QIAquick® PCR Purification) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para algunas muestras en las que se observaron dos bandas se realizó la purificación directamente de la gel de agarosa con el "Gel Extraction Kit" de QIAquick® siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se realizó en las facilidades de secuenciación y genotipificación, Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras y MACROGEN Advancing throught Genomics; Rockville, Maryland, USA. Por medio del programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GeneBank de Centro para la Información Biotecnológica (NCBI o National Center for Biotechnology Information). Las secuencias fueron editadas y alineadas con el programa Sequencher® 4.9 (Gene Codes Corporation, Minnesota, USA). Luego que las secuencias fueron editadas y alineadas se depositaron en el GenBank y se obtuvo un número de acceso. Se realizó un alineamineto multiple con las secuencias de los aisalados y de las especies relacionadas, utilizando el programa BioEdit, a través del parámetro ClustalX2. La contrucción

del árbol filogenético se efectuó mediante el programa MEGA, versión 5.05. Se utilizaron los métodos de Neighbor-Joining utilizando la prueba bootstrap con 1000 repeticiones.

Cuadro 4. Especies de añublos polvorientos y números de acceso tomadas del Centro Nacional para Informanción Biotecnológica (GeneBank) utilizadas para realizar los análisis filogenéticos.

Especies	**Número de Acceso GeneBank**
Erysiphe australiana	AB257435.1
Erysiphe alphitoides	AB103078.1
Erysiphe trifolii	AB103366.1
Erysiphe heraclei	AB292694.1
Erysiphe quercicola	AB237820.1
Erysiphe cruciferarum	AF011306.1
Erysiphe pisi	GU117107.1
Erysiphe peruviana	DQ164439.1
Erysiphe betae	FJ378870.1
Erysiphe pisi	AB022408.1
Golovinomyces cichoracearum	AB430817.1
Golovinomyces orontii	AB022408.1
Oidium citri	AB102944.1
Podosphaera pannosa	DQ139428.1
Podosphaera pannosa	DQ139413.1
Podosphaera fusca	AB462763.1
Podosphaera pannosa	DQ139416.1
Podosphaera fusca	AB462776.1
Podosphaera fusca	AB525914.1
Podosphaera balsaminae	AB462800.1
Podosphaera clandestina	AB026150.1
Sawadaea tulasnei	AB022366.1
Sawadaea polyfida	AB022364.1

Takamatsu *et al*., 2010.

4.0 Resultados

4.1 Sintomatología y caracterización morfológica de añublos polvorientos en plantas ornamentales.

4.1.1 ***Lagerstroemia indica*** es una ornamental prevalente en áreas de ornato en la mayoría de los municipios de Puerto Rico, durante los catastros realizados desde junio del 2011 a diciembre 2011. La presencia de añublo polvoriento fue severa. En el área foliar y en las inflorescencias se encontró abundante micelio blanco en el haz y envés de las hojas (Fig 2). El micelio externo presentó conidióforos que midieron aproximadamente 98.3 µm además de presentar apresorios lobulados. Se observaron conidias elipsoidales y no se encontraron cuerpos de fibrosina (Cuadro 5). Mediante la microscopía electrónica de rastreo se observó la superficie de la conidia con patrones lineares y lados terminales lisos (Fig. 3).No se observó estructura sexual. Se identificó a *Erysiphe (Uncinula) australiana* en los tejidos de *Lagerstroemia indica*.

Cuadro 5. Observaciones morfológicas de *Erysiphe (Uncinula) australiana*

Micelio: Externo	Forma de la conidia: elipsoidal a cilíndrica
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 98.3
Largo de la célula basal (µm) : 64	Ancho del conidióforo (µm): 7.3
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): lisa
Conidiogénesis: conidias simples	Superficie conidia (SEM): linear
Tubo germinativo: Terminal	Conidias (µm): 32.45 x 14.67

Herbario: L1

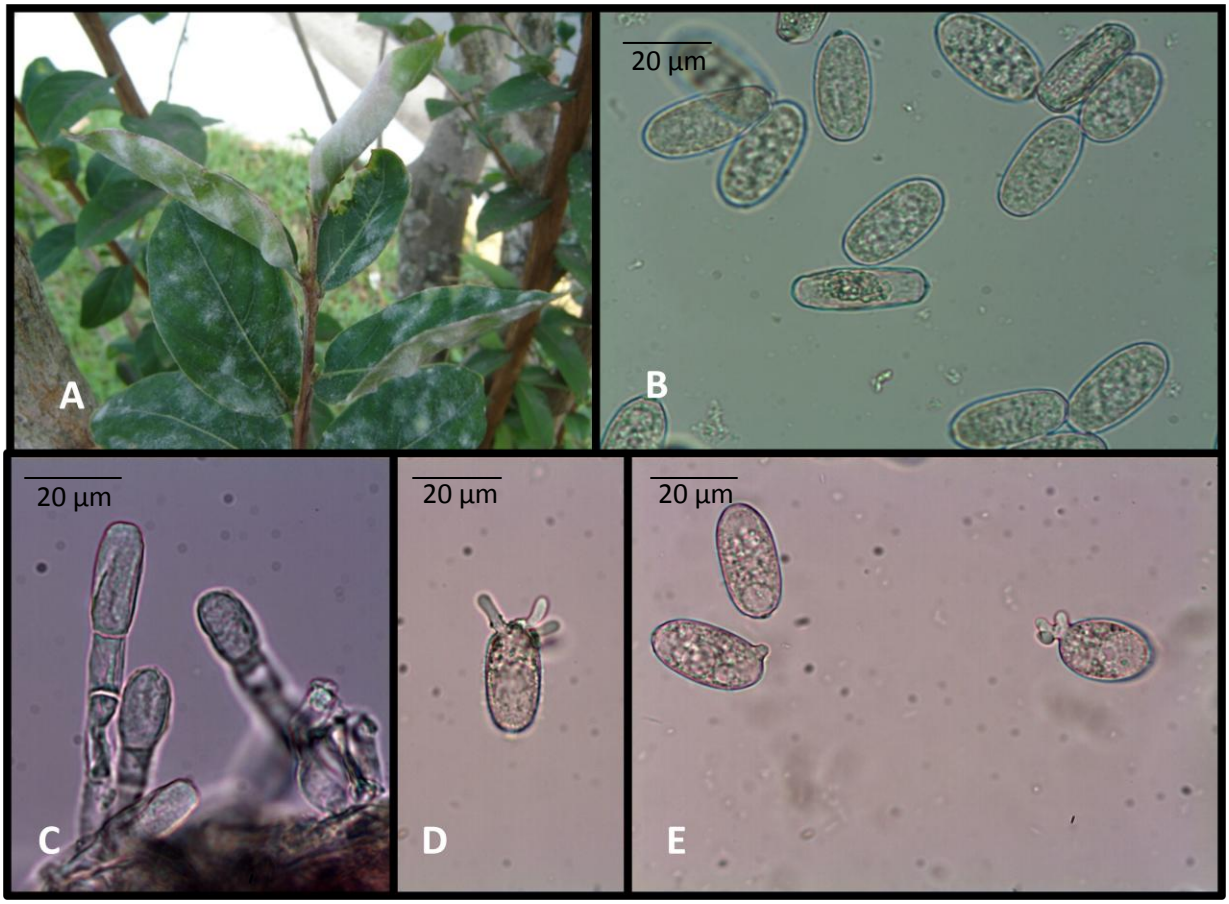


Figura 2. *Erysiphe (Uncinula) australiana.* (A) Sintomatología en *Lagerstroemia indica*. (B) Conidias elipsoidales. (C) Conidióforo simple. (D) y (E) Germinación terminal de las conidias. Obsérvese desarrollo de múltiples tubos germinativos en posición terminal.

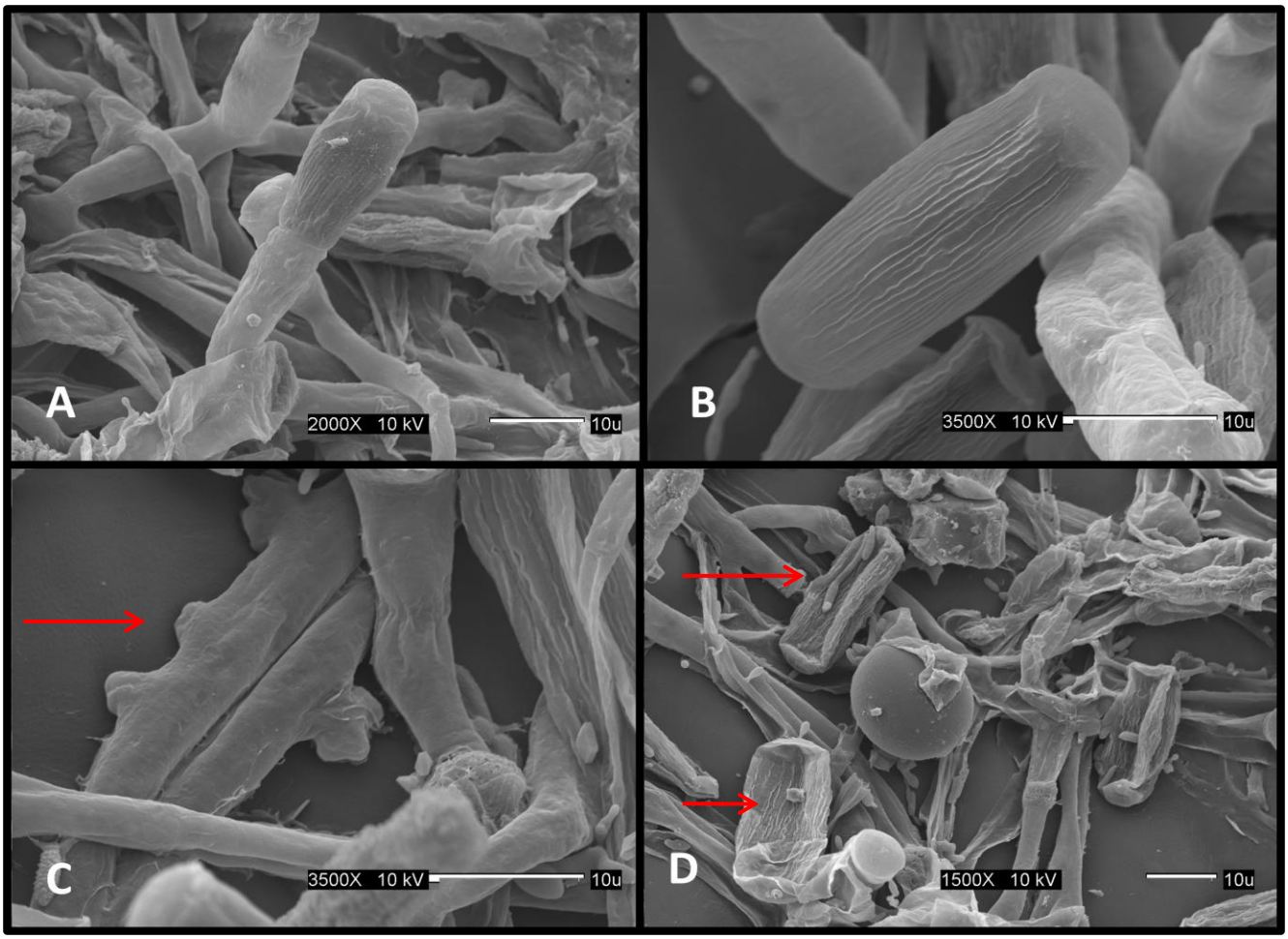


Figura 3. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe australiana* en *Lagerstroemia indica*. (A) Conidióforo simple de *E. australiana*. (B) Conidia con patrones lineares y superficie lateral de la conidia lisa. (C) Apesorios lobulados. (D) Conidias deshidratadas.

4.1.2 Margarita africana (*Gerbera jamesonii)*, ornamental colectada en un vivero comercial en el pueblo de Aibonito. Las plantas presentaron alta severidad de infección de añublo polvoriento. Se encontró abundante micelio sobre el área foliar, además de pétalos y tallos. Se identificó a *Podosphaera fusca* como el agente causal de la enfermedad, el conidióforo presentó conidias en cadenas (99.1 µm de largo) con célula basal recta (Fig. 4) y cuerpos de fibrosina en conidias y apresorio indistinto. Presentó un tipo de germinación Fuliginea (=*Magnicelulate)*, lateral sin apresorio (Cuadro 6). Con el microscopio electrónico de rastreo se pudo observar los anillos concénticos además del septo donde se unen las conidias, muy común en este género (Fig. 5).

Cuadro 6. Observaciones morfológicas de *Podosphaera fusca*

Micelio: Externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: indistinto	Cuerpos de fibrosina: presentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 99.1
Largo de la célula basal (µm) : 40.3	Ancho del conidióforo (µm): 9.0
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): anillos concéntricos
Conidiogénesis: conidias en cadenas	Superficie conidia (SEM): ondeada
Tubo germinativo: lateral	Mediciónes de la conidia: 53.46 x 33.40

Herbario:L2

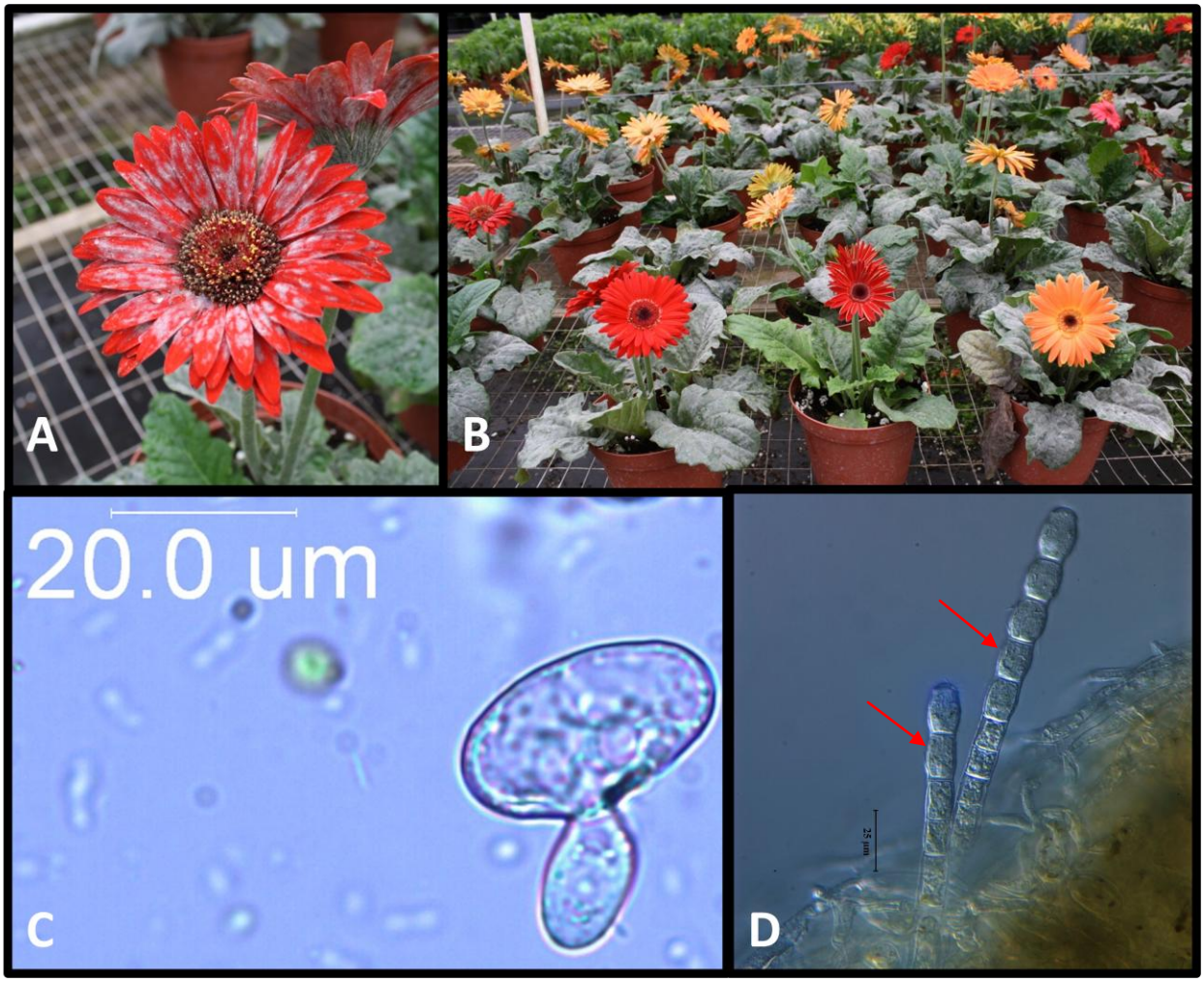


Figura 4. Gerbera jamesonii, planta ornamental comúnmente conocida como margarita africana. (A) Añublo polvoriento en la flor y (B) Arreglo de plantas en un vivero comercial en la zona central de Puerto Rico, obsérvese infección severa en las hojas. (C) Germinación de la conidia tipo Fuliginea (=*Magnicellulatae*). (D) Conidióforos en cadena y conidias con cuerpos de fibrosina (Microscopía de Nomarsky).

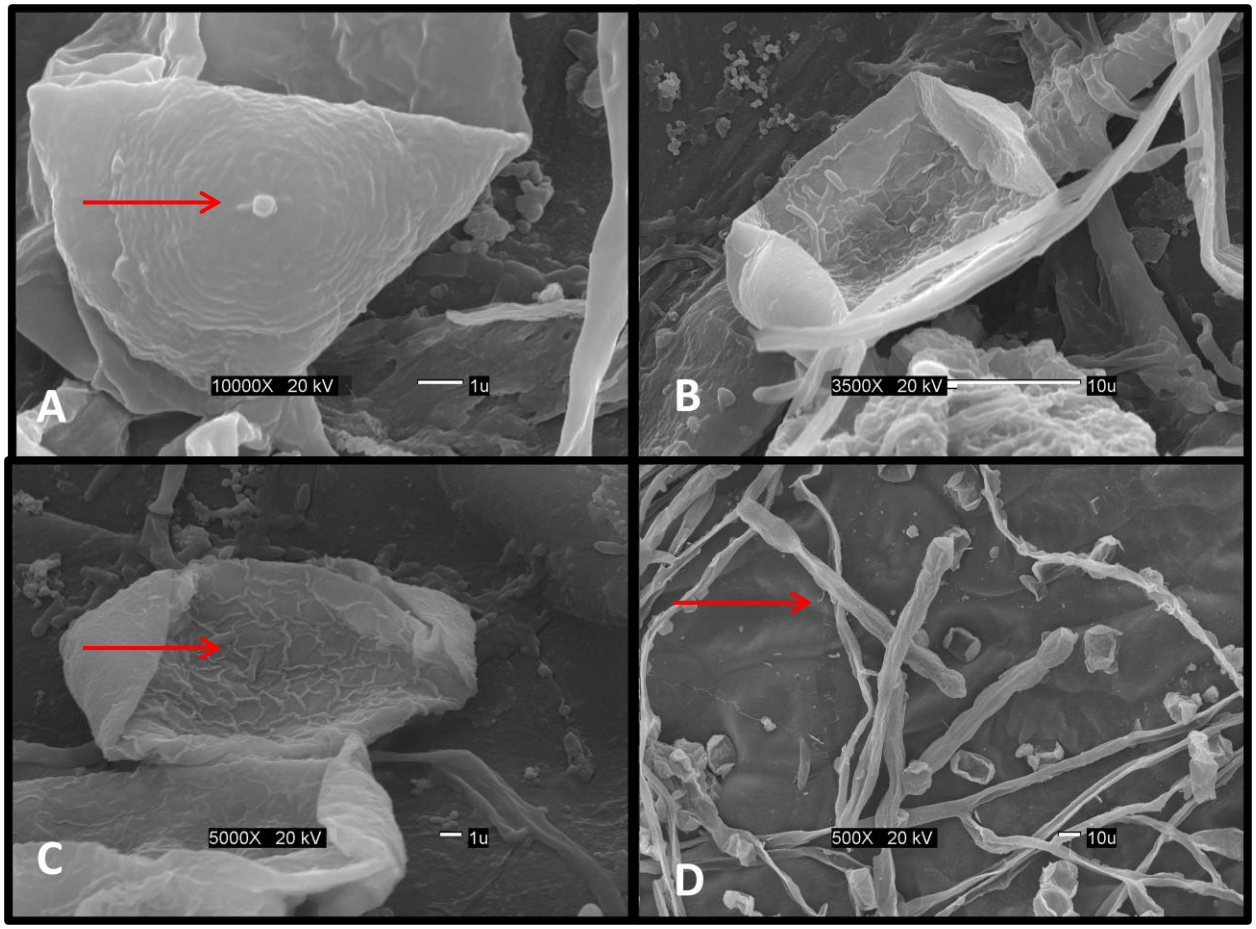


Figura 5. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera fusca*. (A) Lado terminal de la conidia con anillos concéntricos, se observa además el septo donde estaba pegada al conidióforo (10000X). (B) y (C) Conidia deshidratada en la cual se observa una superficie ondulada. (D) Conidióforos en cadena y apresorio simples (500X).

4.1.3 Zinnia (*Zinnia elegans*), planta ornamental comúnmente encontrada en viveros comerciales y en áreas de ornato en residencias. Durante muestreos realizados se encontró añublo polvoriento con un alto por ciento de severidad en la inflorescencia. También se recolectó en hojas nuevas y senescentes. Durante los dos años de estudio se observó en los meses de diciembre a febrero. Se identificó a *Golovinomyces cichoracearum* como el agente causal de la enfermedad. Se observó micelio externo con apresorios apezonados sobre la superficie del tejido. Las conidias cilíndricas son de aproximadamente 30.41 x 16.05 µm, desarrollo del tubo germinativo sub-terminal sin apresorio (Fig. 6) y ausencia de cuerpos de fibrosina (Cuadro 7). En el microscopio electrónico de rastreo se observaron las conidias túrgidas presentando superficies ásperas (Fig. 7). Además se observó la presencia de un coccinélido, *Psyllobora nana*, micófago alimentándose del micelio. En hojas senescentes se observó la presencia del hiperparásito, *Ampelomyces quisqualis*.

Cuadro 7. Observaciones morfológicas de *Golovinomyces cichoracearum*

Micelio: Externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: apezonado (papilado)	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 230.19 (10x)
Largo de la célula basal (µm): 109.67	Ancho del conidióforo (µm): 12.96
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): poligonal
Conidiogénesis: conidias en cadenas (hasta 4)	Superficie conidia (SEM): áspera
Tubo germinativo: subterminal sin apresorio al final del tubo germinativo.	Medición de la conidia (µm): 30.41 x 16.05

Herbario: L3

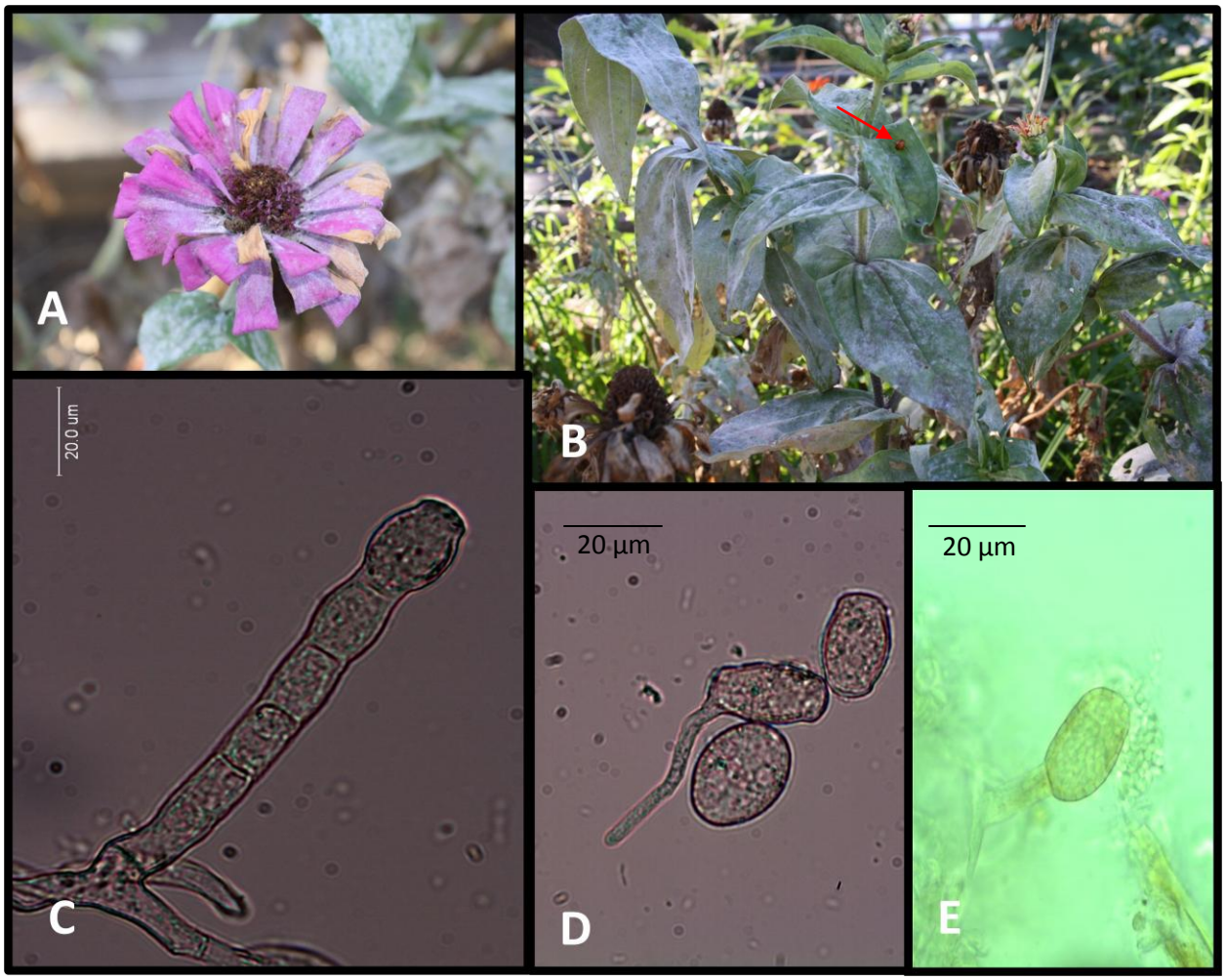


Figura 6. *Golovinomyces cichoracerum* (A) Inflorescencia de *Zinnia elegans* con un alto porcentaje de severidad del patógeno. (B) Planta adulta de *Zinnia elegans* infectada con añublo polvoriento en la cual se pueden observar coccinélidos alimentándose del patógeno. (C) Conidióforo en cadena (40x). (D) Conidia germinando por el extremo subterminal con apresorio simple (40x). (E) Conidia cubierta por el hiperparásito *Ampelomyces quisqualis* (40x).

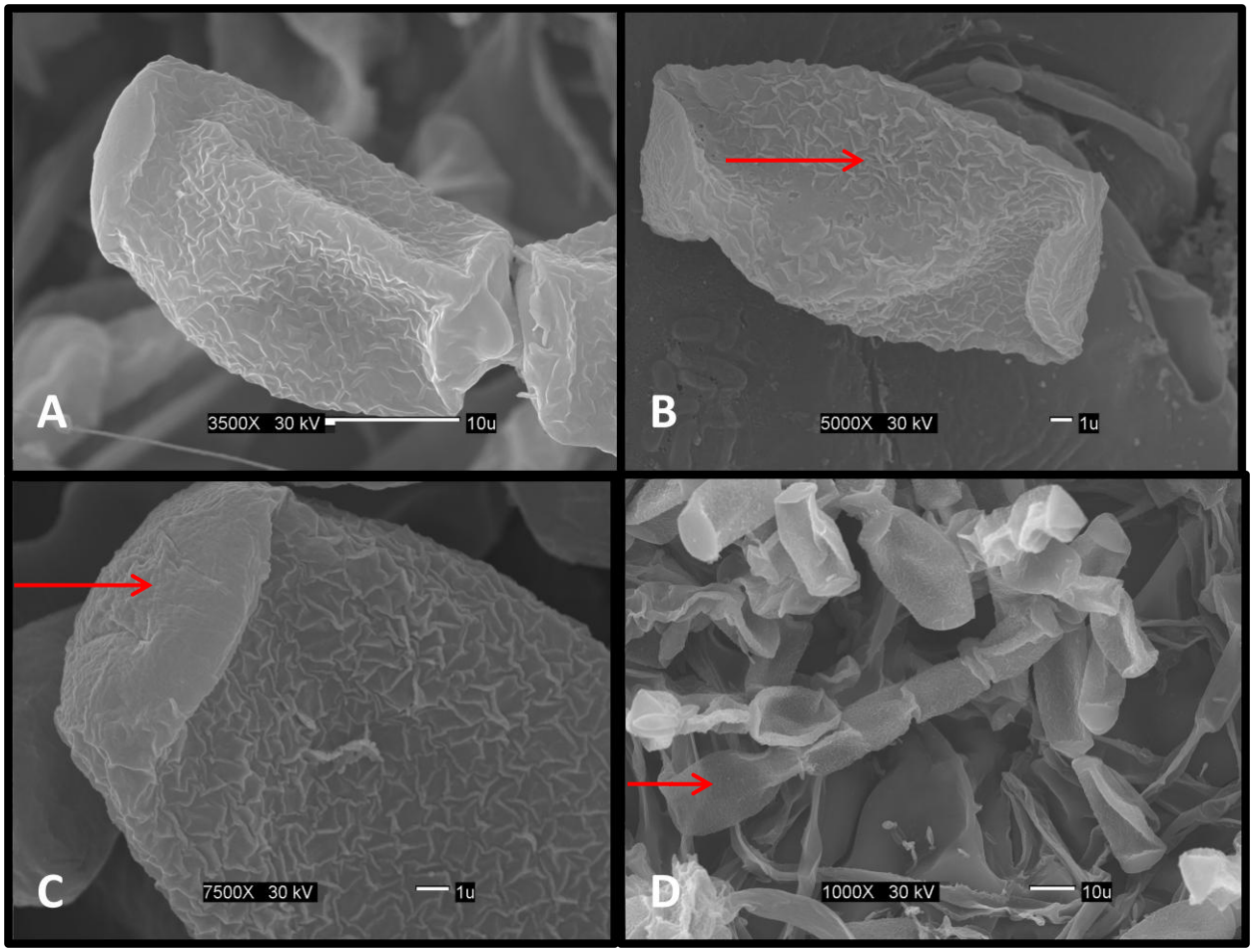


Figura 7. Microscopía electrónica de rastreo para *Golovinomyces cichoracearum* en *Zinnia elegans*. (A) Conidia madura con extremos fibrilares (3500X). (B) Superficie rugosa de la conidia (5000X). (C) Lado terminal fibrilar (7500X). (D) Conidióforo en cadena deshidratado (1000X).

4.1.4 Rosa (*Rosa* spp.) – En los pueblos de Lares, Adjuntas y Aibonito fue común la presencia de añublo polvoriento. Se identificó a *Podosphaera pannosa* como el organismo causal de la enfermedad. Este se observó durante los meses de enero 2010 hasta marzo 2011 ya que es donde se registran las temperaturas más frecas. Posee un apresorio de forma apezonada, conidias en cadenas (6-7 conidias) y cuerpos de fibrosina muy típicos de éste género (Cuadro 8; Fig. 8 y 9).

Cuadro 8. Observaciones morfológicas de *Podospahera pannosa*

Micelio: Externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: apezonado	Cuerpos de fibrosina: presentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): ----
Largo de la célula basal (µm): ----	Ancho del conidióforo (µm): ----
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): arrugado
Conidiogénesis: conidias en cadenas	Superficie conidia (SEM): arrugado
Tubo germinativo: ---	Medición conidia (µm): 25.6 x 14.3

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L4

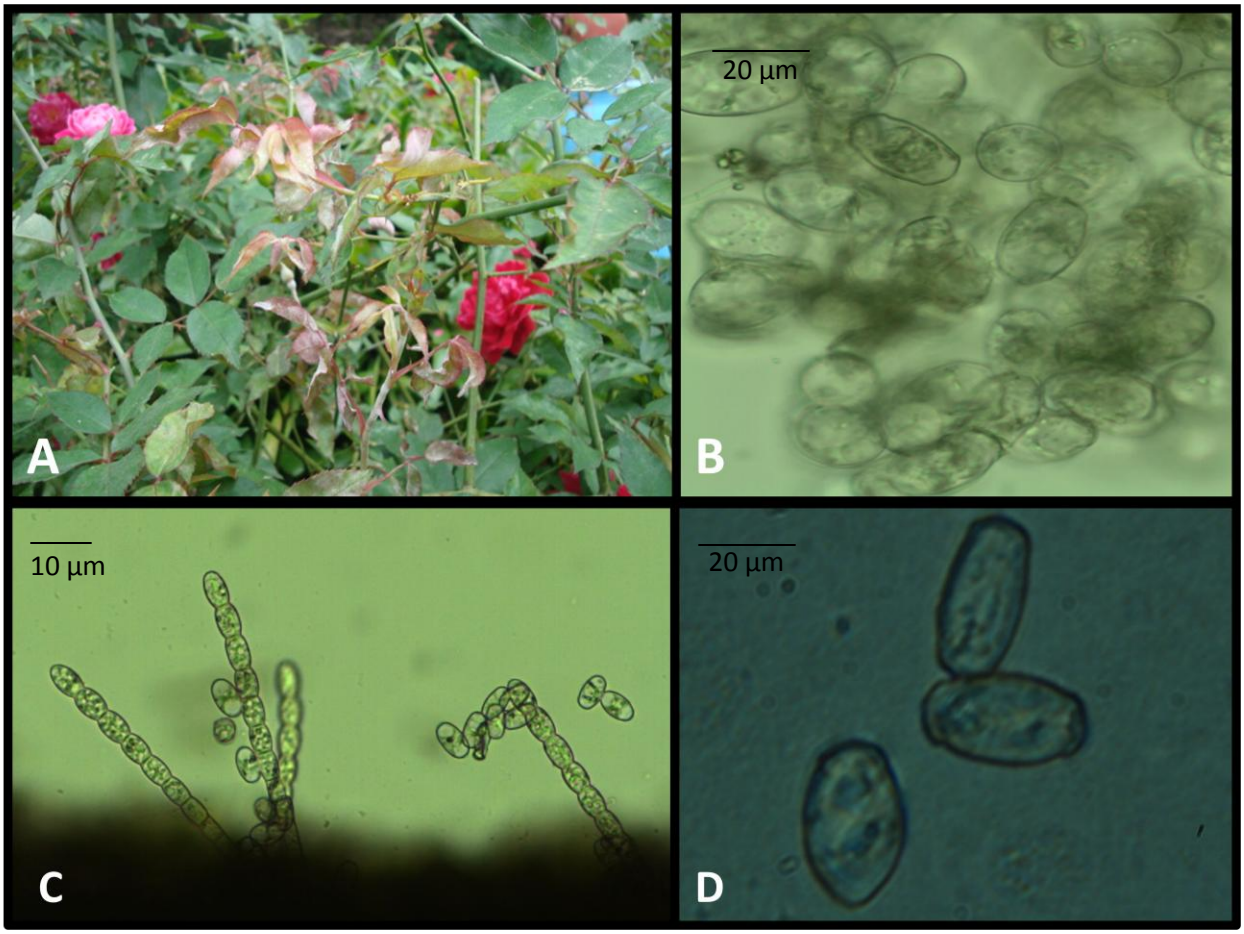


Figura 8. *Podosphaera pannosa.* (A) Planta sintomática de *Rosa* spp. se observa la presencia de añublo polvoriento en brotes nuevos. (B) Conidias cilíndricas (40x). (C) Conidioforos en cadena (10x). (D) Conidias maduras con cuerpos de fibrosina (40x).

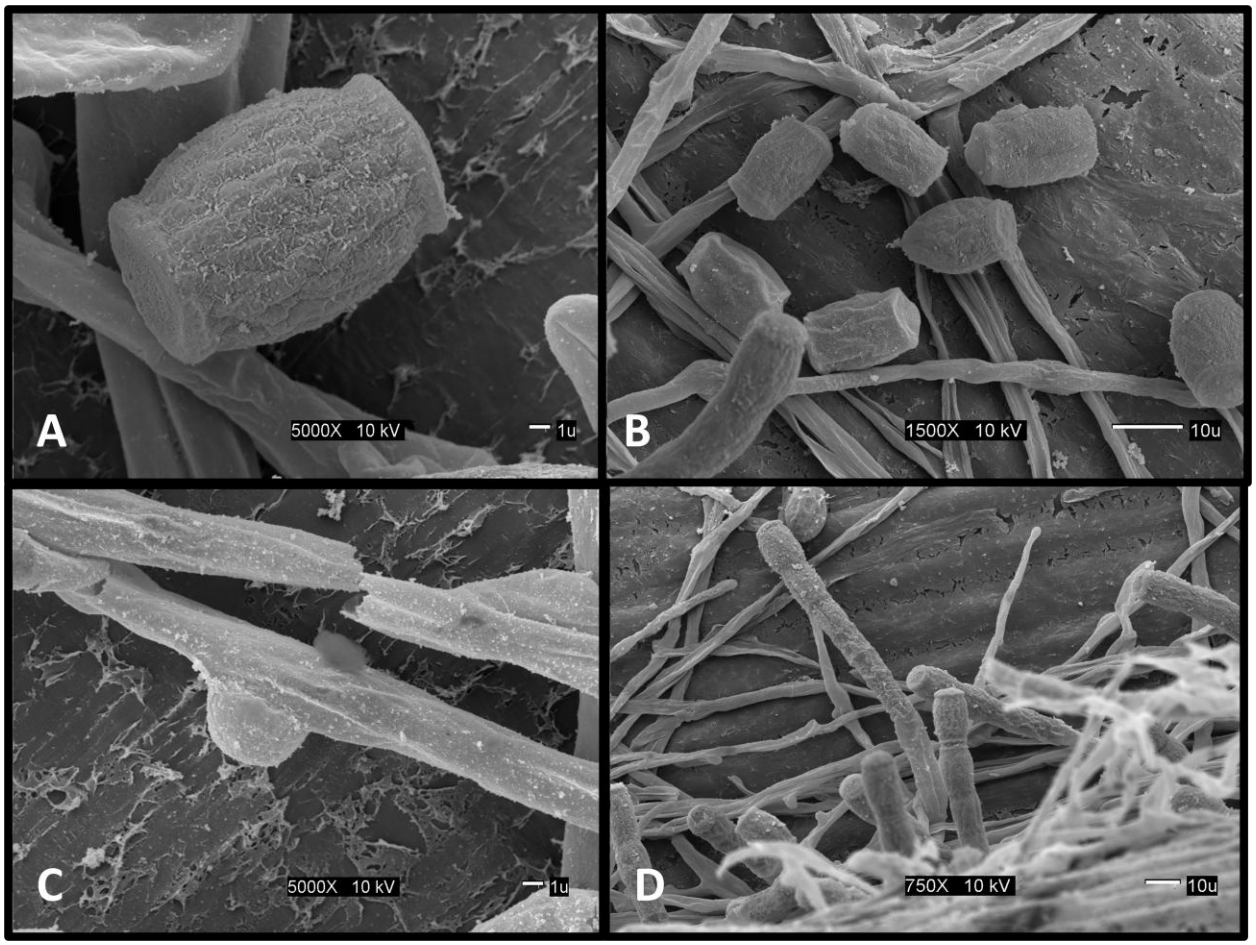


Figura 9. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera pannosa* (A) Conidia madura sobre tejido de rosa (5000X). (B) Conidias cilíndricas con extremos arrugados (1500X). (C) Apresorio apezonado en la hifa (5000X). (D) Conidióforo en cadena (750X).

4.1.5 Hortensia (*Hydrangea macrophylla*), es vendida para los meses de abril a mayo. La misma llega a Puerto Rico en esquejes dormantes desde California (Gómez, 2011, com. pers.). Las muestras fueron recolectadas en un vivero comercial en Aibonito, P.R. Se identificó a *Erysiphe (Microsphaera) polonica*. Presentó micelio externo con apresorios multilobulados en secuencia, conidias elipsoidales de aproximadamente 30.23 x 11.08 µm (Cuadro 9). No se observaron cuerpos de fibrosina, los conidióforos encontrados fueron simples y micelio externo (Fig. 11). A medida que la enfermedad progresa se observa tejido necrótico hasta que la hoja se seca y cae. No se observó afectando la inflorescencia.

Cuadro 9. Observaciones morfológicas de *Erysiphe (Microsphaera) polonica*

Micelio: Externo	Forma de la conidia: elipsoidal
Apresorio: multilobulado en secuencia	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 73.4
Largo de la célula basal (µm): 19.8	Ancho del conidióforo (µm): 7.2
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): arrugado
Conidiogénesis: simples o en cadenas cortas	Superficie conidia (SEM): arrugado
Tubo germinativo: sub-terminal lateral	Medición conidia 30.23 x 11.08

Herbario: L5

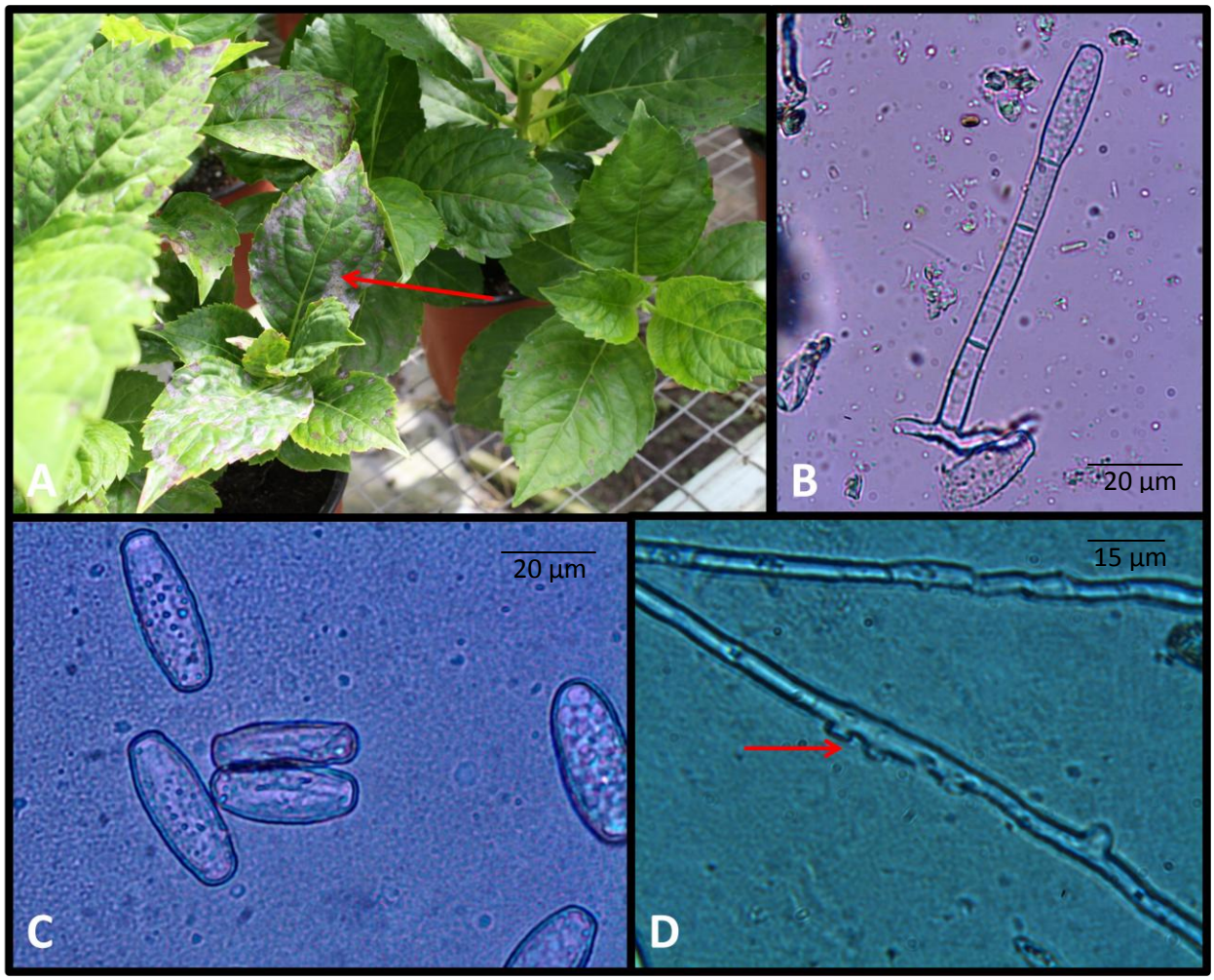


Figura 10. *Erysiphe (Microsphaera) polonica* (A) Planta sintomática de hortensia. (B) Conidióforo con célula basal recta. (C) Conidias maduras (40x). (D) Apresorios lobulados en hifa sobre tejido vegetal del hospedero (40x).

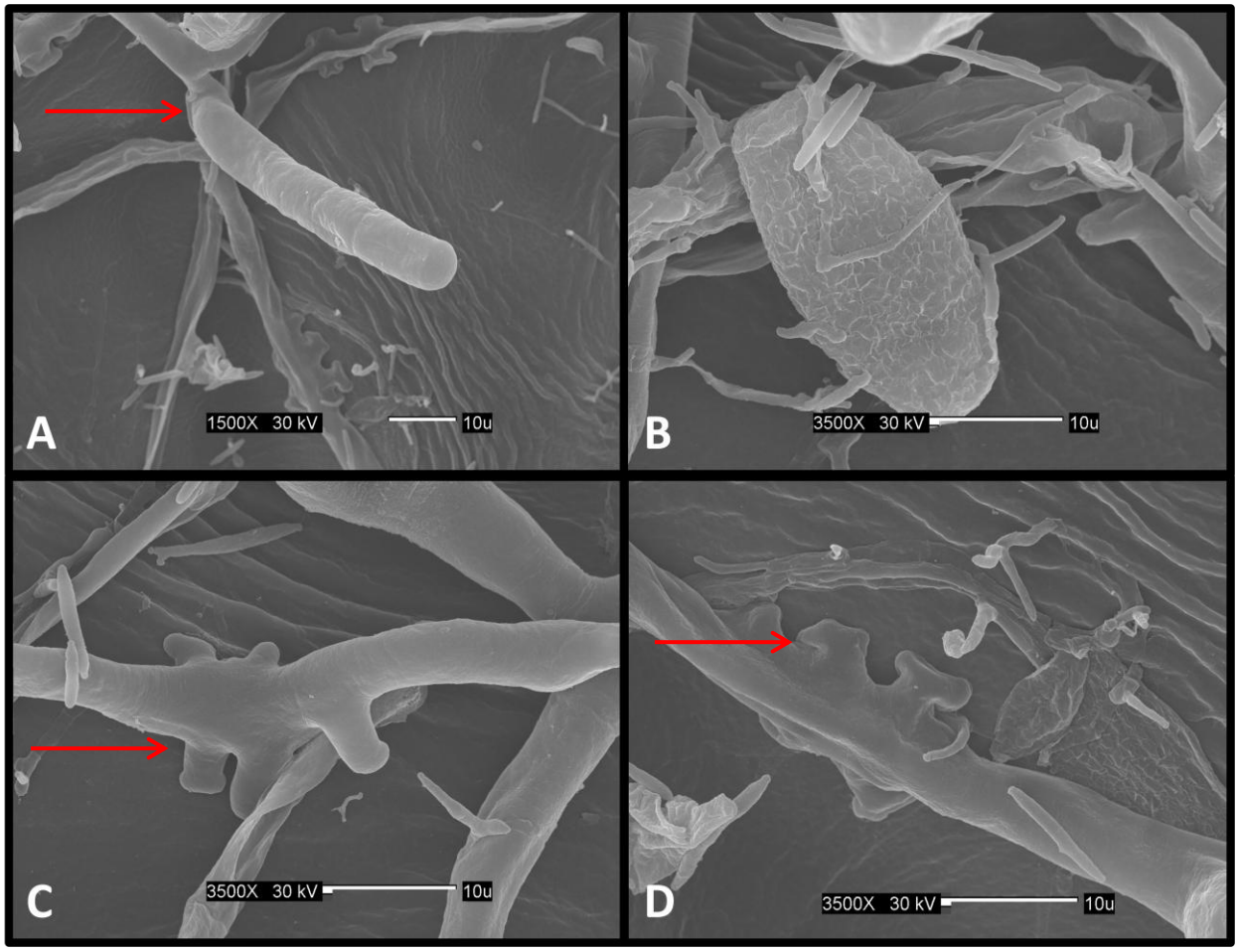


Figura 11. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe (Microsphaera) polonica*. (A) Conidióforo simple con célula basal recta (1500X). (B) Conidia madura (3500X). (C) y (D) Apresorio multilobulado típico de ésta especie (3500X).

4.1.6 Pascua (*Euphorbia pulcherrima)* o flor de la navidad. Durante muestreos a viveros comerciales y Estaciones Experimentales en la zona central de Puerto Rico se encontró añublo polvoriento, identificándose a *Oidium poinsettiae*. Se observó en hojas nuevas y senescentes, en el haz y el envés de la hoja (Fig. 12) y la presencia del hiperparásito *Ampelomyces quisqualis*. Se observó la célula basal del conidióforo arqueada o curva, apresorios lobulados en hifas, conidias cilíndircas (Fig. 12) y tubo germinativo terminal con apresorio lobulado (Cuadro 10). Mediante la microscopía electrónica de rasteo se observó la superficie rugosa de la conidia, lados terminales fibrilares y el apresorio lobulado en la hifa sobre la superficie del tejido vegetal (Fig. 13).

Cuadro 10. Observaciones morfológicas de *Oidium poinsettiae*

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base arqueada	Largo del conidióforo (µm): ---
Largo de la célula basal (µm): 20- 27	Ancho del conidióforo (µm): ---
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidias simples	Superficie conidia (SEM): rugosa
Tubo germinativo: terminal con apresorio lobulado	Medición conidia: 29.33 x 16.56

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L6

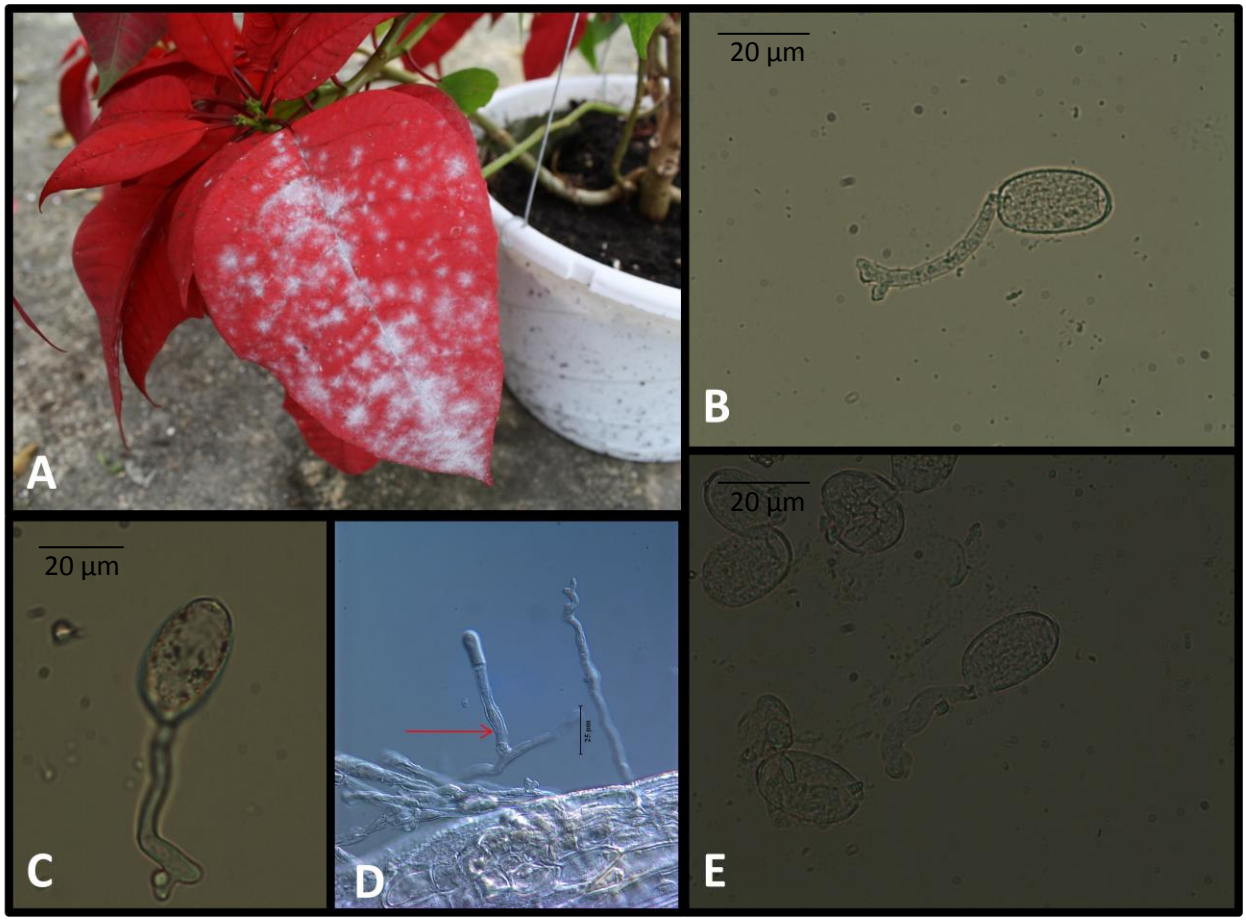


Figura 12. *Oidium poinsettiae* (A) Hoja de pascua infectada. (B) (C) y (E) Se observan conidias con tubo germinativo terminal, presentando apresorio lobulado al final del tubo germinativo (40x). (D) Célula basal del conidióforo arqueada. (Técnica de Nomarsky).

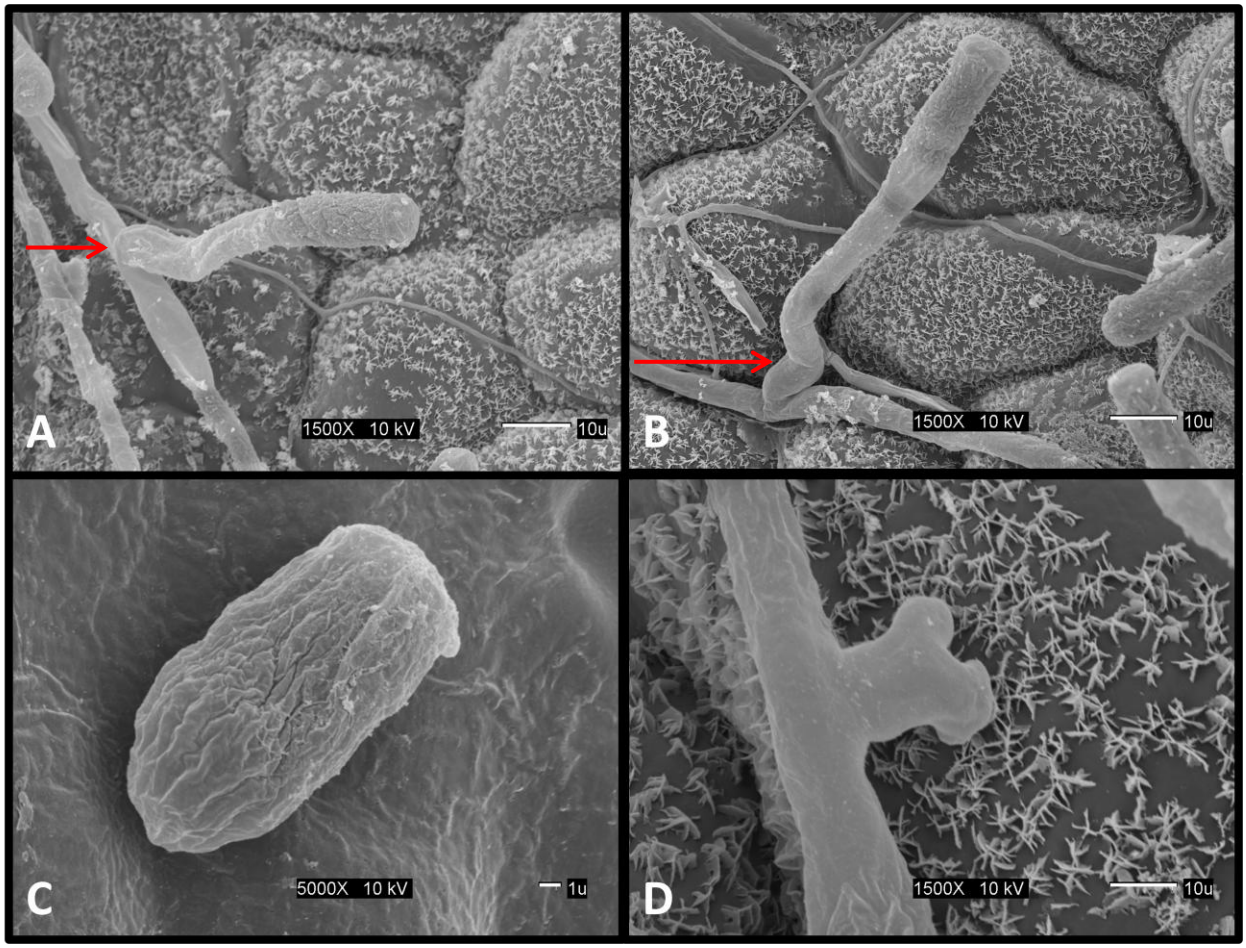


Figura 13. Microscopía electrónica de rastreo para *Oidium poinsettiae*. (A) Conidióforo simple tipo Euoidium (1500X). (B) Conidióforo en el cual se observa la base arqueada (1500X). (C) Conidia cilíndrica (5000X). (D) Apresorio lobulado en la hifa sobre la superficie del hospedero (1500X).

4.1.7 Achiote *(Bixa orellana)* - Durante los muestreos se observó añublo polvoriento afectando el achiote en los pueblos de Villalba, Mayagüez y Lares. Se identificó a *Oidium bixae* como el organismo causal de la enfermedad. Se observó el desarrollo de micelio externo en los brotes nuevos durante los meses de enero a marzo (Fig. 14). El tubo germinativo es terminal y moderadamente largo, a las 10 horas se observó el desarrollo de apresorios bifurcados (Fig. 14), no presenta conidias en cadenas ni cuerpos de fibrosina. Posee un conidióforo simple tipo *Pseudoidium* (Cuadro 11). Mediante microscopía electrónica de rastreo se observó claramente la superficie rugosa de las conidias túrgidas y lados terminales fibrilares donde se observa levemente el septo (Fig. 15).

Cuadro 11. Observaciones morfológicas de *Oidium bixae*

Micelio: externo	Forma de la conidia: limoniforme
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): ---
Largo de la célula basal (µm):---	Ancho del conidióforo (µm): ---
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidióforo simple	Superficie conidia (SEM): rugosa
Tubo germinativo: moderadamente largo con apresorio lobulado.	Medición conidia (µm): 30.72 x 19.02

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L7

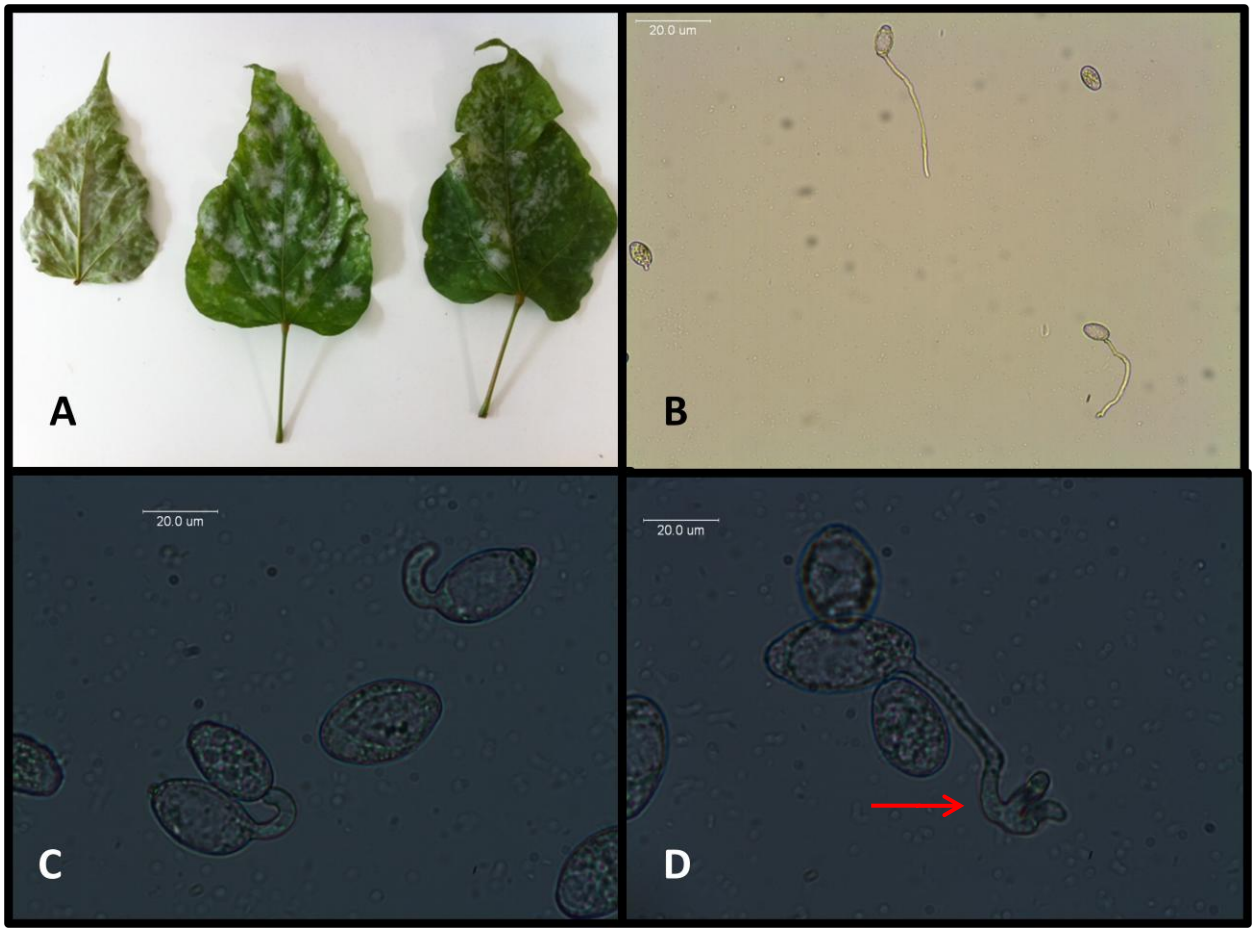


Figura 14. *Oidium bixae* (A) Hojas infectadas con añublo polvoriento en el haz y envés de la hoja. (B) Tubo germinativo alargado sin apresorio. (C) Conidias limoniformes, tubo germinativo sub-terminal luego de 5 horas (40x). (D) Tubo germinativo relativamente largo en algunos casos presentando apresorio bifurcado al final (10 horas) (40x).

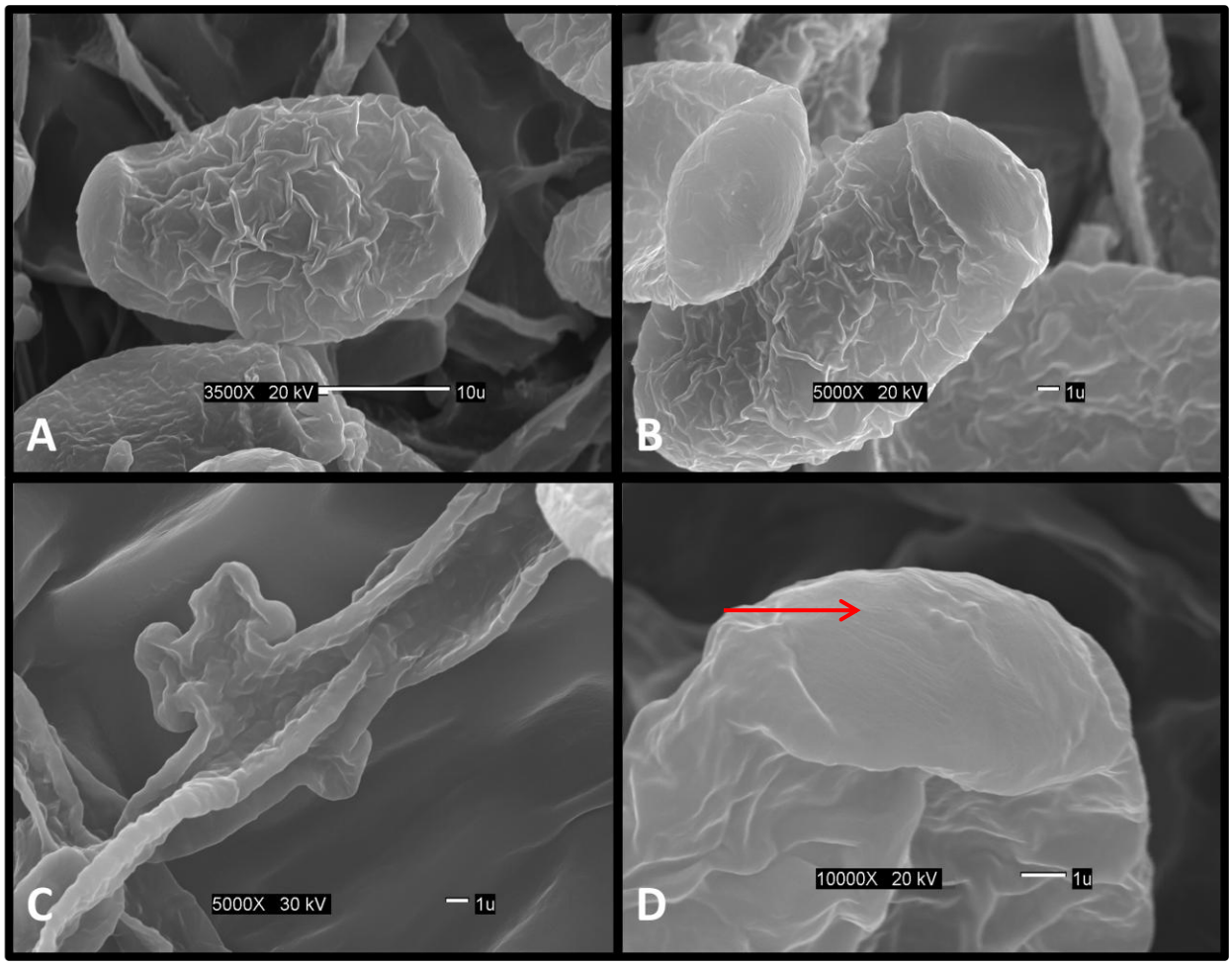


Figura 15. Microscopía electrónica de rastreo para *Oidium bixae*. (A) y (B) Conidias maduras, se observan lados terminales fibrilares y superficies rugosas (3500X). (C) Hifa deshidratada donde se observa el apresorio multilobulado (5000X). (D) Lado terminal de la conidia, donde se observan patrones fibrilares alrededor del septo (1000X).

4.1.8 Angelonia *(Angelonia angustifolia)* – Es una planta ornamental importada de California (USA), llega a Puerto Rico aproximadamente durante el mes de abril. Se encontró la planta con la presencia de añublo polvoriento en hojas y tallos poco lignificados en marzo del 2011, durante los muestreos a un jardín comercial en Aibonito (Fig.16). Se identificó a *Erysiphe quercicola* mediante microscopia de luz y electrónica de rastreo y análisis de la región ITS. Durante el desarrollo de las conidias se observaron cadenas cortas de tres a cuatro conidias por conidióforo erecto. El desarrollo del tubo germinativo se observó aproximadamente a las 7 horas, el cual germinó por los lados terminales con apresorio lobulado. Las conidias ovoides a elipsoidales median 35.5 x 14.7 µm. En hifas se observó la presencia de apresorios lobulados o apezonados (Cuadro 12). En el SEM se observaron conidias con lados terminales subtruncados y fibrilares con una superficie rugosa (Fig. 17).

Cuadro 12. Observaciones morfológicas de *Erysiphe quercicola*

Micelio: externo	Forma de la conidia: ovoide – elipsoidal
Apresorio: apezonado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): ---
Largo de la célula basal (µm):---	Ancho del conidióforo (µm): ---
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidióforo en cadenas cortas	Superficie conidia (SEM): rugosa
Tubo germinativo: terminal con apresorio lobulado	Medición conidia (µm): 35.5 x 14.7

Figura 16. Sintomatología de añublo polvoriento *Erysiphe quercicola* en *Angelonia augustifolia*.

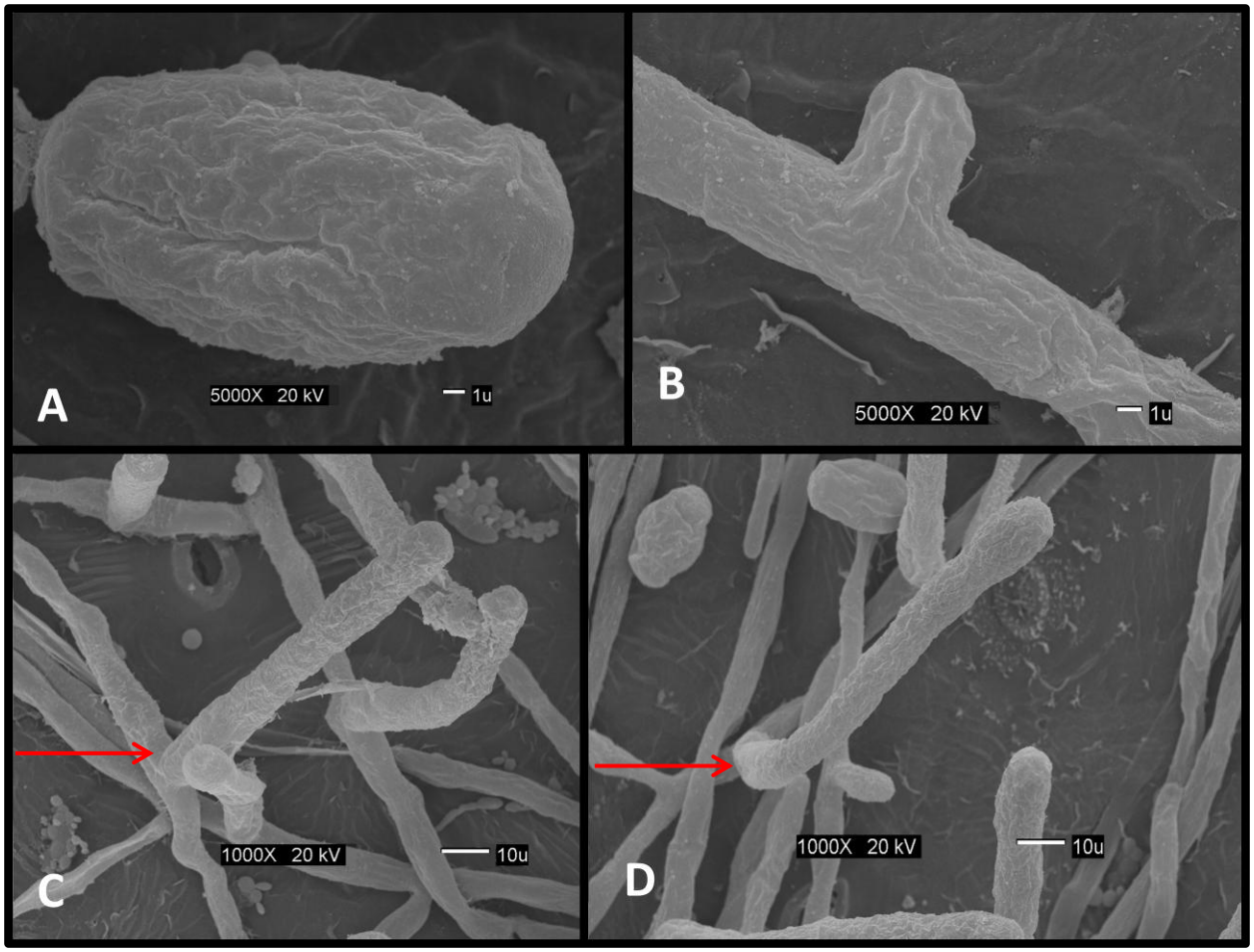


Figura 17. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe quercicola*. (A) Conidia madura la cual presenta superficies laterales fibrilares y su superficie rugosa (5000X). (B) Apresorio de forma apezonada en la hifa (5000X). (C) y (D) Conidióforos en cadenas cortas (1000X).

4.1.9 Eneldo *(Anethum graveolens)* – Se observó la presencia de añublo polvoriento para los meses de abril a mayo del 2011 en las localidades de Juana Díaz (EEA) y Mayagüez. Los primeros síntomas de manchas blancas irregulares se observaron en el tallo y luego en hojas (Fig.18). Los síntomas aumentaron en las primeras etapas de floración. La microscopia de luz relevó la presencia de conidióforos cortos, conidias elipsoidales a ovoides 39.0 x 14.9 µm sin cuerpos de fibrosina, célula basal recta (36.0 µm), seguida por una a dos células pequeñas y el tubo germinativo se observó en la parte terminal de la conidia moderadamente largo sin apresorio (Cuadro 13; Fig. 18). No se observó el estado sexual del patógeno. Basados en la observaciones morfológicas del estado anamórfo, el agente causal del añublo polvoriento en eneldo fue identificado como *Erysiphe heraclei*.

Cuadro 13. Observaciones morfológicas de *Erysiphe heraclei*

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 98.9
Largo de la célula basal (µm): 36.0	Ancho del conidióforo (µm): 7.7
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): ---
Conidiogénesis: conidióforo simple	Superficie conidia (SEM): ---
Tubo germinativo: moderadamente largo sin apresorio	Medición conidia (µm): 39.0 x 14.9

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

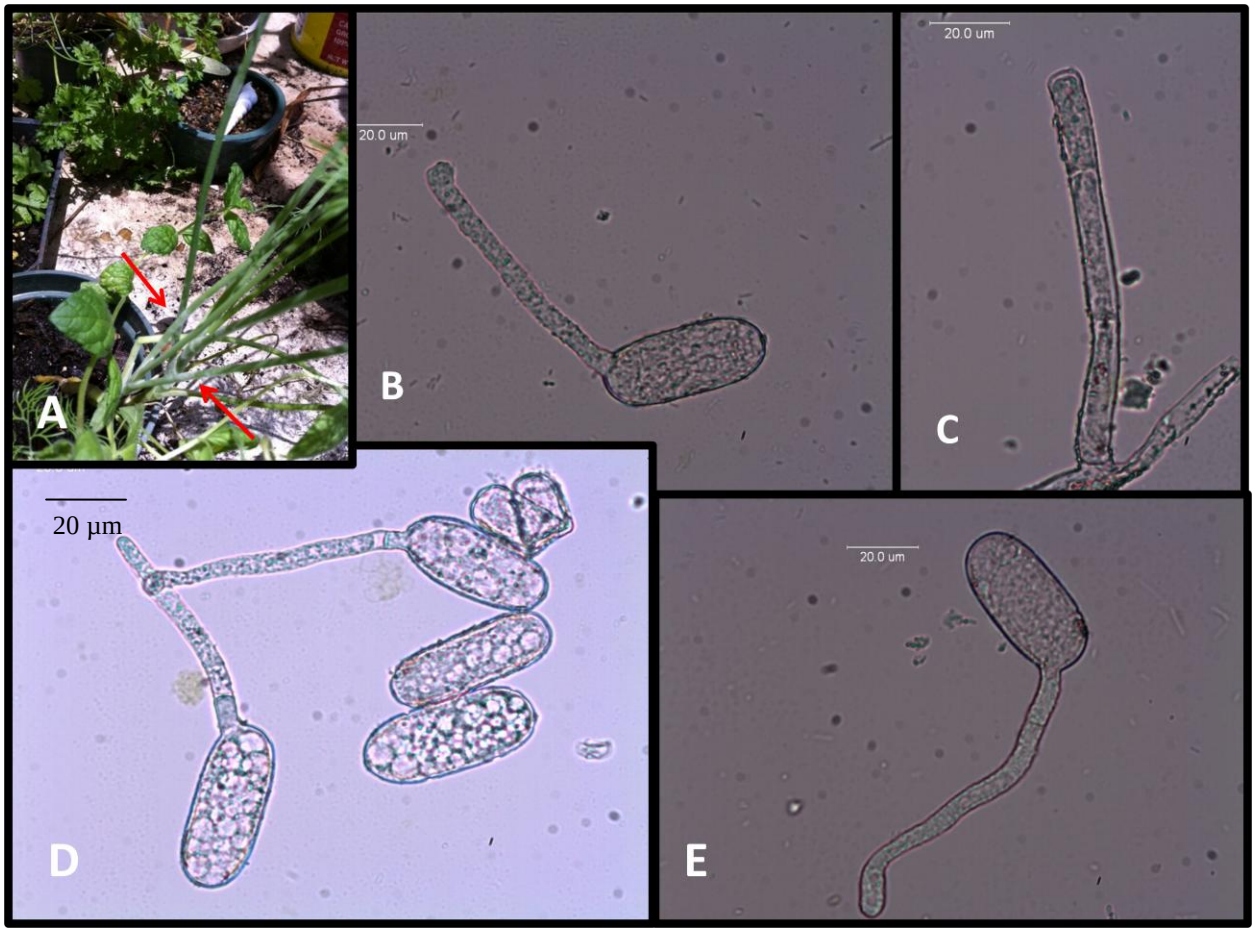


Figura 18. *Erysiphe heraclei* en eneldo (*Anethum graveolens*). (A) Planta con añublo polvoriento en la base del tallo. (B) (D) y (E) Conidias cilíndricas germinadas por el extremo terminal con tubo germinativo moderadamente largo sin apresorio al final (40x). (C) Conidióforo simple de *Erysiphe heraclei* (40x).

4.1.10 Cleome *(Cleome viscosa)* – Es una maleza comúnmente encontrada en el área suroeste de Puerto Rico. En la EEA de Juana Díaz se recolectó afectando el predio de las plantas medicinales como parte de esta investigación. Es una maleza muy agresiva (Fig.19). Por medio de características morfológicas se identificó a *Podosphaera* sp. como el agente causal de la enfermedad. Se observó la presencia de conidióforos en cadena, conidias con cuerpos de fibrosina y germinación tipo Fuliginea (=*Magnicellulatae*) (Fig.19). Mediante microscopia electrónica de rastreo se observó la superficie de la conidia ondulada y lados terminales fibrilares con anillos concéntricos comenzando desde el septo central (Fig. 20).

Cuadro 14. Observaciones morfológicas de *Podosphaera* sp.

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: apezonado	Cuerpos de fibrosina: presente
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): --
Largo de la célula basal (µm): > 40	Ancho del conidióforo (µm): --
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidióforo en cadena	Superficie conidia (SEM): ondeada
Tubo germinativo: mediano sin apresorio	Medición conidia (µm): 35.2 x 17.4

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

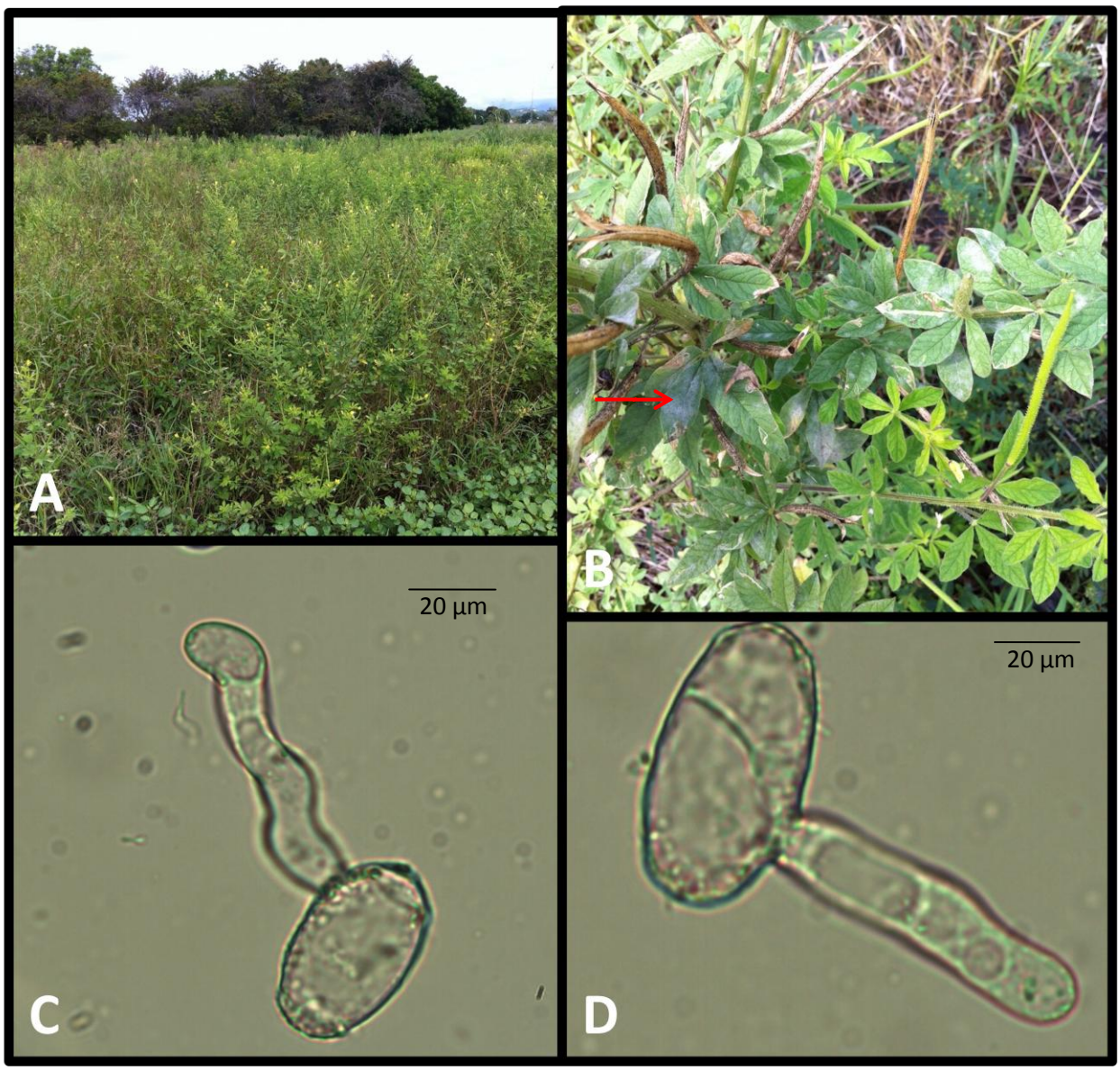


Figura 19. *Podosphaera* sp. en cleome (*Cleome viscosa*). (A) Predio donde se sembraron las plantas medicinales en la Estación Experimental de Juana Díaz; se puede observar la agresividad de la planta en el predio. (B) Planta infectada con añublo polvoriento. (C) y (D) Germinación tipo Fuliginea (=*Magnicellulatae*) (40x).

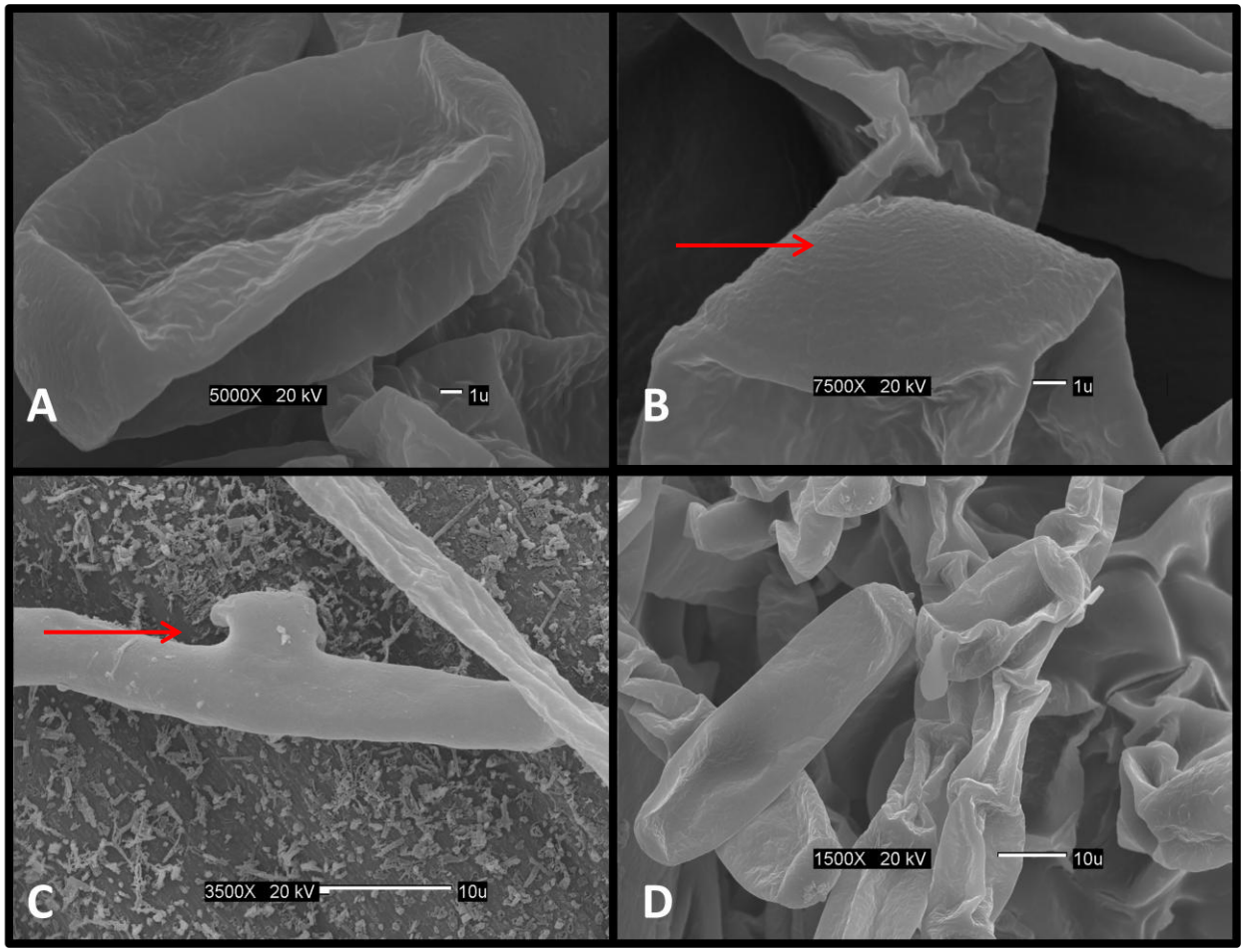


Figura 20. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera* sp. (A) Conidia deshidratada donde se observa la superficie ondulada (5000X). (B) Parte terminal de la conidia, se observan anillos concéntricos (7500X). C. Apresorio de forma apezonada (3500X).

4.1.11 Girasol *(Helianthus annuus)* – Es mayormente sembrado en el área sur del país, en los viveros de invierno por las industrias de producción de semillas. Durante la primavera del 2011, se observaron síntomas y signos de añublo polvoriento en hojas y peciolos (Fig. 21). En ambos lados de la hoja se encontró la presencia de signos de la enfermedad aunque en el haz fue mayor. A medida que la enfermedad progresaba, las hojas infectadas se tornaron cloróticas y marchitas. Con el microscopio de luz se observó micelio externo con apresorio apezonado, célula basal recta (39.8 µm), conidia con lados terminales subtruncados y sin cuerpos de fibrosina (Cuadro 15). Por medio de la caracterización morfológica se logró identificar a *Golovinomyces cichoracearum* afectando el girasol.

Cuadro 15. Observaciones morfológicas de *Golovinomyces cihoracearum*

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica a elipsoidal
Apresorio: apezonado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 120.6
Largo de la célula basal (µm): 39.8	Ancho del conidióforo (µm): 10.2
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): rugosa
Conidiogénesis: conidias en cadenas cortas	Superficie conidia (SEM): fibrilar
Tubo germinativo: ---	Medición conidia (µm): 27.57 x 15.15

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L8

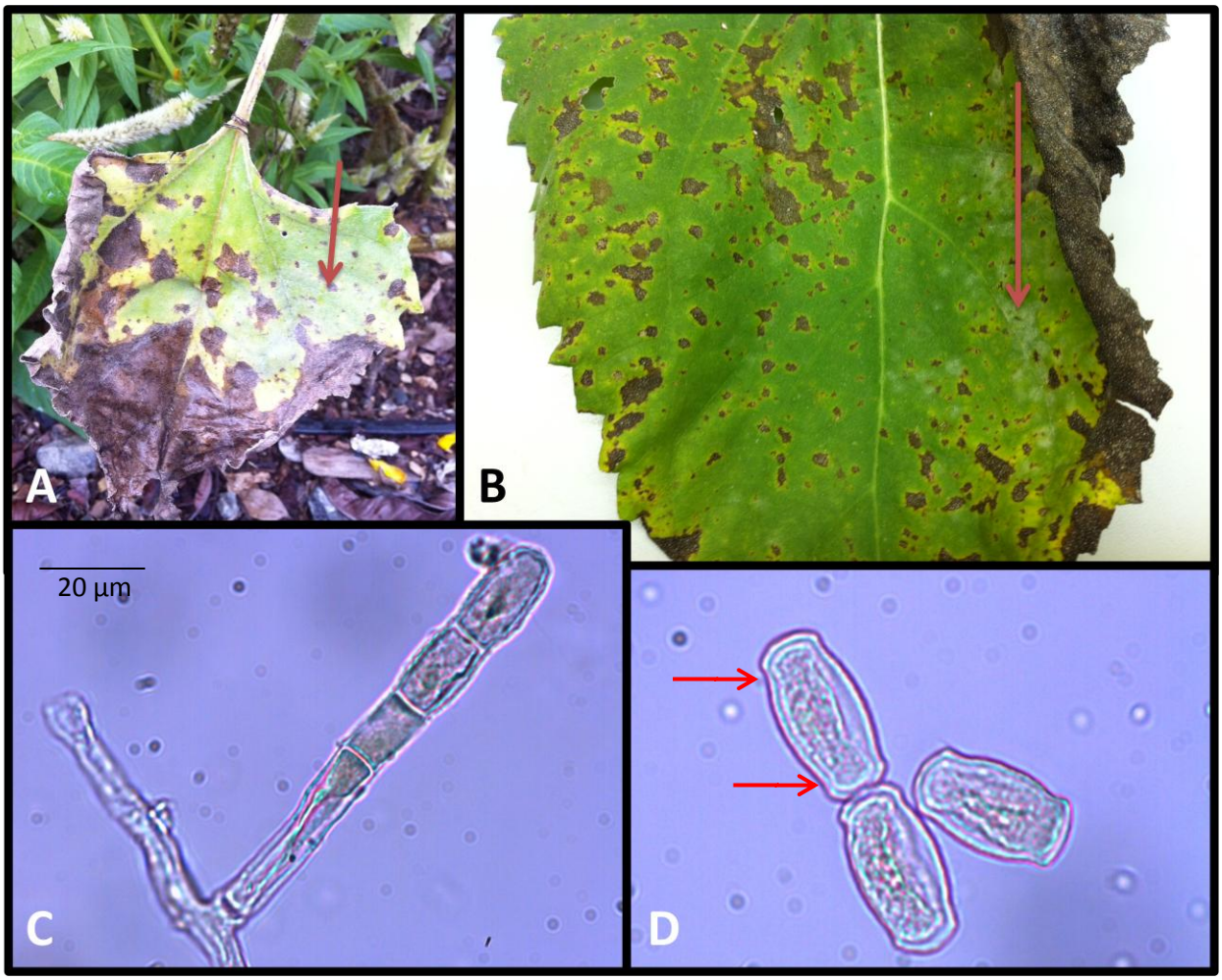


Figura 21. *Golovinomyces cihoracearum* en girasol (*Helianthus annuus*). (A) y (B) Síntomas y signos de añublo polvoriento ocasionado por *Golovinomyces* sp. en *Helianthus annus*. (C) Conidióforo con célula basal recta (40x). (D) Conidias maduras con lados terminales subtruncados (40x).

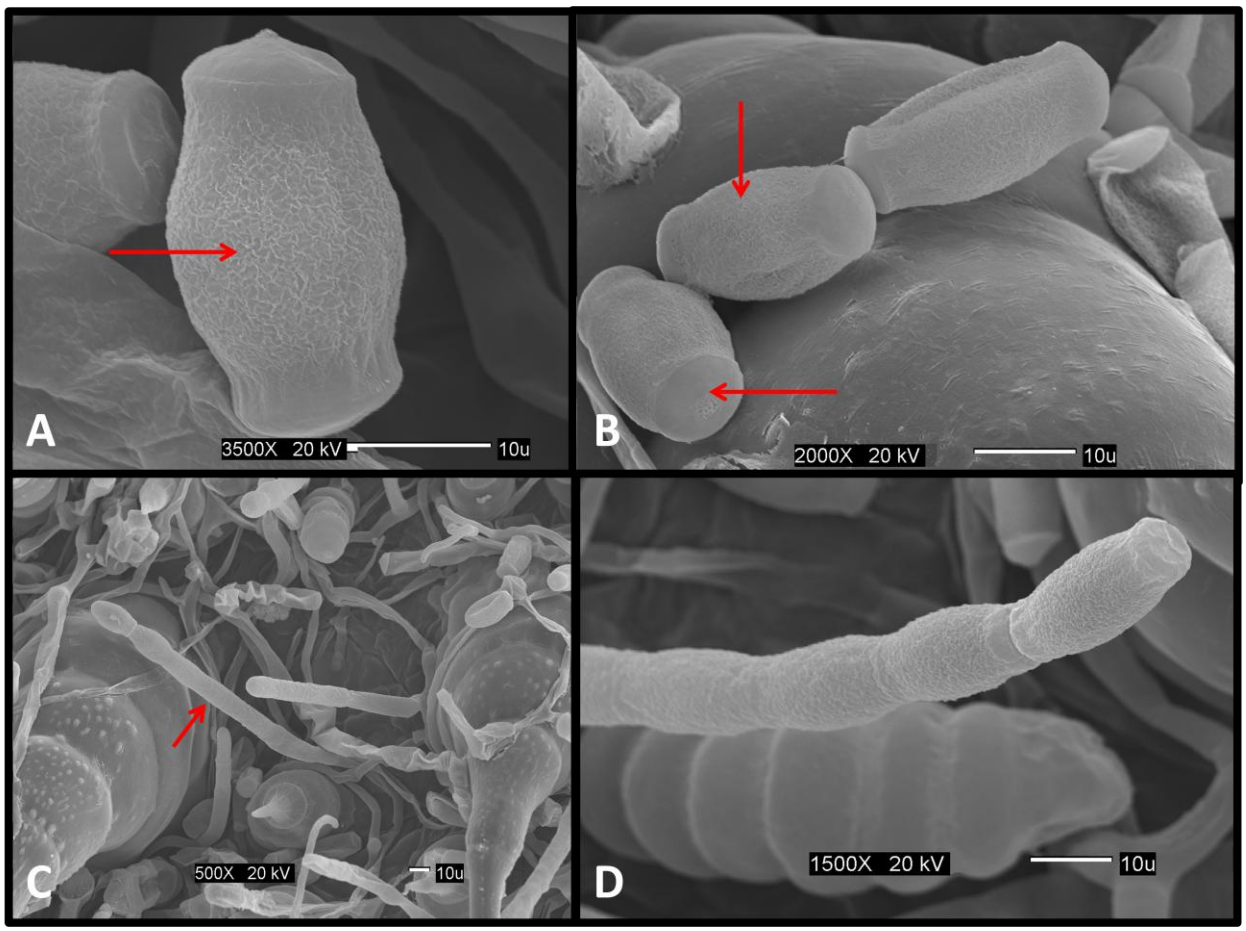


Figura 22. Microscopía electrónica de rastreo para *Golovinomyces cichoracearum*. (A) Conidia madura donde se observa la superficie rugosa y lados terminales subtruncados (3500X). (B) Parte terminal de la conidia donde se observa la superficie fibrilar de la conidia y superficie rugosa (2000X). (C) Conidióforo en cadenas cortas 3 a 4 conidias (500X). (D) Conidias maduras en la parte termianl del conidióforo (1500X).

4.1.12 Acalifa *(Acalypha wilkesiana* subsp. *wilkesiana)* – Es una planta ornamental que pertenece a la familia Euphorbiaceae. Comúnmente utilizada en áreas de ornato por su valor estético. Durante los muestreos realizados en la zona central y costeras de Puerto Rico se observó mayor incidencia de añublo polvoriento durante los meses de diciembre a mayo del 2010 al 2012. La presencia del hiperparásito *Ampelomyces quisquialis*, dificultó la identificación del patógeno ya que cubría con micelio las estructuras del añublo polvoriento. Sin embargo se observaron conidias ovoides a cilíndricas con extremos subtruncados, sin cuerpos de fibrosina (Fig. 23). Además se observó micelio externo con apresorio apezonado, conidióforo simple con célula basal recta (Fig. 23) y tubo germinativo lateral corto sin apresorio tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Observaciones morfológicas de *Erysiphe acalyphae*

Micelio: externo	Forma de la conidia: ovoide – cilíndrica
Apresorio: apezonado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm):
Largo de la célula basal (µm): 39.8	Ancho del conidióforo (µm):
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidias simples	Superficie conidia (SEM): rugosa
Tubo germinativo: lateral corto sin apresorio	Medición conidia (µm): 27.62 x 14.01

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L9

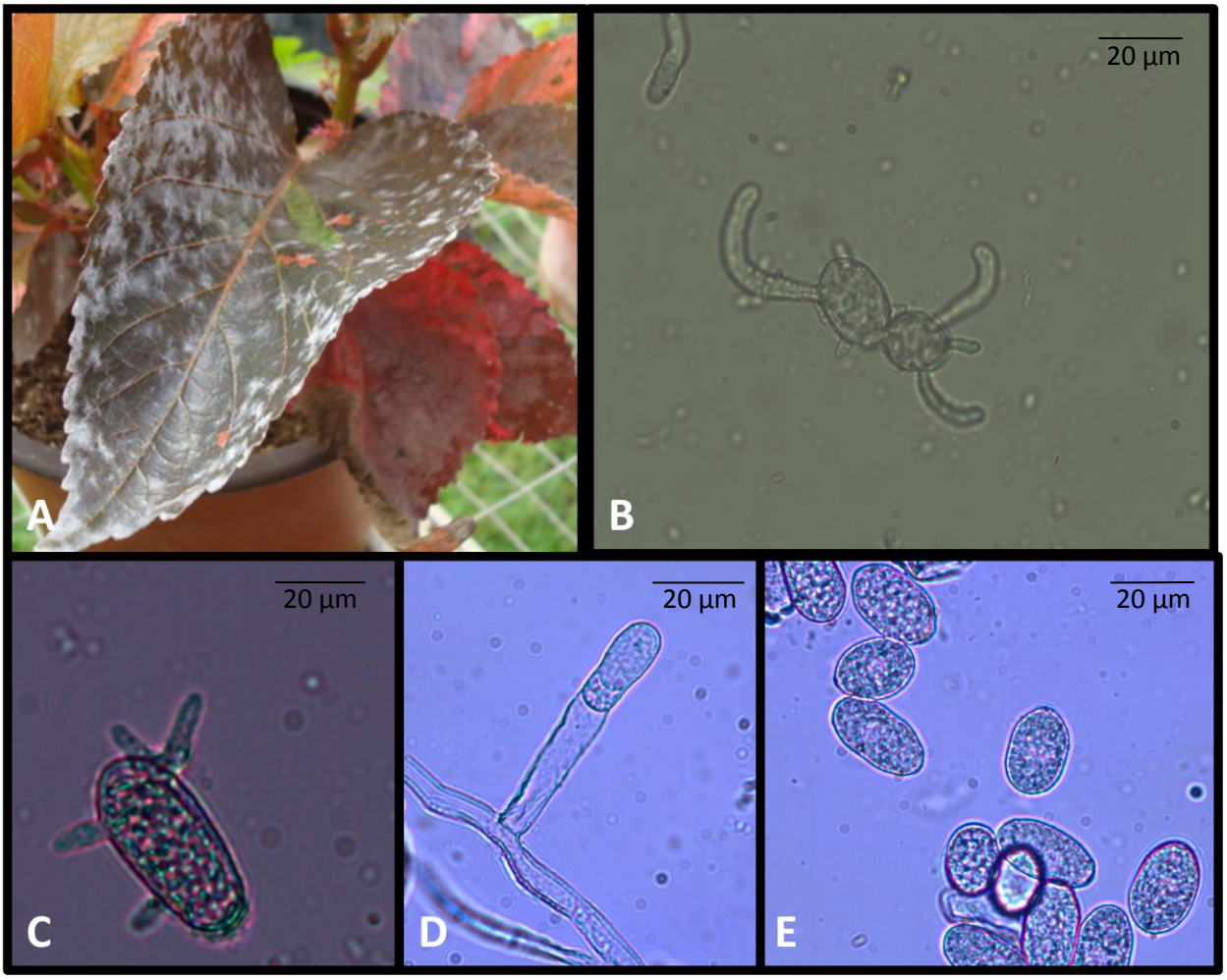


Figura 23. *Erysiphe acalyphae* en *Acalypha wilkesiana*. (A) Síntomas del añublo polvoriento en hojas. (B) y (C) Múltiples tubos germinativos tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*) (40x). (D) Conidióforo simple con célula basal recta (40x). (E) Conidias maduras de forma ovoide a cilíndrica (40x).

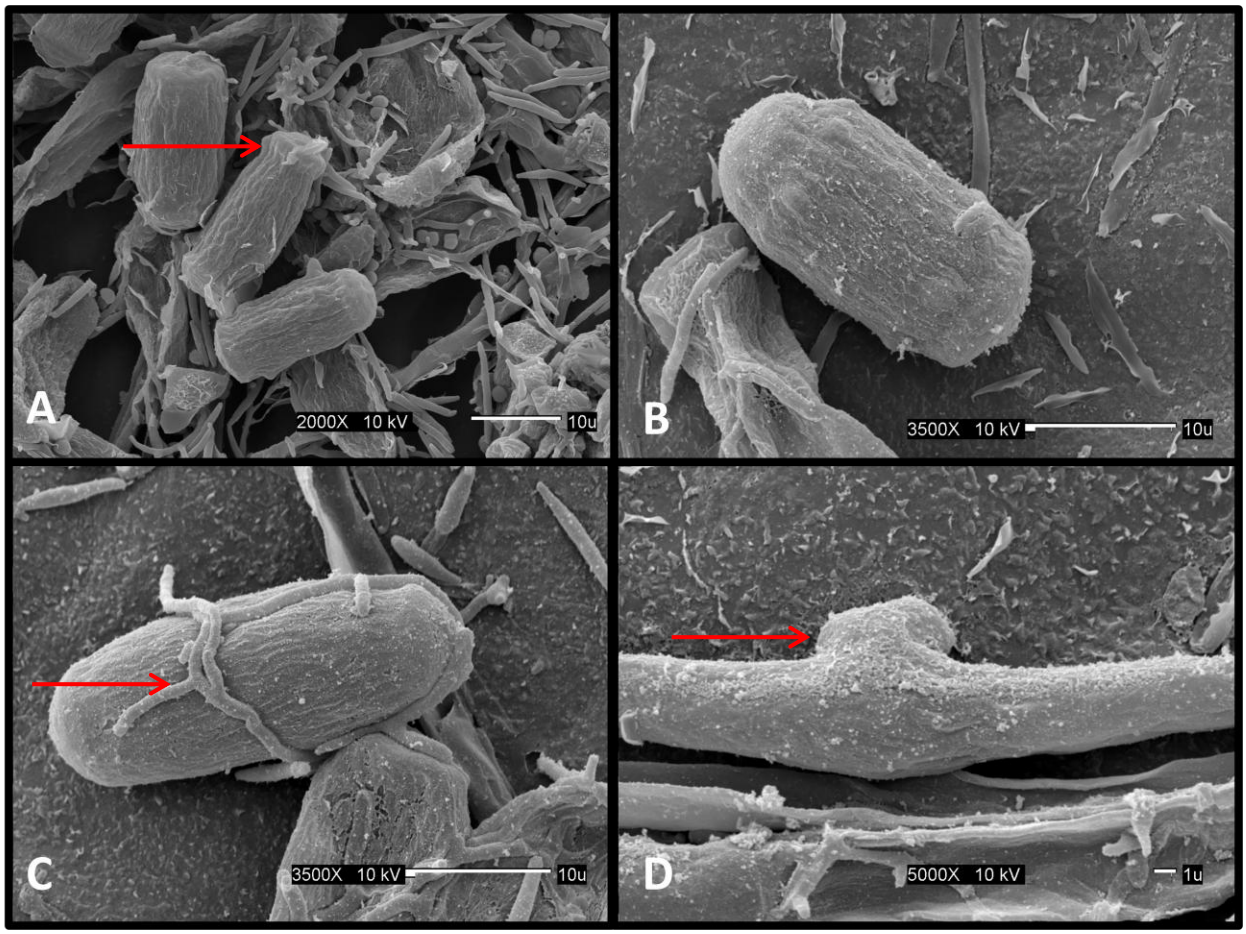


Figura 24. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe acalyphae*. (A) Conidias maduras con extremos subtruncados (2000X). (B) y (C) Conidias maduras parasitadas por *Ampelomyces quisqualis*, (3500X). (D) Apresorio de forma apezonada (5000X).

4.1.13 Tecomaria *(Tecomaria capensis)* – Es un arbusto utilizado como ornamental. De los lugares muestreados se encontró solamente en la Estacion Experimental Agrícola de Adjuntas. La incidencia de la enfermedad fue baja, se observó mayor severidad en hojas nuevas y en los tallos poco leñosos. No se observó en pétalos. El micelio externo presentó conidióforos cortos típicos de la tribu Erysipheae, apresorios lobulados, conidias elipsoidales con germinación tipo polygoni (*Pseudoidium*) (Cuadro 17). No se observó la presencia de cuerpos de fibrosina en las conidias además se observó una germinación sub-terminal sin apresorio (Fig. 25). Mediante microscopía electrónica de rastreo se observó la superficie de la conidia rugosa, lados terminales fibrilares y el apresorio lobulado en al hifa sobre la superfice del tejido foliar (Fig. 26). Las características morfológicas y a través de revisión de literatura se identificó a *Erysiphe peruviana* como el agente causal de la enfermedad.

Cuadro 17. Observaciones morfológicas de *Erysiphe peruviana*

Micelio: externo	Forma de la conidia: elipsiodal
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): --
Largo de la célula basal (µm): ---	Ancho del conidióforo (µm): --
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidióforo simple	Superficie conidia (SEM): rugosa
Tubo germinativo: sub-terminal sin apresorio	Medición conidia (µm): ---

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

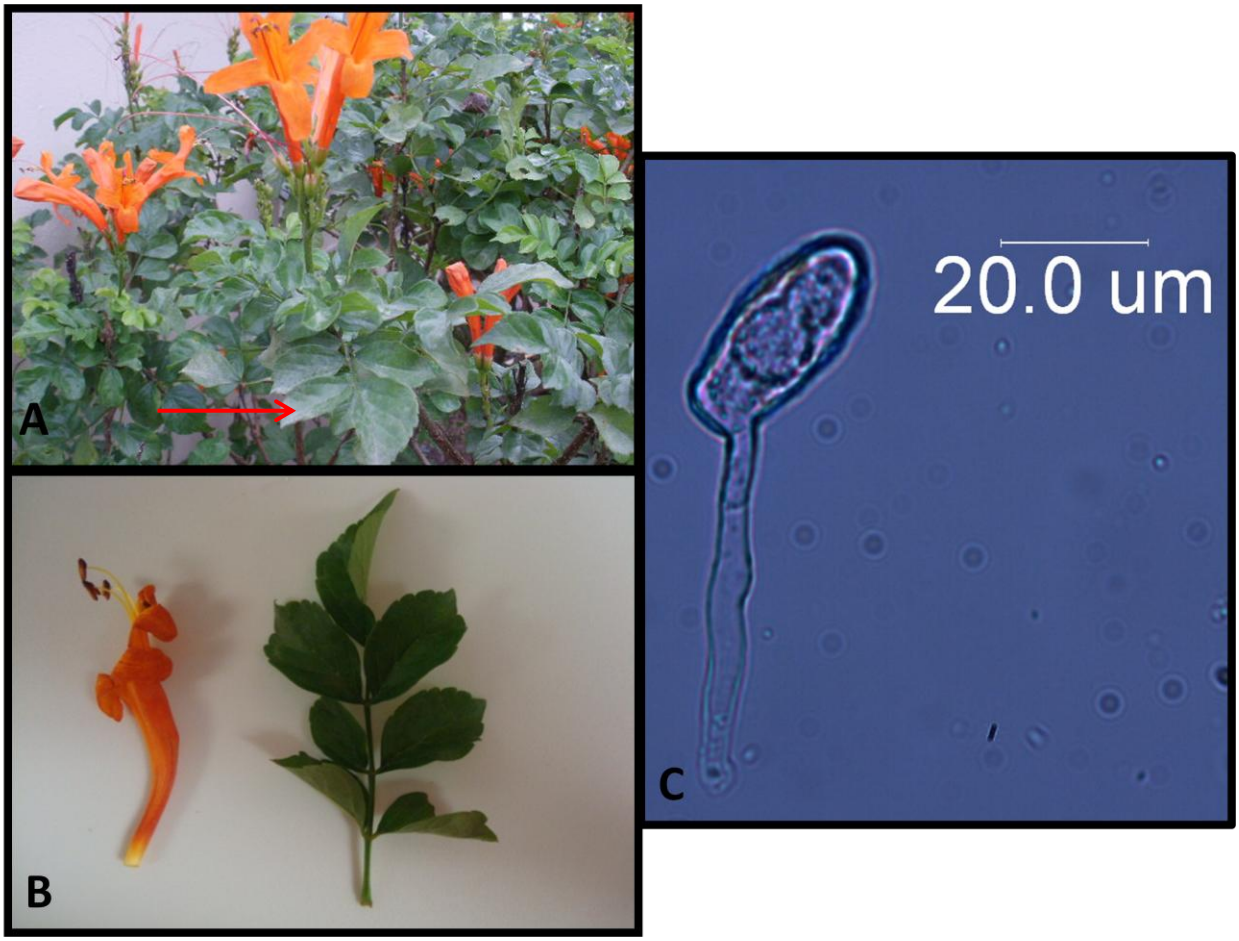


Figura 25. *Erysiphe peruviana* en *Tecomaria capensis*. (A) Arbusto donde se observa la presencia del patógeno en hojas nuevas. (B) Flor y hojas maduras. (C) Conidia madura presentando tubo germinativo sub-terminal moderadamente largo sin apresorio (40x).

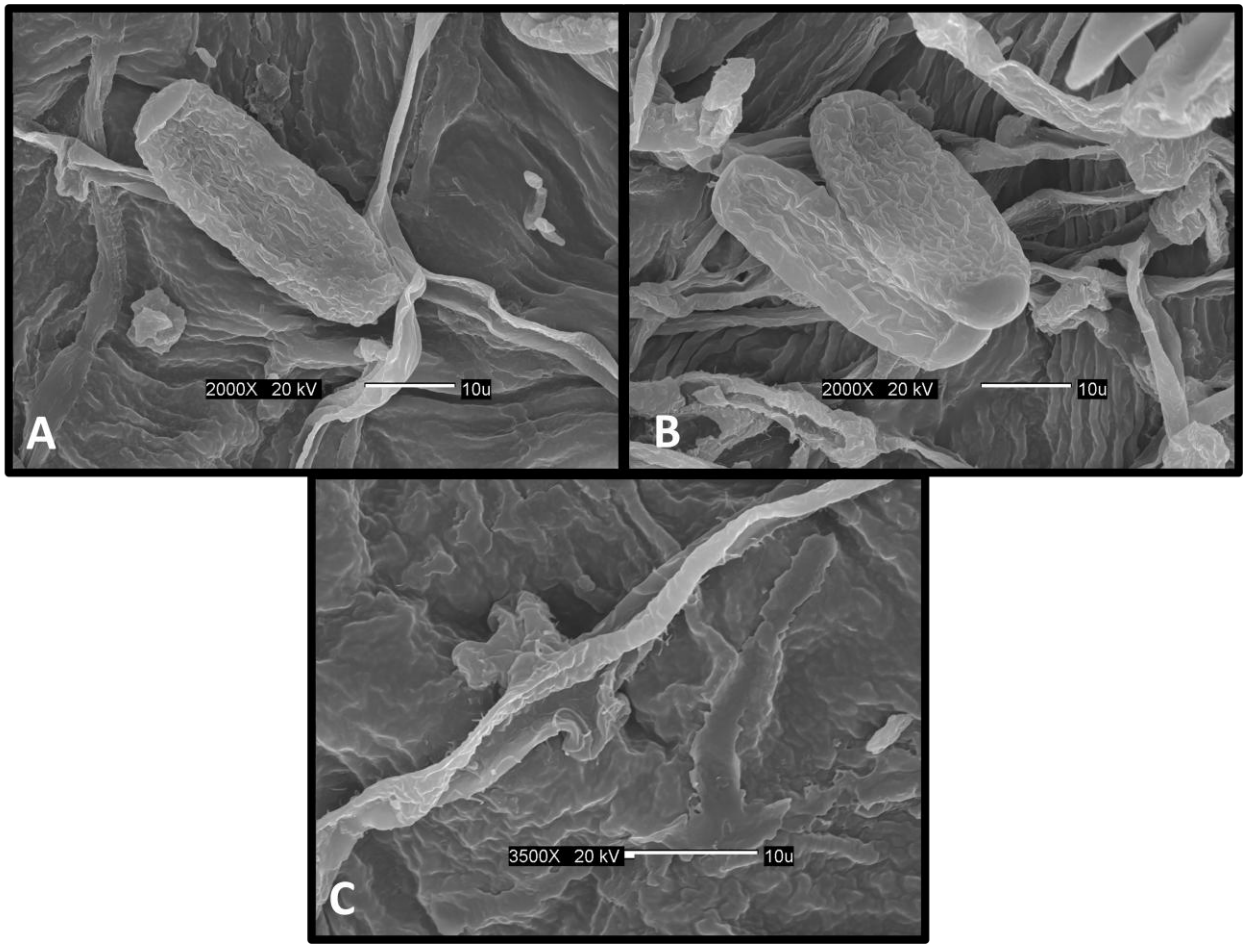


Figura 26. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe peruviana*. (A) y (B) Conidias maduras de *E. peruviana*, se observan los lados terminales fibrilares y la superficie de la conidia rugosa (2000X). (C) Apresorio lobulado (3500X).

4.1.14 Bruja *(Kalanchoe blossfeldiana)*- Es una planta de uso medicinal y también utilizada en áreas de ornato; pertenece a la familia de las *Crassulaceae*. Se recolectaron muestras en los pueblos de Mayagüez y Villalba. En ambos lugares la planta mostró alta severidad en gran parte del año. La infección se observó en los bordes, haz y envés de la hoja (Fig. 27). Las conidias no presentaron cuerpos de fibrosina, se observó la presencia de conidióforos simples, con célula basal recta y apresorio lobulado a multilobulado y germinación tipo *Reticuloidium* (=Cichoracearum) (Cuadro18; Fig 27). Con la microscopía electrónica de rastreo se observaron los apresorios lobulados a multilobulados en hifas además de la superficie lisa de la conidia (Fig. 28). Estas características morfológicas se asemejan a *O. calanchoeae.*

Cuadro 18. Observaciones morfológicas de *Oidium calanchoeae*

Micelio: externo	Forma de la conidia: ovoide
Apresorio: lobulado a multilobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): 85.11
Largo de la célula basal (µm): 35-40	Ancho del conidióforo (µm): 9.30
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): lisa
Conidiogénesis: conidióforo simple	Superficie conidia (SEM): lisa
Tubo germinativo: lateral (terminal)	Medición conidia (µm): 36.7 x 16.2

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L9

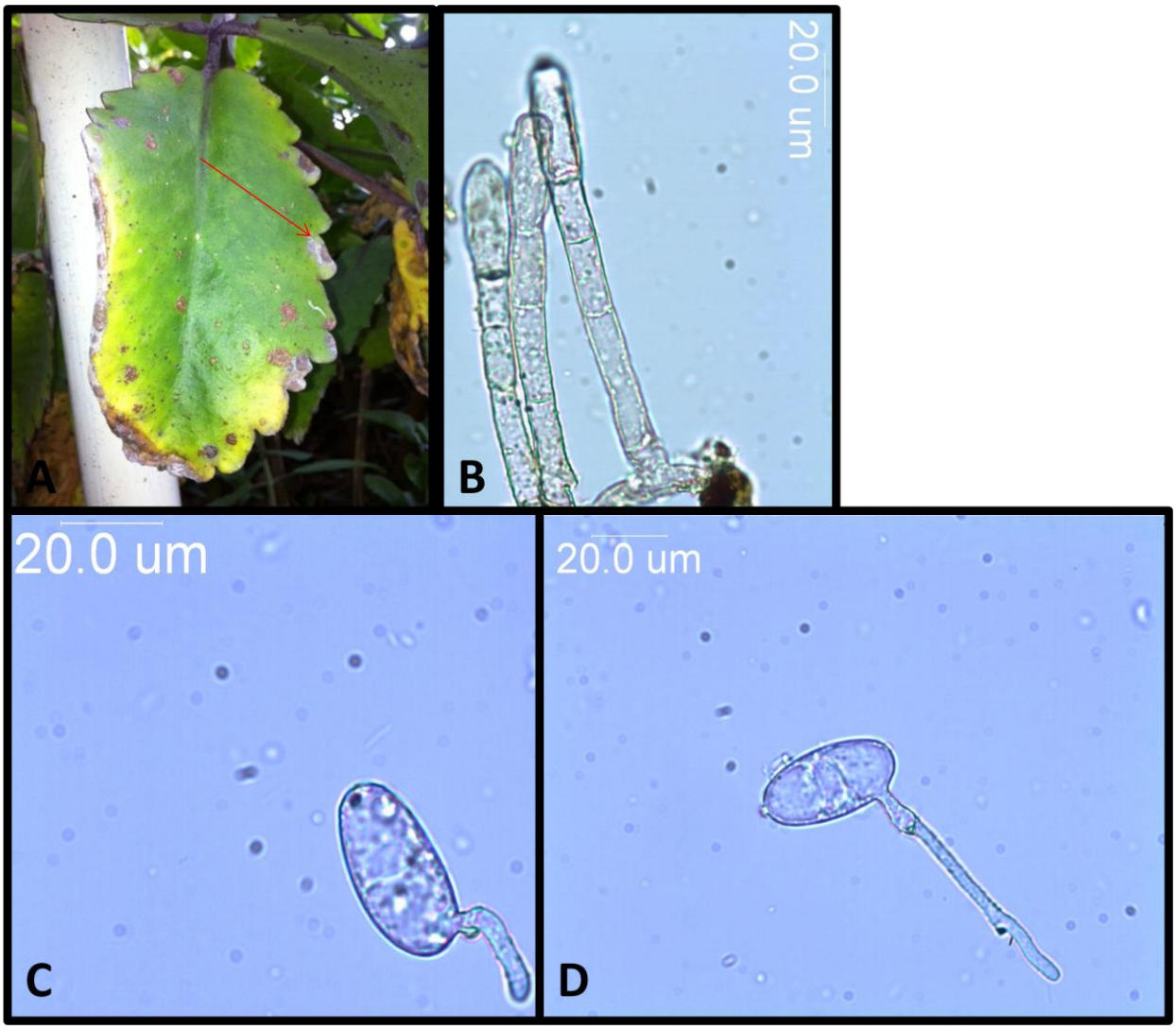


Figura 27. *Oidium calanchoeae* en bruja *Kalanchoe blossfeldiana*. (A) Incidencia de añublo polvoriento en hojas maduras. (B) Conidióforos en cadenas simples con célula basal recta. (C) Germinación de la conidia por el extremo lateral-subterminal (4horas) (40x). (D) Germinación sin apresorio al final de tubo germinativo (12 horas) (40x).

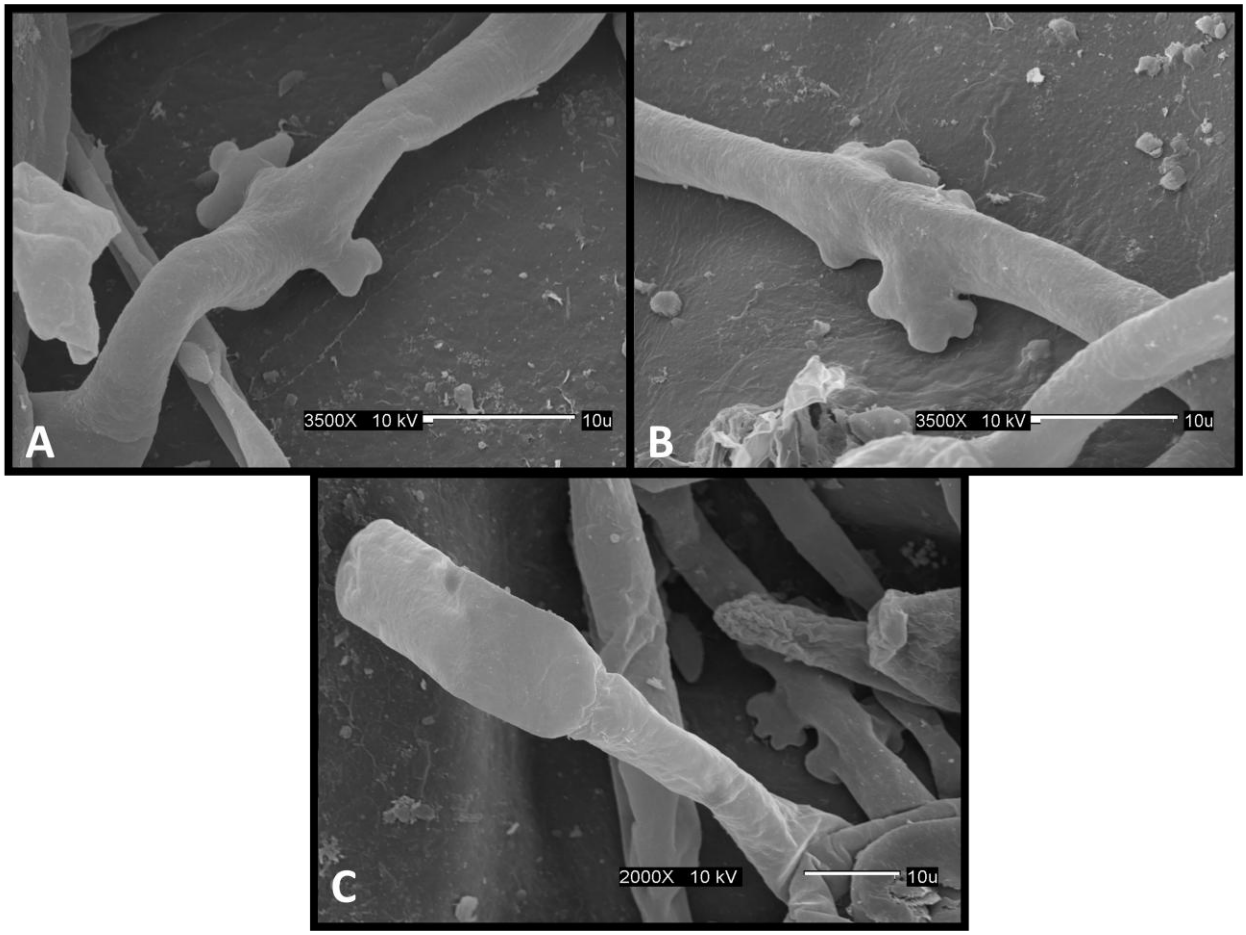


Figura 28. Microscopía electrónica de rastreo de *Oidium calanchoeae*. (A) y (B) Apresorio lobulado a multiloblado en la hifa sobre la superficie del hospedero (3500X). (C) Conidia madura pegada al conidióforo, donde se observa una superficie lisa (2000X).

4.1.15 Begonia *(Begonia multinervia)* - Comúnmente conocida como begonia silvestre. Fue recolectada en un vivero del pueblo de Aibonito donde fue encontrada como "maleza" en tiestos listos para la venta. Se identificó a *Erysiphe begoniicola* como el agente causal del añublo polvoriento en la begonia. El tubo germinativo se observó corto sin apresorio al final, se desarrolló en la parte terminal y su desarrollo fue relativamente rápido (5 horas) tipo *Pseudoidium* (=Polygoni) (Fig. 29). Las conidias midieron aproximadamente 51.47 x 20.64 µm, no presentaron cuerpos de fibrosina y los conidióforos se observaron simples tipo *Pseudoidium* (Fig. 30). No se observó el estado sexual del patógeno.

Cuadro 19. Observaciones morfológicas de *Erysiphe begoniicola*

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndricas
Apresorio: lobulado a multilobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: base recta	Largo del conidióforo (µm): --
Largo de la célula basal (µm): 33.6 - 44.8	Ancho del conidióforo (µm): --
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidias simples	Superficie conidia (SEM): rugosa
Tubo germinativo: corto sin apresorio	Medición conidia (µm): 51.47 x 20.64

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L10

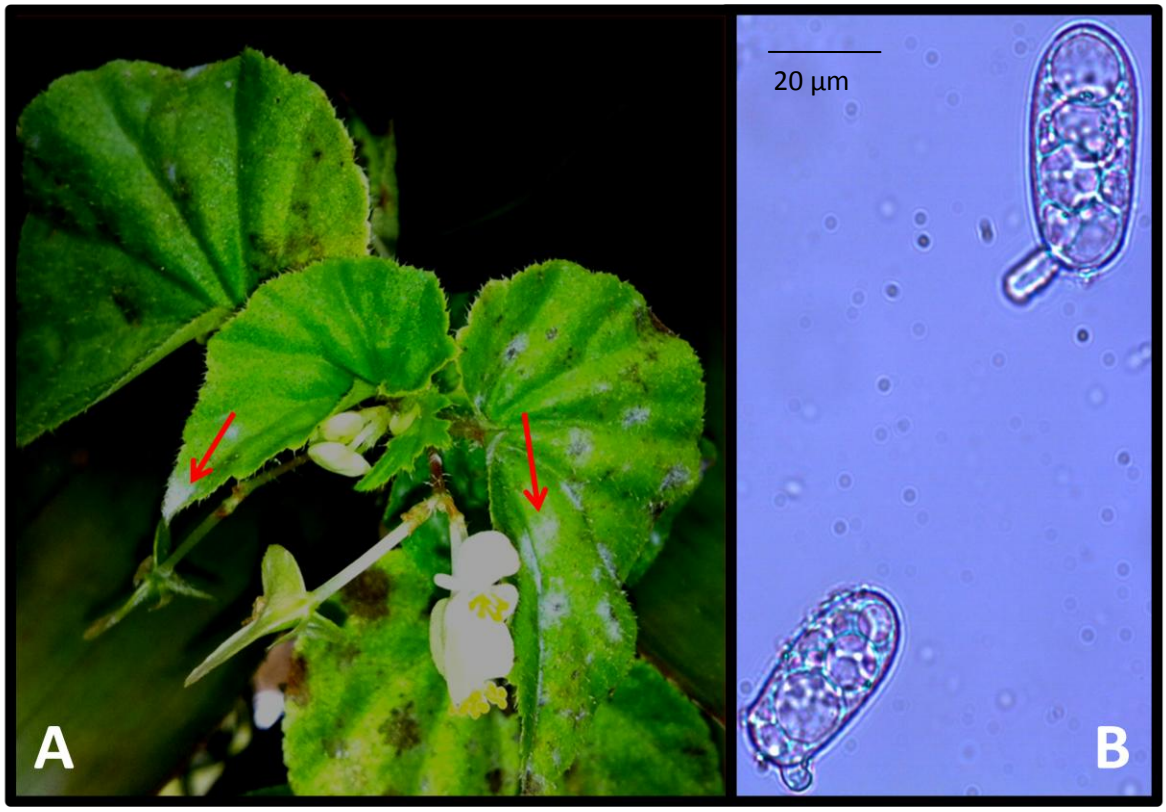


Figura 29. *Erysiphe begoniicola* en begonia (*Begonia multinervia*). (A) Sintomatología de añublo polvoriento en la begonia silvestre. (B) Germinación tipo *Pseudoidium* (=Polygoni), tubo germinativo corto sin apresorio. El desarrollo del tubo germinativo se observa en los lados sub-terminales de las conidias maduras.

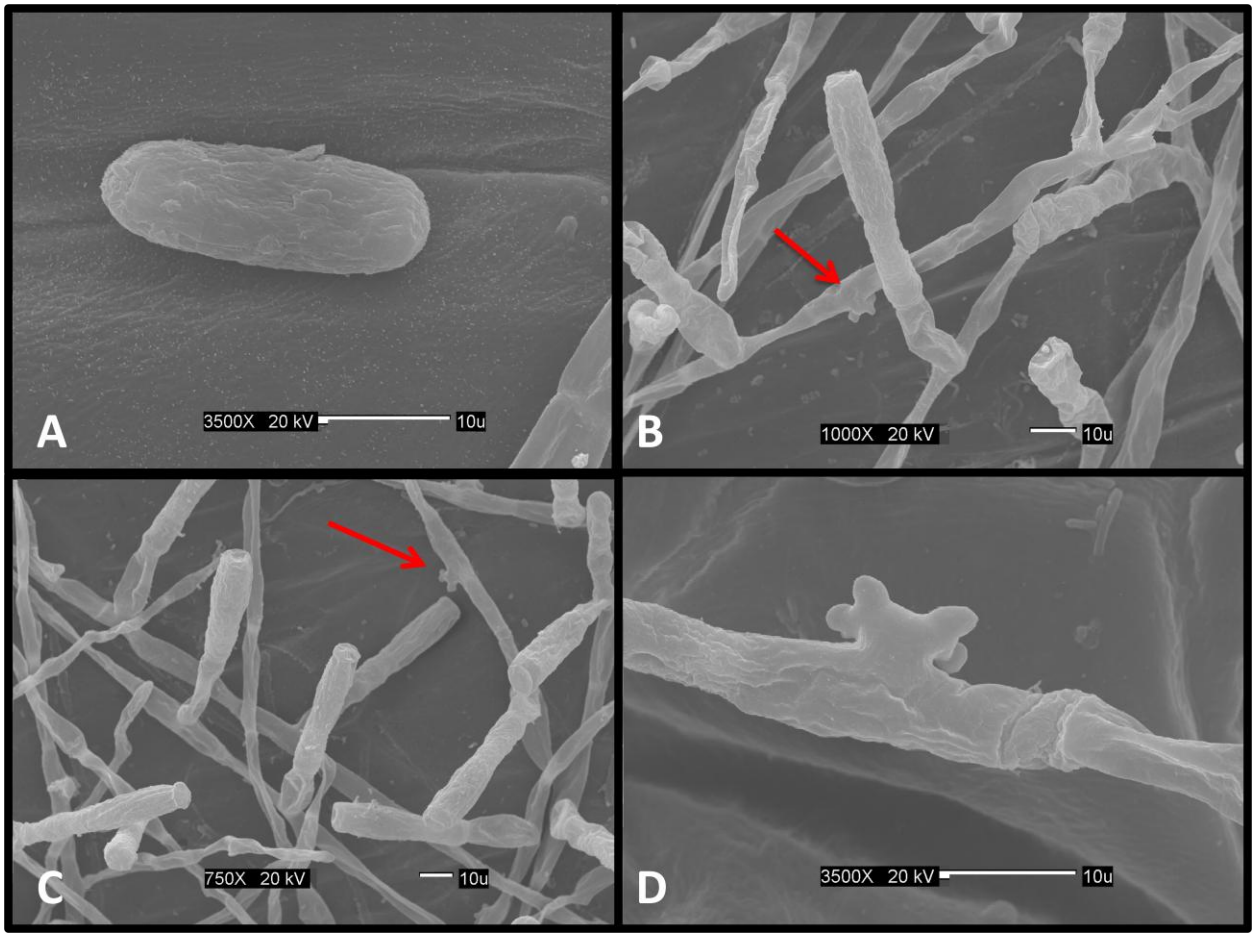


Figura 30. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe begoniicola* (A) Conidia madura, donde se observa la conidia con superficie arrugada (3500X). (B) Conidióforos rectos y cortos, apresorio multilobulado en la hifa sobre la superficie del hospedero (3500X). (C) Conidióforos típicos de un *Pseudoidium* y apresorio lobulado (750X). (D) Apresorio multilobulado en la hifa (3500X).

4.1.16 ***Torenia fournieri*** – Es una planta anual, comúnmente conocida como “payasito”. Recolectada en un vivero del pueblo de Aibonito. Muchas de las ornamentales presentes en el vivero son importadas de Estados Unidos específicamente de California. La severidad de la enfermedad fue alta. Se observó la presencia de micelio externo con apresorio lobulado, cuerpos de fibrosina presentes en conidias, germinación tipo Pannosa (=*Fribroidium*) y conidióforos en cadenas con célula basal recta (Fig. 31). Al realizar la microscopía electrónica de rastreo se observó la superficie de la conidia ondulada y extremos laterales arrugados con septo (Fig. 32). Se identificó a *Podoshaera* sp. como el agente causal de añublo polvoriento.

Cuadro 20. Observaciones morfológicas de *Podosphaera* sp.

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: indistinto	Cuerpos de fibrosina: presentes
Morfología de la célula basal: recta	Largo del conidióforo (µm): 116.30
Largo de la célula basal (µm): --	Ancho del conidióforo (µm): 12.35
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): arrugado
Conidiogénesis: conidias en cadenas	Superficie conidia (SEM): ondeado
Tubo germinativo: lateral relativamente largo	Medición conidia (µm): 36.22 x 18.95

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L11

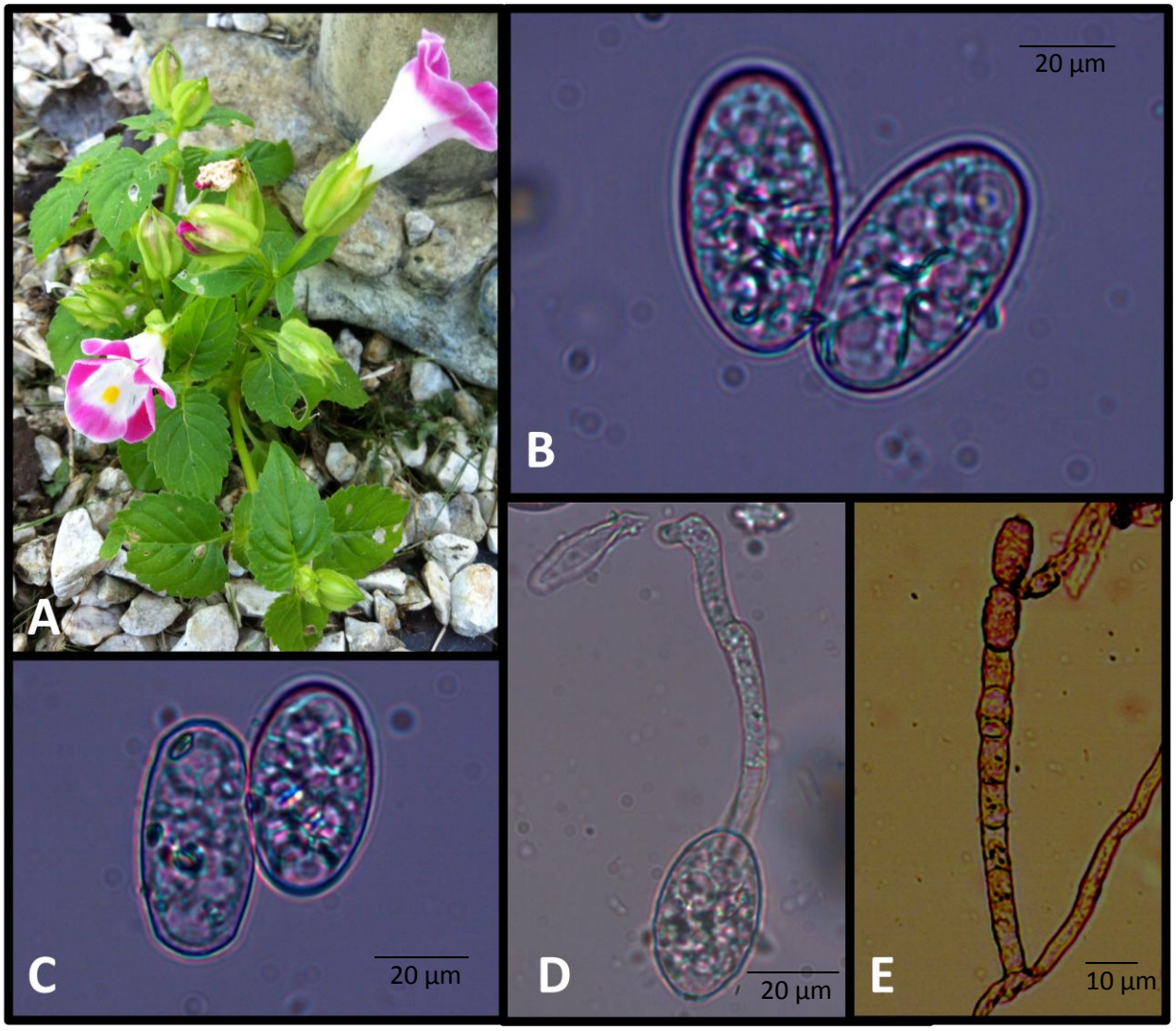


Figura 31. *Podosphaera* sp. en payasito (*Torenia fournieri*). (A) Planta sintomática (B) y (C) Conidias maduras con cuerpos de fibrosina (40x). (C) Conidia germinada por el extremo lateral sin apresorio conspicuo tipo Pannosa (=*Fribroidium*) (40x). (E) Conidióforo en cadena típico de *Podosphaera* sp. (10x).

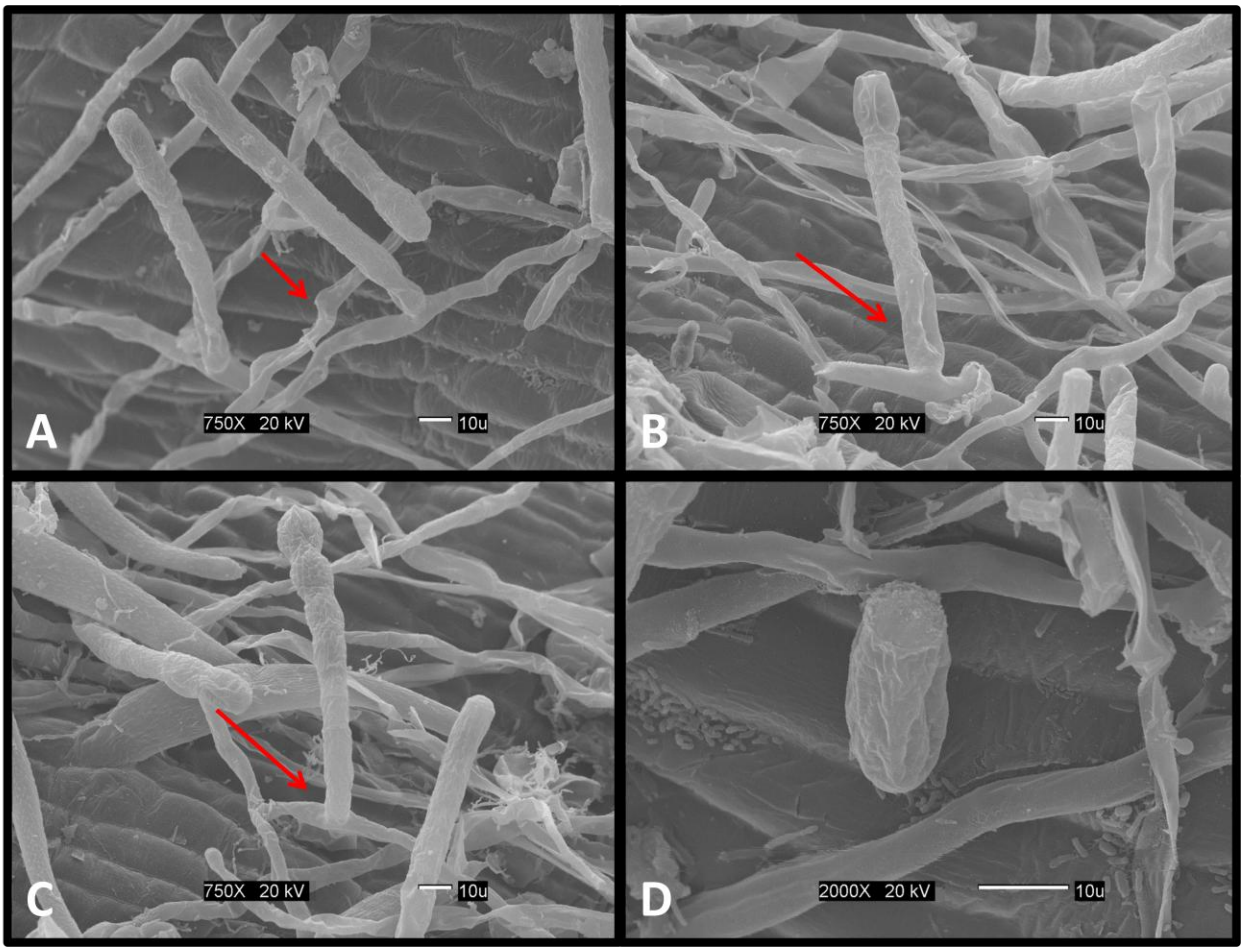


Figura 32. Microscopía electrónica de rastreo para *Podosphaera* sp. (A) Conidióforos en cadena típico de la tribu Cystotheceae y apresorio indistinto en micelio epifito (750X). (B) y (C) Conidióforos en cadena de *Podosphaera* sp. (750X). (D) Conidia cilíndrica madura (3500X).

4.1.17 Oxalis *(Oxalis barrelieri)* – Es una maleza perteneciente a la familia Oxalidaceae. Fue encontrada en todos los pueblos muestreados. Es muy susceptible al desarrollo de añublo polvoriento y siempre presentó alta severidad (Fig. 32). La conidia presenta una forma irregular, alargada y subtruncada en los dos extremos. Se observó la presencia de micelio externo con apresorio lobulado, conidióforos con célula basal curva (> 45.0 µm) y conidiogénesis simple (Cuadro 21). Las conidias no presentaron cuerpos de fibrosina. Se observó una germinación tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*) (Fig. 33). Estas características morfológicas se asemejan a *E. russelli.*

Cuadro 21. Observaciones morfológicas de *Erysiphe russellii*

Micelio: externo	Forma de la conidia: elipsoidales
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: curva	Largo del conidióforo (µm): 120-140
Largo de la célula basal (µm): > 45	Ancho del conidióforo (µm): 6.54
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilares
Conidiogénesis: conidióforo simple	Superficie conidia (SEM): ondeada
Tubo germinativo: terminal relativamente largo con apresorio lobulado	Medición conidia (µm): 32.23 x 12.5

Herbario: L12

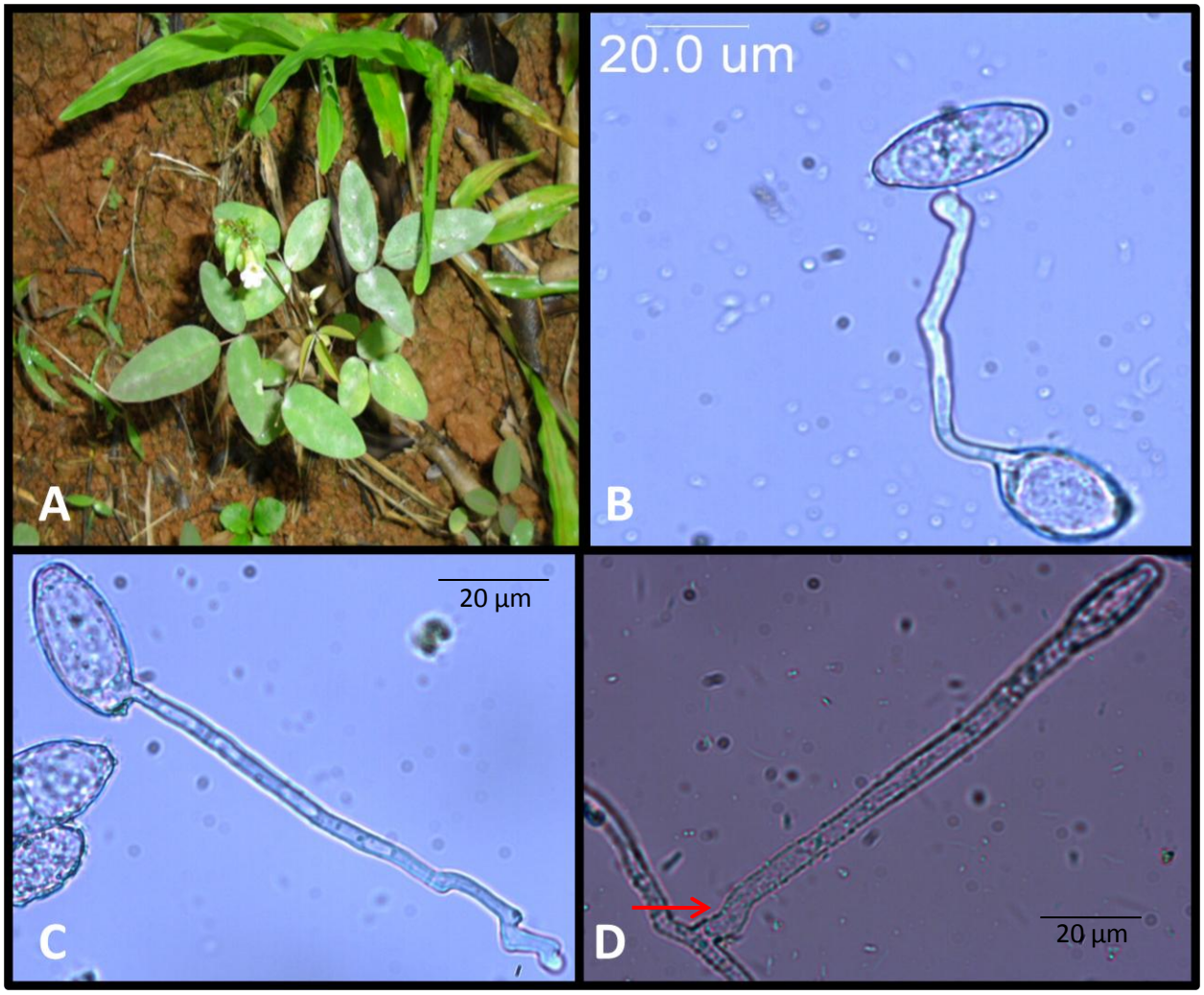


Figura 33. *Erysiphe russellii* en oxalis (*Oxalis barrelieri*). (A) Planta infectada con añublo polvoriento. (B) y (C) Tipo de germinación Cichoracearum (=*Reticuloidium*) el cual presenta tubo germinativo terminal o en ocasiones un poco lateral, su tamaño va de corto a moderadamente largo con apresorio bifurcado (40x). (D) Conidióforo de *E. russellii* con célula basal curva (40x).

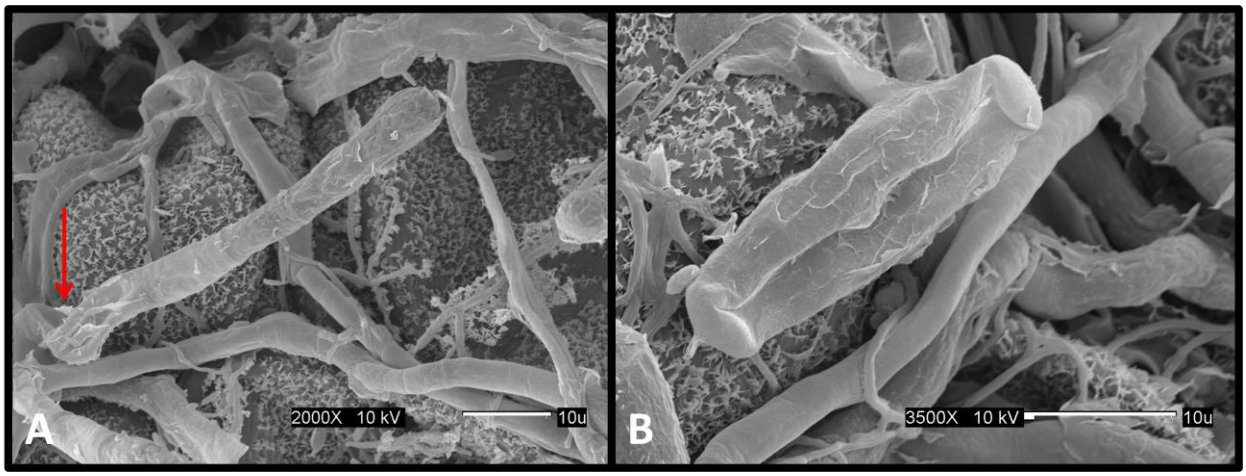


Figura 34. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe russellii*. (A) Conidióforo con célula basal curva (2000X). (B) Conidia con lados terminales fibrilares y superficie levemente rugosa (3500X).

4.1.18 Leche vana *(Euphorbia heterophylla)* - La misma fue colectada aledaña a un vivero en el pueblo de Aibonito. Al igual que muchas otras malezas, la "leche vana" es muy común observarla con presencia de añublo polvoriento en los meses más frescos (Fig. 35). Se observó micelio externo con apresorio lobulado, célula basal curva, conidióforos simples tipo *Pseudoidium* (54.23 x 6.32 µm), conidias cilíndricas con tubo germinativo terminal relativamente largo y sin cuerpos de fibrosina (Cuadro, 22; Fig. 35). En la microscopía electrónica de rastreo se observó la superficie arrudaga y lados terminales fibrilares (Fig. 36).

Cuadro 22. Observaciones morfológicas de *Oidium poinsettiae*

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: lobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: curveada	Largo del conidióforo (µm): 54.23
Largo de la célula basal (µm): --	Ancho del conidióforo (µm): 6.32
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidias simples	Superficie conidia (SEM): arrugada
Tubo germinativo: terminal moderadamente largo	Medición conidia (µm): 38.1 x 12.8

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L13

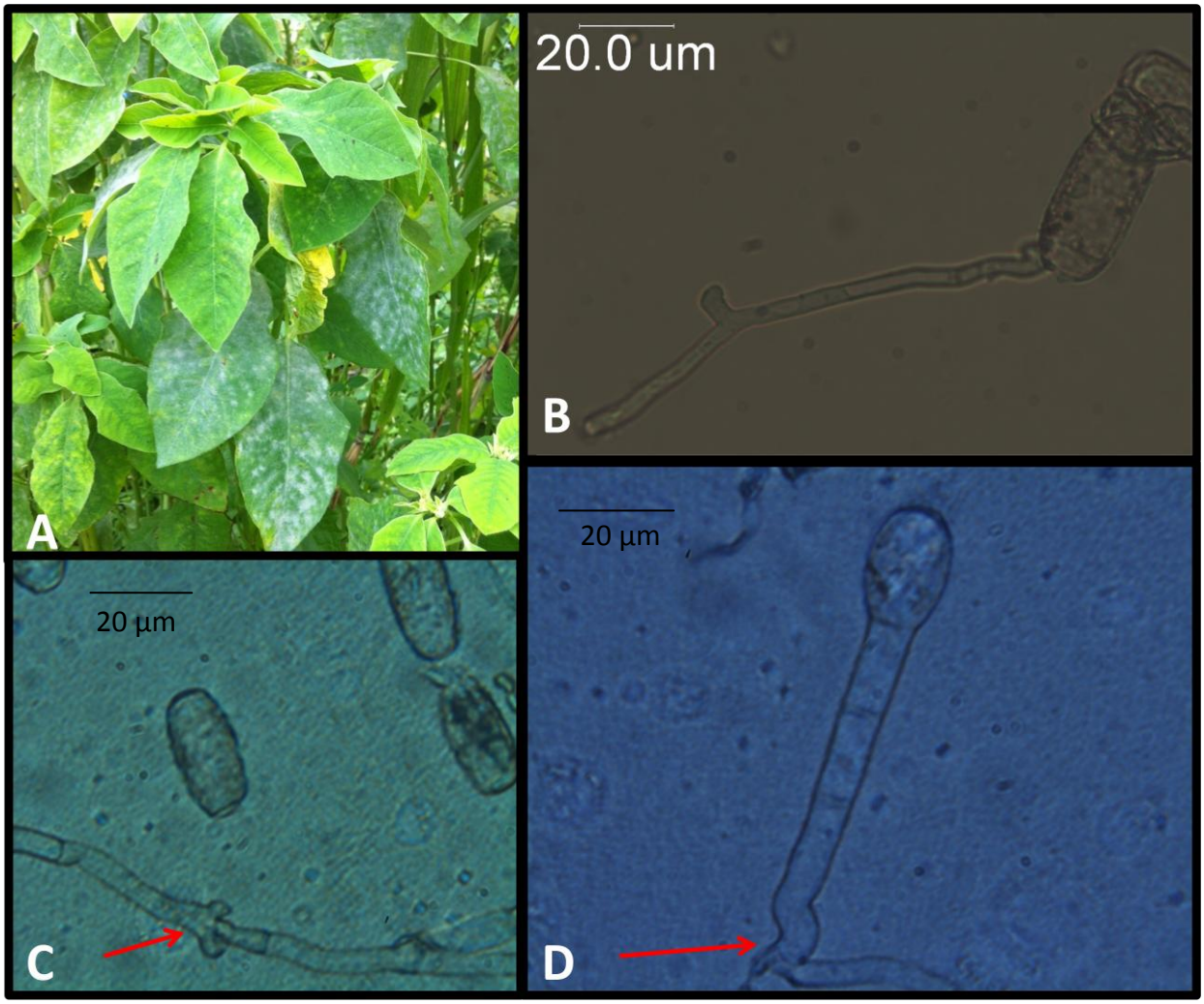


Figura 35. *Oidium poinsettiae* en leche vana (*Euphorbia heterophylla*). (A) Planta con alta severidad de añublo polvoriento. (B) Conidia cilíndrica con germinación terminal-lateral (40x). (C) Apresorio lobulado en hifa (40x). (D) Conidióforo tipo Pseudoidium con célula basal curva (40x).

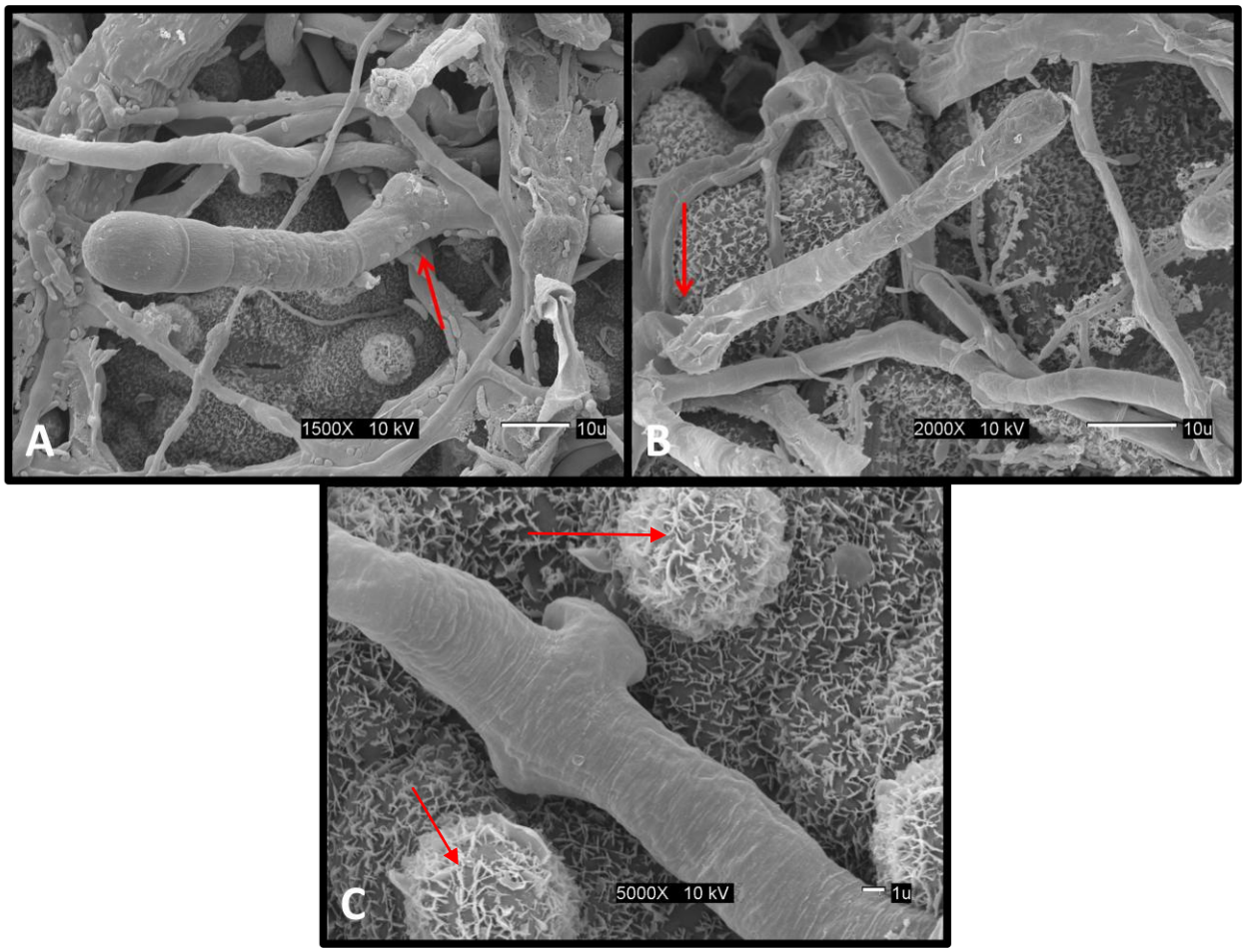


Figura 36. Microscopía electrónica de rastreo para *Oidium poinsettiae*. (A) y (B) Conidióforos con célula basal curva (2000X). (C) Apresorio lobulado en la hifa, además se pueden observar cuerpos o glándulas lactíferas del hospedero (5000X).

4.1.19 Yerba socialista *(Sonchus oleraceus* L.) – Esta maleza fue encontrada en un vivero de pascuas en el pueblo de Aibonito. Se observó una alta severidad tanto en la yerba socialista como en la pascua (Fig. 37). Al realizar la microscopía de luz se comprobó que no es similar al añublo polvoriento que afecta la pascua. Se observó la presencia de micelio externo con apresorio apezonado en las hifas, conidias cilíndricas de aproximadamente 34.89 x 16.23 µm sin cuerpos de fibrosina y tubo germinativo subterminal corto sin apresorio (Cuadro 23). Presentó conidióforos en cadenas cortas que midieron 123.59 µm x 7.45 µm. En la microscopia electrónica de rastreo se observó la superficie de la conidia arrugada y partes terminales fibrilares (Fig. 38).

Cuadro 23. Observaciones morfológicas de *Golovinomyces cichoracearum*

Micelio: externo	Forma de la conidia: cilíndrica
Apresorio: apezonado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: recta	Largo del conidióforo (µm): 123.59
Largo de la célula basal (µm): --	Ancho del conidióforo (µm): 7.45
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): fibrilar
Conidiogénesis: conidias en cadenas	Superficie conidia (SEM): arrugada
Tubo germinativo: subterminal corto	Medición conidia (µm): 34.89 x 16.23

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L14

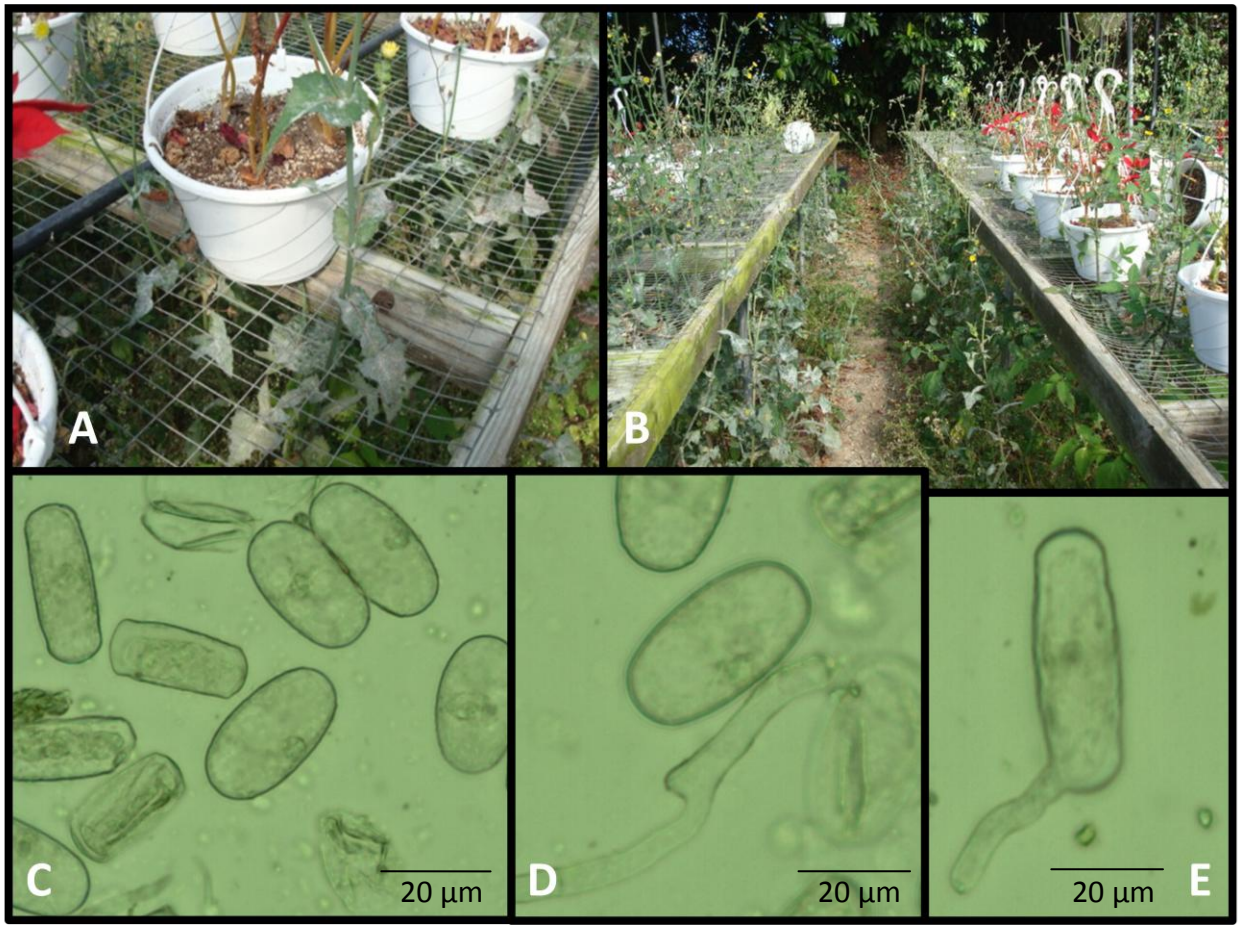


Figura 37. *Golovinomyces cichoracearum* en *Sonchus oleraceus*. (A) Vivero de pascuas en Aibonito. (B) Se puede observar la presencia de la maleza *Sonchus oleraceus* L. debajo de los bancos y en algunos casos entrelazada en la planta de pascua. (C) Conidias de *G. cichoracearum* con microscopia de luz (40x). (D) Apresorio apezonado en hifa (40x). (E) Germinación tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*), tubo germinativo corto sin apresorio (40x).

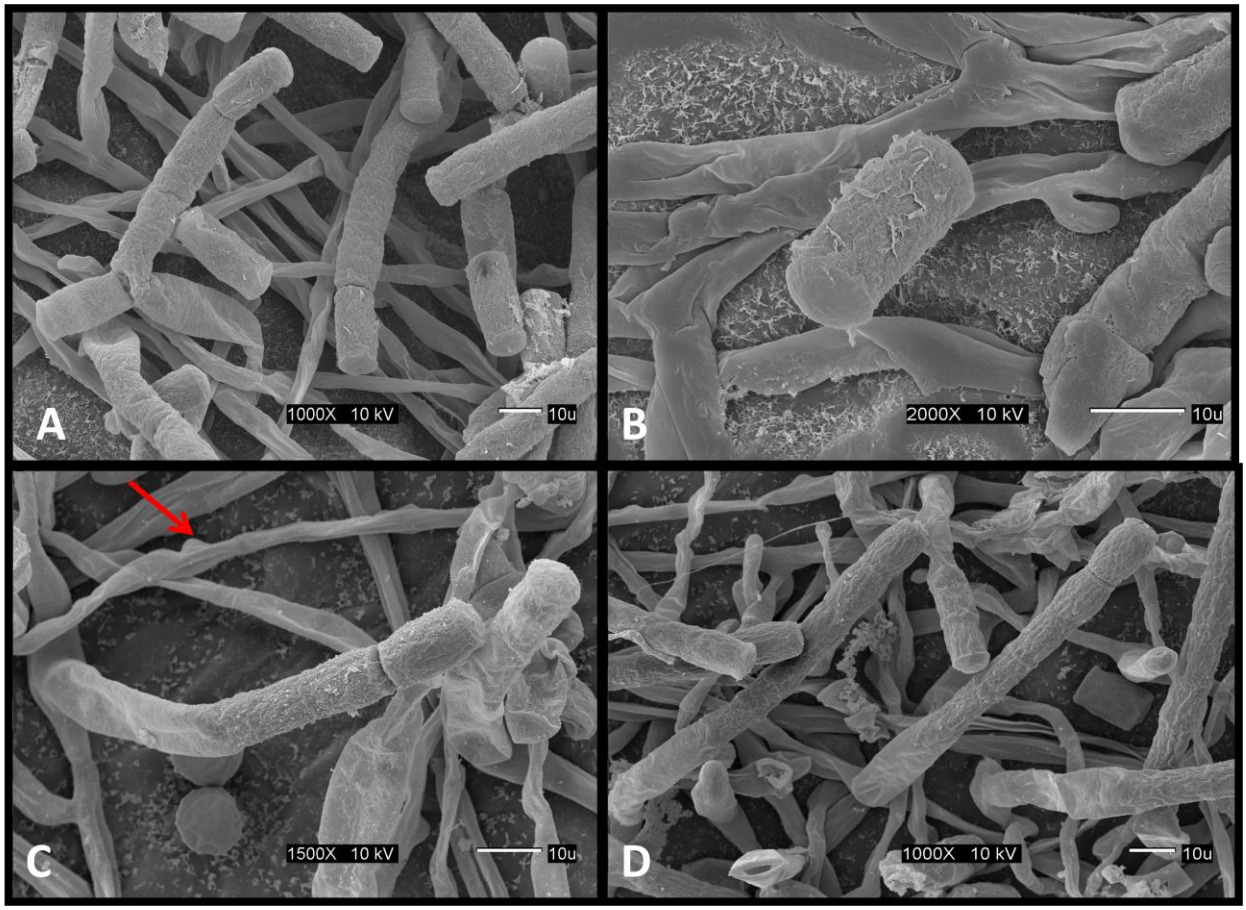


Figura 38. Microscopía electrónica de rastreo para *Golovinomyces cichoracearum* (A) y (D) Conidióforos de maduros de *G. cichoracearum* en cadenas (1000X). (B) Conidia madura donde se observa lados terminales fibrilares y superficie rugosa (2000X). (C) Conidióforo típico de la tribu Golovinomyceteae además se observa un apresorio apezonado (papilado) en la hifa (1500X).

4.1.20 Recao *(Eryngium foetidium)* – Es utilizado para condimentar en las comidas. Se observó añublo polvoriento en los pueblos de Mayagüez y Aibonito. Se comenzó a observar los primeros síntomas del añublo polvoriento en hojas, el cual consistió de manchas cloróticas seguido por necrosis. Se observó la presencia de conidióforos simples sobre la superficie foliar, conidias elipsoidales sin cuerpos de fibrosina, apresorios lobulados a multilobulados y germinación tipo *Pseudoidium* (=Polygoni) con tubo germinativo terminal y bifurcado al final (Fig. 39; Cuadro 24). Mediante la microscopía electrónica de rastreo se observaron los apresorios lobulados a multilobulados y la superficie arrugada de la conidia además de lados terminales rugosos (Fig. 40).

Cuadro 24. Observaciones morfológicas de *Erysiphe pisi*

Micelio: externo	Forma de la conidia: elipsoidal
Apresorio: lobulado a multilobulado	Cuerpos de fibrosina: ausentes
Morfología de la célula basal: recta	Largo del conidióforo (µm): 85.13
Largo de la célula basal (µm): --	Ancho del conidióforo (µm): 8.34
Tipo de conidia: monomórfica	Superficie lateral conidia (SEM): rugosa
Conidiogénesis: conidióforo simple	Superficie conidia (SEM): arrugada
Tubo germinativo: corto	Medición conidia (µm): 70.93 x 24.44

--- No se observó la morfología o desarrollo del tubo germinativo.

Herbario: L15

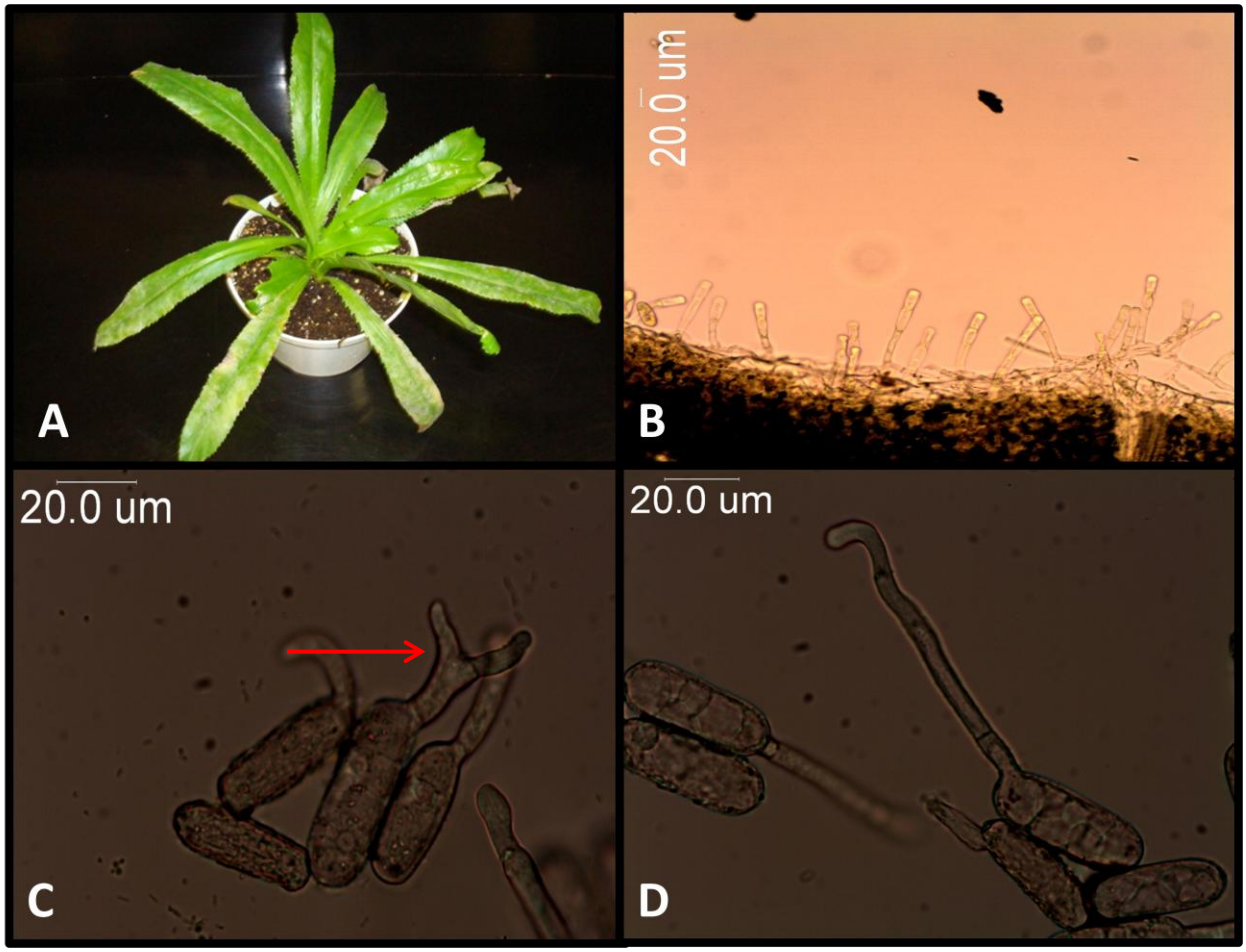


Figura 39. *Erysiphe pisi* en recao (*Eryngium foetidium*). (A) Planta infectada de añublo polvoriento mayormente en hojas maduras. (B) Corte de tejido donde se observan los conidióforos simples (10x). (C) Conidia con germinación bifurcada (40x). (D) Conidias germinadas donde se observa la germinación por lados terminales (40x).

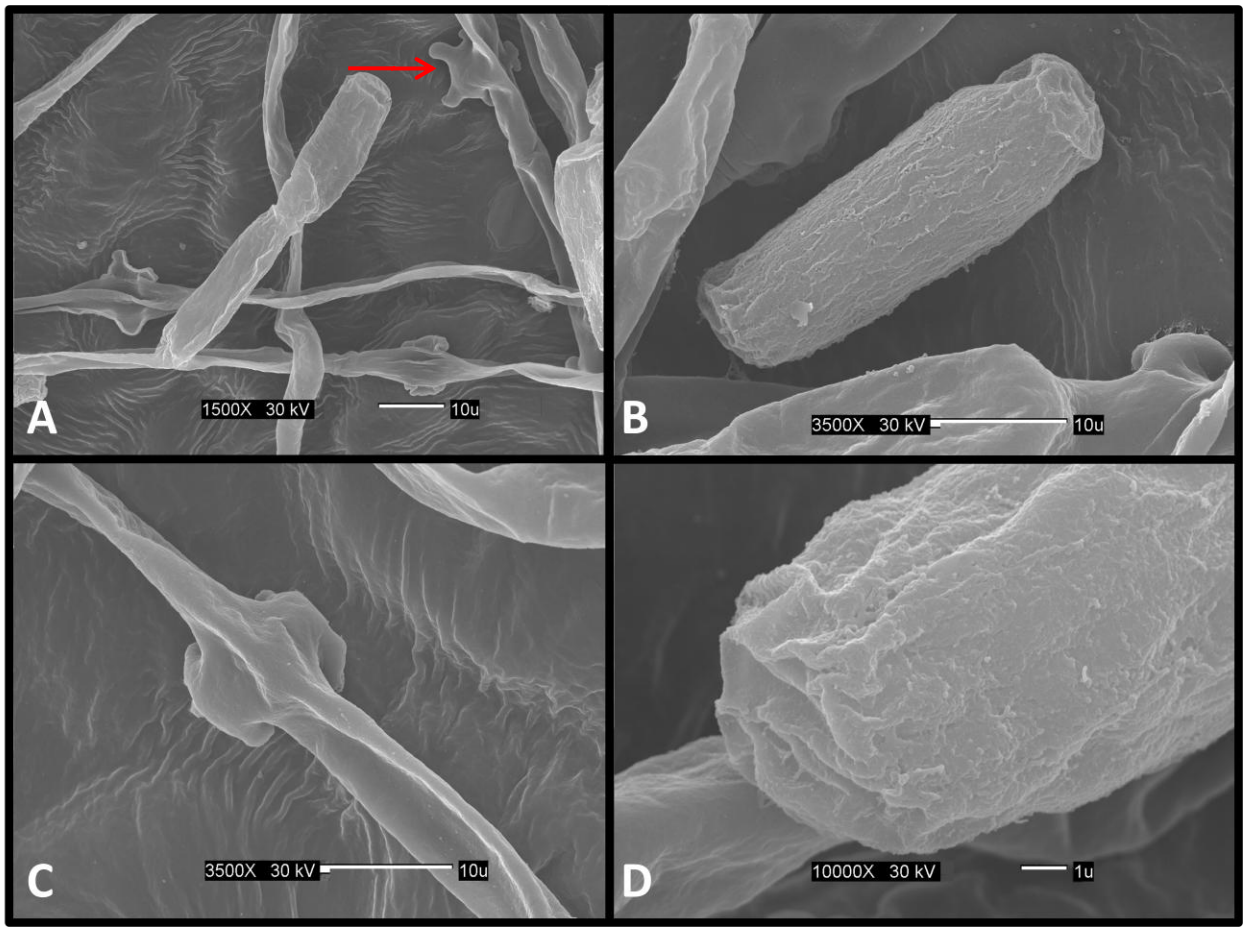


Figura 40. Microscopía electrónica de rastreo para *Erysiphe pisi*. (A) Conidióforo corto típico de *E. pisi* (1500X). (B) Conidia donde se observa la superficie arrugada (3500X). (C) Apresorio lobulado a multilobulado en hifa (3500X). (D) Lado terminal de la conidia fibrilar (10000X).

4.2 Identificación molecular de añublos polvorientos

Se identificaron molecularmente cuatro aislados de añublos polvorientos mediante la amplificación y secuenciación de la región espaciadora de transcripción interna del ADN ribosomal (ITS del rADN). Los aislados identificados como *Erysiphe* y *Podosphaera* fueron identificados utilizando los cebadores ITS1 e ITS4. Las especies identificadas mediante el análisis molecular se encuentran en el cuadro 25.

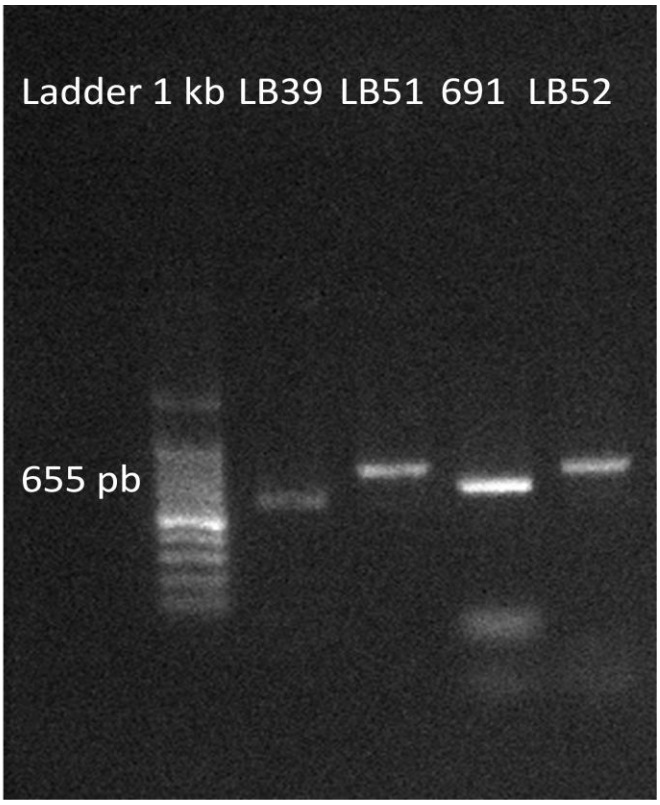


Figura 41. Gel de agarosa del producto de PCR de la región ITS del ADNr utilizando los primers ITS1/ITS4. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; segunda fosa aislado LB39 de *Podosphaera pannosa*; tercera fosa aislado LB51 de *Podosphaera fusca*; cuarta fosa aislado 691 de *Ery siphe pisi*; quinta fosa aislado LB52 de *Erysiphe australiana*.

Cuadro 25. Identificación molecular de añublos polvorientos utilizando la secuenciación de la ITS del rADN y el programa BLAST.

Muestra	Identificación en BLAST	% Homología	% Cobertura	Número de bases idénticas	Número de bases diferentes
LB51	*Podosphaera fusca*	99	96	514/517	3/517
LB39	*Podosphaera pannosa*	100	100	0/536	1/536
LB52	*Erysiphe australiana*	97	100	557/560	3/560
691	*Erysiphe pisi*	97	100	502/514	5/514

4.3 Filogenia

Estudio filogenético de los añublos polvorientos (*Erysiphales: Erysiphaceae*) afectando a plantas ornamentales y aromáticas en Puerto Rico. Los aislados se compararon con secuencias del GeneBank (Cuadro 4).

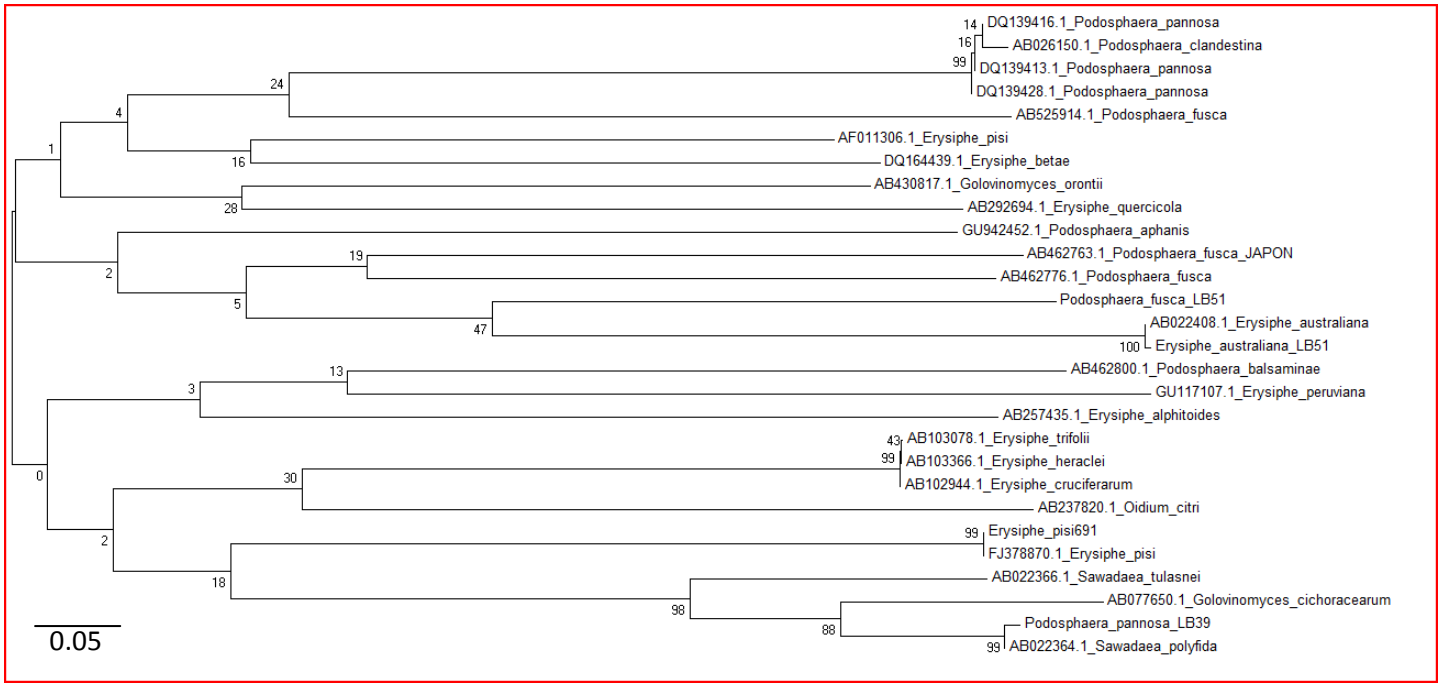


Figura 42. Árbol filogenético generado por el método neigbor-joining de secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de diferentes especies de añublos polvorientos (Orden Erysiphales). Se utilizó un parámetro de bootstraps con 1000 repeticiones.

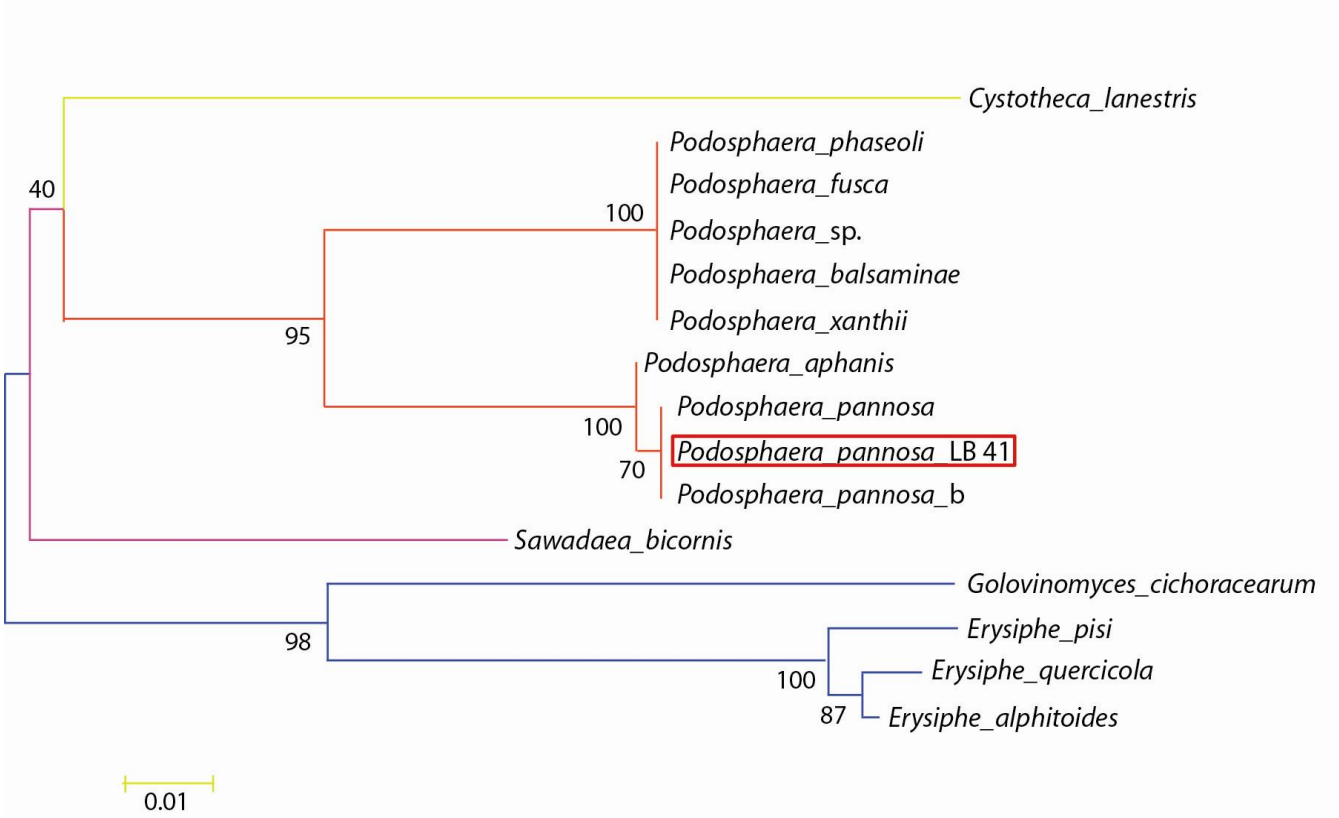


Figura 43. Árbol filogenético generado por el método de Maximun Likelihood Tree con secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de diferentes especies de añublos polvorientos (Orden Erysiphaes). Se utilizó un parámetro de bootstraps con 1000 repeticiones.

5.0 DISCUSIÓN

5.1 Caracterización morfológica

5.1.1. Erysiphe australiana

Las observaciones morfológicas realizadas concuerdan con las reportadas anteriormente en *Lagerstroemia indica* (Shi, 2006). La infección se observó en la mayor parte del año; la infección primaria se observó en hojas y brotes nuevos. En el mes de enero se observó micelio blanco sobre el tejido foliar, con abundante esporulación en hojas y en tallos poco lignificados. En brotes nuevos con alta severidad se observó tejido distorsionado y necrótico. En el 2006, Shi reportó que el patógeno sobrevive en los brotes dormantes. En las muestras colectadas se observó micelio septado, ramificado, hialino con apresorio lobulado. Conidióforos epifitos, producidos del micelio externo. Conidias cilíndricas a elipsoidales, 35.23 x 17.12 µm, conidias producidas en forma simple y con presencia de tubo germinativo tipo Cichoracearum (= *Reticuloidium*) (Fig.2). Mediante microscopía electrónica de rastreo se pudo observar la superficie y lado lateral de la conidia teniendo ésta una superficie estriada y lados terminales fibrilares lo cual concuerda con lo reportado por Cook (1997) y Braun *et al*. (2002). Ésta constituye una de las características más importantes en la identificación morfológica de la especie, identificándose a *Erysiphe australiana* como el agente causal de la enfermedad. Este patógeno ha sido reportado en el sureste de los Estados Unidos, China, Japón y Australia (Shi, 2006).

Para la identificación molecular se realizó PCR, el cual amplificó bandas de 674 bp para la ITS1/ITS4 y 665 para ITS1-F/ITS4. Los análisis en BLAST de la secuenciación del producto de PCR mostró un 93 % de similaridad para *E. australiana.* Esta especie se ha reportado en

Argentina, Venezuela y Brazil afectando a *Lagerstroemia indica* (Liberato, 2004; WSU, Erysiphales Database). También se ha reportado en Tennessee y Washington (Estados Unidos) (Shi, 2006). Este reporte confirma la identificación morfológica previamente realizada por Torres y Rivera-Vargas (2008).

5.1.2 Podosphaera fusca

La margarita africana (*Gerbera jamesonii*) una ornamental de importancia económica en Europa y Estados Unidos (Troisi, 2010) y comercializada en Puerto Rico. La planta es afectada por añublo polvoriento en hojas, tallos e inflorescencias. Se observó presencia de micelio y conidias hialinas, elipsoidales en cadenas de hasta seis conidias (Fig. 4) con un tamaño de conidias aproximadamente de 53.46 x 33.40. Se observaron cuerpos de fibrosina en las conidias, característico del género *Podosphaera* sp. En observaciones realizadas con el microscopio electrónico de rastreo se observaron los anillos concéntricos en los lados terminales de la conidia (Fig. 5) y la superficie ondulada en la conidia deshidratada, características que corresponden a *Podosphaera fusca* (Braun, 2002). Mediante caracterización morfológica se identificó hasta género. El análisis molecular utilizando PCR permitió amplificar fragmentos de 674 bp utilizando los indicadores ITS1/ITS4 y 665 bp con ITS1-F/ITS4. Los análisis en BLASTn de la secuenciación del producto de PCR mostró un 93 % de similaridad con *P. fusca.* En la margarita africana también se ha reportado *Golovinomyces cichoracearum* además de *P. fusca*. En los muestreos realizados en este estudio solamente se identificó *P. fusca*.

5.1.3 Golovinomyces cichoracearum

La zinnia (*Zinnia elegans*) y el girasol (*Helianthus annuus*) son plantas ornamentales comúnmente afectadas por añublo polvoriento. Se detectó el patógeno en muestreos realizados

en Mayagüez, Lares y Aibonito. Ésta presentó una incidencia y severidad muy alta cubriendo la planta completa. Se observó la presencia de micelio en hojas, tallos y pétalos desde los meses de enero a marzo, 2011. Además se encontró en yerba socialista (*Sonchus oleraceus*), la maleza es muy común tanto en áreas centrales como costeras de la isla. La enfermedad progresó hasta causar muerte en ambas plantas (Figs. 6 y 36). Las conidias fueron hialinas, elipsoidales (30.41 x 16.06 µm) y en cadenas cortas de hasta tres a cuatro conidias. Los conidióforos fueron catenulados y presentaron una célula basal con un leve doblez (Fig. 6). La germinación de las conidias se observó en la parte sub-terminal de tipo Cichoracearum (= *Retuculoidium*) sin apresorio. La microscopía electrónica de rastreo fue muy útil para la identificación del patógeno. Al observar la superficie de la conidia se pudo apreciar el área arrugada y lados fibrilares característico del género *Golovinomyces* sp. En micelio obtenido de hojas inferiores de la zinnia se observó la presencia del hiperparásito *A. quisquialis* (Fig. 6E). Basándose en las características morfologías observadas y comparadas con los reportes en Turquía de Soylu en el 2011, Cook en el 2009 y la base de datos de Erysiphales de la Universidad del estado de Washington (http://erysiphales.wsu.edu/) se identificó a *G. cichoracearum* afectando a estos tres hospederos pertenecientes a la familia Asteraceae.

5.1.4 Podosphaera pannosa

El añublo polvoriento de la *Rosa* sp. es muy específico en especies de la familia Rosaceae, reportes previos identifican al patógeno como *Podosphaera pannosa* (Braun, 2002; Cook, 1997). Durante los muestreos realizados se colectaron muestras de cuatro pueblos diferentes del centro de la isla. Comparando los resultados obtenidos, el agente causal del añublo polvoriento es *P. pannosa*. La identificación se realizó mediante características morfológicas, además se sustentó la identificación de la muestra con identificación molecular. El micelio se

observó en forma epifita sobre la superficie de las hojas, ocasionando pérdidas económicas ya que afecta la calidad y valor estético de la planta. La descripción morfológica se corroboró con reportes previos de Cook *et al*. (1997) y Braun (2002). Los conidióforos fueron rectos con célula basal cilíndrica, hasta cinco conidias por conidióforo (Fig. 8). Las conidias catenuladas, hialinas con un tamaño de 21- 25 x 11-16 µm (Fig. 8). Posee un apresorio de forma apezonada en las hifas (Fig. 9). Se pudo amplificar y secuenciar la región ITS del rADN con los cebadores ITS1/ITS4. El análisis en BLASTn mostró un 99 % de homología para *P. pannosa.*

5.1.5 Erysiphe polonica

Solo se identificó una muestra de *E. polonica* (Jørstad 1945) en la hortensia, *Hydrangea macrophylla* durante esta investigación. Recientemente, *E. polonica* fue reportado en Noruega afectando a la hortensia (Talgo, 2011) y en Argentina (Cabrera, 2009). No se observó el estado sexual del patógeno. Durante los muestreos realizados a viveros de la zona central de la isla se observaron síntomas y signos de añublo polvoriento en la hortensia, *Hydrangea macrophylla*. Se observó micelio de coloración blanca sobre hojas nuevas y tallos. Con el microscopio de luz se observó micelio externo con apresorios lobulados a multilobulados en secuencia (Fig. 11). Conidióforos erectos con célula basal cilíndrica, se observó la presencia de conidióforos cortos como también en cadenas cortas (Fig. 10 y 11). Conidias elipsoidales de 31.45 x 12.23 µm sin cuerpos de fibrosina. Desarrolló el tubo germinativo en la parte sub-terminal de la conidia tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*).

5.1.6 Oidium poinsettiae

El añublo polvoriento afecta la pascua (*Euphorbia pulcherrima*) durante los meses de diciembre a marzo principalmente en Lares, Adjuntas, Barranquitas y Aibonito donde las

condiciones climáticas son favorables (días secos y noches frescas). Los primeros síntomas se presentan en el haz y mientras la infección progresa se observa en el envés y en tallos jóvenes. También se observó abundancia de añublo polvoriento en una maleza muy común, conocida como "leche vana" (*Euphorbia heterophylla*). Cuando las plantas de pascua fueron transportadas a la zona costera de Juana Díaz donde la temperatura promedio es de 34ºC y la humedad relativa de 89%, la presencia de micelio en el tejido foliar se dejó de observar en aproximadamente tres a cinco días. Esta ornamental es importada de California como esquejes dormantes. Se determinó la presencia de micelio externo y al ser observado en la microscopía electrónica de rastreo se observaron conidióforos hialinos, simples y con célula basal arqueada, característicos de ésta especie (Fig.12). El tipo de germinación que se observó fue terminal con apresorio lobulado (Fig. 12). En ningún muestreo se encontró el estado sexual del patógeno. Se confirmó el agente causal de la enfermedad mediante características morfológicas, además de revisión de reportes previos realizados por Celio en el 1998. Este patógeno ha sido reportado en Honduras, México y Estados Unidos específicamente en Nueva York en ambos hospederos mediante la base de datos de Erysiphales de la Universidad del estado de Washington.

5.1.7 Oidium bixae

El achiote (*Bixa orellana*) presentó alta incidencia y severidad de añublo polvoriento en pueblos localizados en la zona central de Puerto Rico. Se observó enroscamiento de las hojas hasta su caída prematura (Fig. 14). El patógeno mostró conidióforos cortos y erectos, conidias ovaladas o elípticas, lados terminales truncados, midiendo aproximadamente de 30.72 x 19.02 µm. La germinación de las conidias fue de tipo Cichoracerum (=*Reticuloidium*) mostrando un tubo germinativo relativamente largo con apresorio bifurcado (Fig. 14). Con el microscopio electrónico de rastreo se observaron apresorios lobulados en las hifas (Fig. 15). Las conidias, al

estar un poco deshidratadas se observaron diferentes a cuando éstas son túrgidas. La superficie de las conidias se apreció ligeramente arrugada con bordes laterales lisos. Las características morfológicas concordaron con las reportadas en Panamá (Esquivel, 2009), Argentina y Tailandia (Limkaisang *et al*., 2006), Brazil, Taiwan, Uganda y Venezuela (Braun, 1987), según la base de datos de Erysiphales de la Universidad del estado de Washington. Por lo que se concluyó que el organismo causal de añublo polvoriento afectando el achiote es *Oidium bixae*.

5.1.8 Erysiphe quercicola

En el pueblo de Aibonito una zona de gran producción de plantas ornamentales localizada en el centro de isla se observó la presencia de añublo polvoriento en angelonia (*Angelonia augustifolia*). Los síntomas y signos de la enfermedad se observaron en hojas. Las conidias primarias se observaron ovoides a elipsoidales y lados laterales subtruncados, al madurarse se observan elipsoidales a doliformes. Comúnmente las conidias se forman simples pero en ocasiones pueden ocurrir en cadenas. En la muestra colectada se pueden observar conidias en cadenas cortas (Fig. 17) y apresorio de forma apezonado (Fig. 17). Conidióforos erectos de aproximadamente 104.2 µm; éstos datos concuerdan con los reportados por Dallagnol en el 2012 para *E. quercicola*. En Brazil fue reportado *E. quercicola* afectando al flamboyán (*Delonix regia*) (Dallagnol, 2012). Este es un patógeno de gran importancia ya que afecta a miembros de la familia Anacardiaceae y Rutaceae (WSU, Erysiphales Database). En Puerto Rico este patógeno no está reportado en ninguna de las familias mencionadas anteriormente. Para nuestro conocimiento este es el primer reporte de *E. quercicola* en angelonia en Puerto Rico. Actualmente está ocasionando pérdidas económicas ya que induce a la caída prematura de las hojas, afectando así el valor estético de la planta.

5.1.9 Erysiphe heraclei

Durante los meses de abril a mayo en las localidades de Juana Díaz y Mayagüez se observó la presencia de manchas blancas irregulares sobre tallos, inflorescencias y en el haz y envés de hojas del eneldo. Los síntomas y signos de la enfermedad fueron áreas cloróticas y necróticas en el tejido afectado además, la presencia de micelio blanco. Con microscopio de luz se observaron conidióforos cortos y rectos de aproximadamente 98.9 µm (Fig.18). Las conidias de forma cilíndrica (39.0 x 14.9 µm), no presentaron cuerpos de fibrosina (Fig. 18). No se observaron apresorios en el tubo germinativo pero si apresorios lobulados en las hifas. Se observó la presencia de un coccinélido llamado *Psyllobora nana* alimentandose del micelio siendo éste considerado como un control biológico (Sutherland y Parrella, 2009). Basados en las características morfológicas, el agente causal de añublo polvoriento en el eneldo fue identificado como *E. heraclei*. Ésta especie ha sido reportada en diversos géneros y especies de la familia Apiaceae en Europa (Turquía); entre ellos perejil, apio, zanahoria y fenel (Soylu, 2003). En México fue reportado afectando el cultivo de la zanahoria (Rodríguez-Alvarado, 2010).

5.1.10 Podosphaera sp.

Están reportados *Erysiphe cleomes*, *E. cruciferarum* y *Leveillula taurica* como los organismos causantes de añublo polvoriento en la maleza *Cleome viscosa*, según la base de datos de Erysiphales de la Universidad del estado de Washington (http://erysiphales.wsu.edu/). Por medio de la microscopía de luz se observaron cuerpos de fibrosina en las conidias y una germinación tipo Fuliginea (=*Magnicellulatae*). La presencia de cuerpos de fibrosina, tipo de germinación y forma de conidia identifica a *Podosphaera* sp. como el agente causal de añublo polvoriento en *Cleome viscosa*.

Por otra parte Holcomb en el 1999 reporta a *Oidium* sp. como el agente causal de añublo polvoriento en payasito (*Torenia fournieri*) ya que presenta conidias en cadenas en ausencia de cuerpos de fibrosina. No se ha reportado la presencia de éste patógeno en los Estados Unidos; en Finlandia se reportó *Sphaerotheca fuliginea* y en Japón *Erysiphe* sp. (Holcomb, 1999). Nuestros resultados indican que el agente causal de la enfermedad es una *Podospahera* sp. ya que presenta conidióforos en cadenas con cuerpos de fibrosina y una germinación tipo Pannosa (=*Fibroidium*) (Cook, 2009).

5.1.11 Erysiphe acalyphae

En acalifa (*Acalypha wilkesiana*), una planta preferida en áreas de ornato, se observaron la presencia de síntomas y signos de añublo polvoriento en muestreos realizados en las zonas central y costera de la isla. Mediante microscopía de luz se observó micelio externo con apresorio lobulado, conidióforos cortos tipo *Pseudoidium*, conidias ovaladas en etapas tempranas que luego se observaron cilíndricas con extremos subtruncados. Presentó una germinación tipo Cichoracearum (=*Reticuloidium*) con tubos germinativos cortos sin apresorio (Fig. 22). La microscopía electrónica mostró la superficie de la conidia arrugada y lados terminales fibrilares típicos del género *Erysiphe*. Se identificó a la especie como *E. acalyphae* ya que las características morfológicas concuerdan con las reportadas (WSU, Erysiphales Database).

5.1.12 Erysiphe peruviana

En el 2010, Glawe realizó un primer reporte de *E. peruviana* en un arbusto ornamental, *Tecomaria capensis* en Arizona, Estados Unidos donde se le conoce como “Cape honeysuckle”. Solamente reportan el estado sexual, no se presenta ningún tipo de información del estado asexual el patógeno. En Puerto Rico no se ha reportado el estado sexual del patógeno. De todos

los muestreos realizados solo se encontró un arbusto de *T. capensis* en la Estación Experimental Agrícola en Adjuntas. Se pudo observar la presencia de micelio blanco a grisáceo sobre la superficie de las hojas nuevas (Fig. 24). En cámaras húmedas se observó el tipo de germinación y se complementó con microscopia electrónica de rastreo. La identificación morfológica reveló la presencia de micelio externo con apresorio lobulado (Fig. 25), tubo germinativo sub-terminal moderadamente largo sin apresorio (Fig. 24). Con el microscopio electrónico de rastreo se pudo observar la superficie de la conida arrugada y lados terminales lisos (Fig. 33A y B). La amplificación y secuenciación de la región ITS del rADN con los cebadores ITS1/ITS4 permitió obtener una banda de 652 pb con un 98 % de similaridad para *E. peruviana*. La región ITS4 amplificó una banda de 67 bp lo que representa un número de bases demasiado pequeño. Se corroboró en la literatura con las características morfológicas obtenidas, (Glawe, 2010) identificándose a *E. peruviana* como el agente causal del añublo polvoriento en *Tecomaria capensis* y representa un primer reporte para Puerto Rico.

5.1.13 Oidium calanchoeae

En *Kalanchoe blossfeldiana* se reportó al agente causal de la enfermedad como *Podospahera fuliginea* (Glawe, 2003; Farr, *et al*., 1995). La base de datos de la Universidad de Washington reporta a *Oidium calanchoeae* como otro agente causal de la enfermedad, en Alemania, Hungría, Italia, Noruega y Romania para el 2008, según la base de datos de Erysiphales de la Universidad del estado de Washington (http://erysiphales.wsu.edu/). Para distinguir los dos géneros en muestras colectadas se observó tipo de conidióforo y cuerpos de fibrosina ya que *P. fuliginea* posee conidióforos en cadena *y O. calanchoeae* posee conidióforos cortos tipo *Pseudoidium*. Además no produce cuerpos de fibrosina, lo que permite diferenciarle de *P. fuliginea* la cual produce cuerpos de fibrosina. *O. calanchoeae* presenta conidias de aproximadamente 33.96 x

16.74 µm y conidióforos simples de 85.11x 9.38 µm (Fig.26). Esto concuerda con reportes previos (MycoBank). Este sería el primer reporte de *O. calanchoeae* para Puerto Rico.

5.1.14 Erysiphe begoniicola

En la begonia silvestre (*Begonia multinervia*) se observó la presencia de micelio color blanco sobre el haz de las hoja y tallos, durante los meses de enero a marzo. En la microscopía de luz se observó micelio externo con apresorios lobulados, célula basal recta, conidióforos simples, conidias cilíndricas (51.47 x 20.64 µm), cuerpos de fibrosina ausentes y germinación de la conidia tipo *Pseudoidium* (=Polygoni) sin apresorio. Con la microscopía electrónica de rastreo se observaron lados terminales arrugados y la superficie de la conidia áspera. Basándonos en las características morfológicas, el agente causal del añublo polvoriento fue identificado como *Erysiphe begoniicola* (=*Microsphaera begoniae*) al igual que fue reportando en India afectando el mismo género (Baiswar, 2008). La base de datos de la Universidad de Washintog (WSU, Erysiphales Database) ha reportado para el 2009 la presencia de *E. begoniicola* en *B. elatior*, *B. semperflorens*, *B. xtuberhybrida* y *Begonia* spp. en diferentes partes del mundo.

5.1.15 Erysiphe russellii

Erysiphe russellii, agente causal de añublo polvoriento en una de las malezas más comunes en Puerto Rico conocida como *Oxalis barrelieris*. En el microscopio de luz se observó la presencia de apresorios lobulados, conidióforos con célula basal recta; conidias maduras limoniformes de 27.23 x 13.24 µm, sin cuerpos de fibrosina y tubo germinativo lateral-terminal. Morfológicamente los datos son similares a estudios realizados anteriormente en *Oxalis corniculata* (MycoBank, 2008; Farr, 1995; Clare, 1964). Con el microscopio electrónico de rastreo se observó la superficie de la conidia arrugada con patrones cuadrados y lados terminales

lisos, según descrito por Cook en el 1997. *Erysiphe russellii* aparenta poseer una alta especificidad con las plantas de la familia Oxalidaceae. Actualmente está reportado en los estados del noroeste de los Estados Unidos, Europa, Asia, Australia, Nueva Zelandia y África del Sur (MycoBank, 2008).

5.1.16 Erysiphe pisi

El recao (*Eryngium foetidum*), es una planta aromática de mucha demanda en viveros tanto en zonas centrales como costeras. Se observó la presencia de micelio de añublo polvoriento en hojas maduras y brotes. Las conidias son hialinas, elipsoidales sin cuerpos de fibrosina de aproximadamente 70.93 x 24.44 µm, conidióforos simples tipo *Pseudoidium*, germinación sub-terminal y en ocasiones terminal. Se observaron apresorios al final del tubo germinativo bifurcado y simple (Fig. 38). Mediante análisis molecular utilizando PCR se amplificaron dos fragmentos de 672 bp con los iniciadores ITS1/ITS4 y 665 bp con los iniciadores ITS1-F/ITS4. Los análisis en BLASTn de la secuenciación del producto de PCR mostró un 97 % de similaridad para *Erysiphe pisi*. En Brazil se reportó a *Leveillula taurica* afectando a *E. foetidum*, *Petroselinum crispum* y *Coriandrum sativum* (Reis, *et al*., 2004). Es importante evitar el contagio de las enfermedades ya que en el país se comercializan dichas hortalizas, *L. taurica* está reportado en Puerto Rico afectando el cultivo de la cebolla (*Allium cepa*) (Feliciano, 2007).

5.2 Evaluación de la infección natural de añublo polvoriento en un predio experimental

Durante las evaluaciones realizadas desde el 2010 hasta el 2012 en lotes experimentales localizados en la Estación Experimental de Juana Díaz, solamente se observó infección natural de *Erysiphe heraclei* en el eneldo (*Anethum graveolens*) var. Bouquet y en una maleza de la

familia Fabaceae. *Podosphaera* sp. fue identificado en *Cleome viscosa*. Durante la evaluación realizada se determinó alta incidencia y severidad en el eneldo y cleome, como resultado de la infección natural. Hasta el momento no existe información sobre la epidemiologia de los añublos polvorientos en la zona de América Central y la susceptibilidad de los diversos hospederos por lo tanto, es difícil determinar las condiciones apropiadas óptimas para el desarrollo de la infección.

5.3 Herbario

Se recolectron muestras sintomáticas de añublo polvoriento de las diferentes plantas ornamentales y aromáticas descritas anteriormente durante los muestreos, con el propósito de realizar estudios más específicos en la caracterización molecular. Estas muestras están disponibles en el Herbario del Colegio de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez.

5.4 Amplificación de secuencias del ADN ribosomal

Los fragmentos de ADNr amplificados mediante el PCR se muestan en la (Fig. 39), donde se observa un tamaño de 600 a 700 pares de bases. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cunnington *et al*., 2003 donde analizaron ADN de diveros Erysiphales para amplificar secuencias de las regiones ITS y 5.8S del ADNr.

5.5 Secuencias analizadas mediante BLASTn

Cuatro de las nueve secuencias analizadas mostraron altos porcentajes de homología y cobertura; mostrando diferencias de solo dos a cinco nucleótidos (Cuadro 26). Las demás secuencias al realizar los análisis de BLASTn no se incluyeron debido a que presentaron muchos cambios en las secuencias de nucleótidos, amplificó ADN de la planta hospedera, el

hiperparásito *Ampelomyces quisquialis* o la secuencia de nucleótidos era muy corta por lo cual no ocurrió complementaridad.

Los añublos polvorientos son causados por hongos que se comportan como parásitos obligados, quiere decir que no pueden ser cultivados en medios artificiales (Bushnell, 2002). Para la extracción del ADN fue necesario obtener micelio y conidias directamente del tejido vegetal. Al realizar el raspado desde el tejido del hospedero hubo contaminación del ADN de la planta y de otros organismos como el hiperparásito *A. quisqualis*. Durante el proceso de extracción a mas de tomar micelio y conidias del patógeno se obtiene ADN exógeno desde tricomas, cuerpos o glándulas lactíferas en el caso de las euphorbias.

En el caso de las euphorbias se utilizaron los cebadores PMITS1 y PMITS2 para realizar el PCR con los parámetros descritos por Cunnington *et al*., 2003. El propósito de estos cebadores fue amplificar solo secuencias de ADNr de los Erysiphales.

5.6 Filogenia

La calidad del ADN obtenido durante el proceso de extracción fue deficiente lo que afecta la secuenciación de la región ITS, debido a una disminución en el número de bases nitrogenadas, este es un problema reportado en los biótrofos (Vega, 2012). Es importante resaltar que durante la elaboración del árbol filogenético la carencia de sequencias reportadas en el GenBank de zonas tropicales. Posiblemente, al ser este estudio pionero en caracterización de añublos polvorientos de zona tropical y por la posición geográfica de la isla no se logró encontrar similaridad entre las secuencias reportadas en GenBank en algunos casos. Al comprarar secuencias del GeneBank con secuencnias de *Erysiphe australiana*, *E. pisi* y *Podosphaera fusca*

no se obsevó diferencias entre especies (Fig. 41). Al igual que *P. pannosa* (Fig. 42) se mantuvo bajo el mismo clado de las demás especies del GenBank.

6.0 CONCLUSIONES

- Se identificaron un total de quince especies diferentes de añublos polvorientos afectado a plantas ornamentales y aromáticas.
- El género de mayor importancia económica afectando las plantas ornamentales es *Erysiphe* sp. con un total de nueve especies diferentes.
- Se encontró una alta especificidad en los añublos polvorientos y su hospedero, afectando naturalmente a hospederos que pertenecientes a la misma familia.
- Se encontró especificidad de dos especies de añublos polvorientos en las familias Euphorbiaceae y Asteraceae.
- Las plantas ornamentales de la zona central de la isla presentaron un porciento de severidad más alto que en las zonas costeras.
- *Oidium poinsettiae* fue identificado como el agente causal del añublo polvoriento en la pascua (*E. pulcherrima*) y en la maleza conocida como leche vana (*E. heterophylla*).
- *Ampelomyces quisqualis* fue un factor muy limitante en el proceso de la identificación morfológica así como molecular, por ser un hiperparásito en los añublos polvorientos.
- Los añublos polvorientos causan una reducción en el área fotosintética activa de la planta, ocasionando clorosis, enanismo, aborto de flores y frutos y otros daños en la planta.
- *Erysiphe peruviana, E. quercicola, E. rusellii, E. polonica, O. poinsettia, O. bixae*, *Podosphaera fusca* son nuevos informes de hongos fitopatógenos para Puerto Rico.
- Un factor muy limitante en la identificación molecular fue la amplificación de solo una secuencia de la región ITS del rADN.

7.0 RECOMENDACIONES

- Determinar la distribución *de E. quercicola* en la isla, ya que es un patógeno asociado a cultivos de importancia económica como los cítricos y leguminosas.
- Evaluar efectos de fungicidas e intervalos de aplicación efectivos para el control de añublo polvoriento en plantas ornamentales y aromáticas.
- Aplicar métodos de control para la enfermedad inmediatamente sean importadas las plantas.
- Como medida de control de la enfermedad, se pudieran importar variedades resistentes a la enfermedad si está disponible.

8.0 LITERATURA CITADA

Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology, 4th edn. San Diego, CA, USA: Academic Press.

Almodóvar, J.R., 1998. Estudio estructural en especies de Utricularia L. “lentibulariaceae” en la laguna Tortuguero en Puerto Rico. MS Tesis,

Belanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., Carver, T.L.W. 2002. The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise. APS Press. Pp 13-55.

Benson, D.M., Hall, J.L., Moorman, G.W., Daughtrey, M.L., Chase, A.R. and Lamour, K.H. 2001. *Poinsettia*: The Christmas Flower. APS*net* Features. Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-2001-1201.

Braun U., Cook R.T.A., Inman A.J., Shin, H.D. 2002. The taxonomy of powdery mildew fungi In: The Powdery mildew (eds. Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J, and Carver T.L.W.) pp 13-55. APS Press, St. Paul, MN.

Cabrera, M., Alvarez, R., Cundom, M., y Gutiérrez, S. 2009. Enfermedades que afectan a *Hydrangea macrophylla* en Corrientes, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarias.

Clare, B.G., 1964. Erysiphaceae of South-Eastern Queensland. The University of Queensland Press. Vol. IV Number 10. Page 130.

Cook R. T. A., Braun U., 2009. Conidial germination patters in powdery mildews. Mycol. Res. 113: 616-636.

Cook, R. T. A., Inman, A. J., and Billings, C. 1997. Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. Mycol. Res. 101:975-1002.

Cook, M.T. 1939. Enfermedades de las plantas económicas de las Antillas. Monographs University of Puerto Rico, Ser. B. 4:1-530.

Cunnington, H. J., S. Takamatsu, C. A. Lawrie and I. G. Pascoe. 2003. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphaes). Australian Plant Pathology 32: 421-428.

Daughtrey, M. and Hall, J. 1992. Powdery mildew-a new threat to your *Poinsettia* crop. Grower Talks, Sept:23-31.

Dallgnol, L., Castro, F., Frare, G. y Camargo, L., 2012. First Report of Powdery Mildew on Flamboyant Tree Caused by *Erysiphe quercicola* in Brazil. The American Phytopathological Society. Volume 96, Number 4. Pages 598.1 – 598.1.

Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2010-2011. Estadisticas Agrícolas. Ingreso bruto de la agricultura de Puerto Rico. Cifras revisadas 2009-2010 y 2010-2011. Oficina de Estadisticas Agrícolas, San Juan, P.R.

External Trade Statistics. 2011. Junta de planificación, San Juan, P.R.

Falk, S.P., Gadoury, D.M., Pearson, R.C., and Seem, R.C.1995. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. Plant Dis. 79:483-490.

Garibaldi, A., A. Minuto, D. Bertetti, and M.L. Gullino.2004. First Report of Powdery Mildew Caused by *Oidium* Subgenus *Pseudoidium* on *Salvia scabra* in Italy. Apsnet. 88:682.3-682.3.

Glawe, D.A. 2008. The Powdery Mildews: A Review of the World's Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. APS Press. 46:27-51.

Glawe, D., Barlow, T., Matheron, M., 2010. First Report of Powdery Mildew of *Tecoma capensis* Caused by *Erysiphe peruviana* in North America. Plant Health Progress.

Gent, D. H., Nelson, M. E., George, A. E., Grove, G. G., Mahaffee, W. F., Ocamb, C. M., Barbour, J. D., Peetz, A., and Turechek, W. W. 2008. A decade of hop powdery mildew in the pacific northwest. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2008-0314-01-RV.

Holcomb, G. 1999. First Report of Powdery Mildew Caused by an Oidium sp. on *Torenia fournieri*. The American Phytopathological Society. Volume 83, Number 9. Page 878.2.

Horst, R. K.1995. Compendium of Rose Diseases. APS Press. St.Paul, Minnesota,USA.

Jones, R.K. and Benson, D.M. 2001. Diseases of Woody Ornamentals and Trees in Nurseries. APS Press. St. Paul Minn. 57-58.

Kiss, L., et al, 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. Plant Dis. 92:5.

Kiss, L., Jankovics, T., Kovacs, G.M., and Daughtrey, M. L.2008. *Oidium longipes*, a new powdery mildew fungus on petunia in the USA: A potential threat to ornamental and vegetable solanaceous crops. Plant Dis. 92:818-825.

Koike, S.T. and G. S., Saenz. 1999. Powdery mildew of Spearmint caused by *Erysiphe orontii* in California.Apsnet 83(4):399.3-399.3.

Mafia, R., Alfenas, A., Ferrerira, E. y Andrade, C., 2005. *Erysiphe cichoracerum* on *Acalypha wilkesiana* in Brasil. Fitopatología bras. Vol. 30 num.3.

Marcum, D.B., K. Pérez and R.M. Davis. 2010. First report of powdery mildew caused by *Golovinomyces biocellatus* on peppermint in California. Plant disease. 94(2):276

Meléndez, E.N. 1999. Plantas medicinales de Puerto Rico: folklore y fundamentos científicos. Ed (EDUPR) Río Piedras, P.R. 498pp.

Muñoz, B.F. 1987. Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, Cultivo y Procesado. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa.

Park, M.J. 2009. First Korean report of rosemary powdery mildew caused by *Golovinomyces biocellatus*. New Disease Reports. 19:60.

Porter, D.M.1993. Diseases of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) APSnet. (www.apsnet.org)

Schumann, G.L., D'Arcy, C.J., 2010. Essential Plant Pathology. APSPress. 369pp.

Shi, A., and M. T. Mmbaga. 2006. Perpetuation of Powdery Mildew Infection and Identification of *Erysiphe australiana* as the Crape Myrtle Pathogen in Mid-Tennessee. Plant Disease 90(8):1098.

Soylu, S. 2011. First Report of Powdery Mildew Caused by *Golovinomyces cichoracearum* on *Zinnia elegans* in Turkey. The American Phytopathological Society. Volume 95, Number 10. Pages 1,317.2 – 1, 317.2.

Soylu, E. and Soylu, S. 2003. First repot of powdery mildew caused by Erysiphe heraclei on dill (Anethum graveolens) in Turkey. Plant Pathology 52: 423.

Takamatsu, S., Y. Kano. 2001. PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. Mycoscience. 42(1), p. 135-139.

Takamtsu, S., S. Niinomi, M. Harada, M. Havrylenko. 2010. Molecular phylogenetic analyses reveal a close evolutionary relationship between *Podosphaera* (*Erysiphales: Erysuphaceae*) and its rosaceous host. Persoonia 24, 2010: 38-48.

Trosi, M., D. Bertetti, A.Garibaldi, and M.L. Guillino. 2010. First report of powdery mildew caused by *Golovinomyces cichoracearum* on Gerbera (*Gerbera jamesonii*) Italy. Phytopathology 94:130.3.

Torres, D. and L .I. Rivera-Vargas. 2008. Identification of powdery mildews anamorphs (Order Erysiphales) from Puerto Rico. Phytopathology 98:S157.

Ulloa, M., R. T. Hanlin, 2006. Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología. APS Press. St. Paul, Minnesota U.S.A. 672pp.

Vega, B. and Estévez de Jensen, C. 2012. Phylogenetic analyses of eight isolates of *Phakopsora meibomiae* collected in Puerto Rico. J. Agric. Univ. PR. 95(1-2):45-55.

Wellman, F.L. 1961. Enfermedades de algunas plantas ornamentales de Puerto Rico. Revista Agrícola de Puerto Rico. 48:179-213.

Whistler, W.A. 2000.Tropical Ornamentals: a guide.TIMBER Press. Portland, Oregon U.S.A. 542pp.

White, T.J., T. Bruns., S. Lee., J. W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. (eds. M.A. Innis, D.H. Gelgard, J.J. Snisky and T.J. White) pp.315-322. Academic Press, N.Y.

Ziedan, E. 2010. First record of dill powdery mildew caused by *Erysiphe heraclei* DC in Egypt. Phytopathology & Plant, Egypt. 43:728-735.