



Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad del Valle



Morphological and Molecular Characterization of *Phytophthora* in Pepper (*Capsicum frutescens* var. Tabasco), Valle del Cauca

Natalia Aristizábal Castillo

Universidad del Valle

Celina Torres González

Universidad del Valle

Received: November 3, 2015

Accepted: December 17, 2015

Pag. 71-89

Abstract

The purpose of this work was the characterization of possible different species of *Phytophthora* in a field that just begun to be used for the production of Tabasco pepper (*Capsicum frutescens* Var. Tabasco) of exporting quality, in a growing area of Valle del Cauca. *Phytophthora* is a phytopathogen oomycete which attacks wide variety of plants, from vegetables to timber trees, and has several species that have been found in studies of pepper's late blight, powdery mildew and root rot. The Tabasco pepper is one of the most demanded varieties in the market, and for this reason, it is necessary to deepen the studies on the prevention and control of diseases that attack the crop. For this investigation, a random collection of soil was made from the Tabasco pepper crop, within a perimeter of 20cm around the seedling and inside the channel between planting beds. Two *Phytophthora* morphotypes were isolated to which DNA was extracted with the PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories Inc.), and a PCR was run, showing different band sizes. By comparing the sequences of the ITS1 and ITS4 regions, a similarity of 99% was found between isolation P1 and *Phytophthora cinnamomi*; the isolation P2 (80%) had a close relationship with the group belonging to *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae* and *P. tentaculata*.

Keywords: *Phytophthora*, *Capsicum frutescens*, plant pathogen, pathogenicity, PCR, soil.

Caracterización morfológica y molecular de *Phytophthora* en ají (*Capsicum frutescens* var. Tabasco), Valle del Cauca

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de posibles especies diferentes de *Phytophthora* en un terreno que apenas comenzaría a ser usado para la producción de ají tabasco (*Capsicum frutescens* Var. Tabasco) de calidad de exportación en una zona productora del Valle del Cauca. *Phytophthora* es un Oomiceto fitopatógeno que ataca gran variedad de plantas, desde hortalizas hasta árboles maderables y tiene varias especies que se han encontrado en estudios del tizón tardío, moho polvoso y putrefacción de la raíz del ají. El ají tabasco es una de las variedades de mayor demanda en el mercado, y por ello es preciso profundizar en los estudios referentes a la prevención y control de las enfermedades que atacan este cultivo. Para esta investigación se hizo una colecta aleatoria de suelo del cultivo de ají tabasco dentro de un perímetro de 20cm alrededor de la plántula y dentro del canal entre camas de siembra. Se aislaron dos morfotipos de *Phytophthora* a los que se extrajo ADN con el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (laboratorios MO-BIO Inc.), y se corrió una PCR, demostrando diferencia en el tamaño de las bandas. Al comparar las secuencias de las regiones ITS1 e ITS4, se encontró una similitud del 99% entre aislamiento P1 y *Phytophthora cinnamomi*; el caso

del aislamiento P2 tuvo una estrecha relación con el grupo perteneciente a *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae* y *P. tentaculata*.

Palabras Clave: *Phytophthora*, *Capsicum frutescens*, fitopatógeno, patogenicidad, PCR, suelo.

1 Introducción

El ají es un fruto perteneciente al género *Capsicum l.*, el cual incluye aproximadamente 30 especies provenientes de zonas comprendidas entre el sur de Estados Unidos y Chile. Ocupa el primer lugar en importancia dentro de los frutos y hortalizas que se cultivan en países de Latinoamérica, principalmente México, Perú, Bolivia, Chile y Colombia. Se puede decir que tanto los ajíes y chiles, como los pimientos (pertenecientes al mismo género) vienen siendo utilizados en América desde hace miles de años (según yacimientos arqueológicos en México y Perú) y han perdurado hasta llegar a tal influencia que hoy en día se puede ver reflejada en el cultivo, comercialización y consumo en países muy lejanos a su procedencia. A partir del siglo XVI el cultivo del pimiento, en sus variados tipos dulces o picantes, de carne gruesa o delgada, como especia o como hortaliza, aparece ampliamente distribuido por toda Europa y por todo el mundo [30].

Dentro del género *Capsicum* hay cinco especies domesticadas y 26 especies salvajes y del total sólo 12, incluyendo algunas variedades, son empleadas por el hombre [30]. En Colombia se cultivan diferentes especies de ají, entre las que se destacan el ají dulce, el ají topito dulce y el ají picante, principalmente semillas foráneas de variedades e híbridos tales como tabasco, cayena, habanero y jalapeño en menor escala y el chivato (Análisis de agro negocios alianza productiva y comercial ají. Proyecto Apoyo Alianzas Productivas). Como representante de las especies domesticadas picantes se encuentra el ají tabasco (*Capsicum frutescens* var. Tabasco) el cual es originario del estado Tabasco (de ahí su nombre), México [43], aunque la OECD (2006) afirma que su centro es el este amazónico. Ésta variedad tiene un gran reconocimiento alrededor del mundo por su palatabilidad, su variado uso culinario, el cual es producido y consumido tanto fresco como procesado y desde hace 145 años es conocida particularmente por la famosa “salsa Tabasco” de la empresa de Mc Ilhenny Co. Louisiana, Estados Unidos [44].

Colombia tiene condiciones espectaculares para la siembra del ají, con lo que ha alcanzado 70 ton/ha en invernadero [36] y el departamento del Valle del Cauca ha registrado altos niveles de producción desde 2006 hasta 2011. Sin embargo, hacia 2012 su producción sufrió una reducción considerable junto con la producción nacional (una caída del 7%) [26]. Esto se debió tanto a factores fitosanitarios como de la producción en sí. Según la Corporación Colombiana Internacional (CCI) los principales destinos de las exportaciones colombianas de ají hasta el año 2005 fueron Estados Unidos (52 %), Arabia Saudita (46%), Canadá y las Antillas Holandesas (1% c/u). A pesar de que el mayor importador de ají tanto en seco como verde es Estados Unidos, es importante destacar que el ají colombiano en fresco no tiene acceso autorizado a éste país por no tener el Análisis de Riesgo de Plagas (ARP) requerido por las estrictas medidas sanitarias y fitosanitarias, lo que le resta un gran porcentaje del capital de ingreso a Colombia [9].

La inocuidad alimentaria es uno de los grandes puntos que Colombia debe acometer en los próximos años para alcanzar más rápidamente objetivos de competitividad de comercio

internacional ya que, según el Plan de Negocios del Ají [23], se presenta una carencia importante desde el punto de vista del estatus fitosanitario y de inocuidad en las cadenas de frutas y hortalizas que puede condicionar la exportación de las mismas. Esto se puede evidenciar en la reducción del número de pedidos registrados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en cuanto a exportación, especialmente de ají, cebolla cabeza y fresa [23].

Un factor importante en el cultivo de plantas de ají, es la susceptibilidad a diferentes tipos de enfermedades y plagas, lo que resulta en billones de dólares en daños y pérdidas al año en este cultivo [39]. Entre las enfermedades que afectan el ají, se pueden resaltar el gusano Marggot y los nematodos, bacterias como *Erwinia* y *Xantomonas*, hongos del género *Fusarium* y también virus. Otro grupo de organismos que causa graves daños al ají es el *Oomycota* [39], el cual es excluido del grupo de los hongos verdaderos e incluido en el reino Chromista de acuerdo a una nueva clasificación debido a que la mayor parte de su ciclo de vida es diploide mientras que los otros hongos son haploides [25].

La especie que más se cita al momento de hablar del tizón en chiles o ajíes, es *P. capsici* [2, 1, 20]. Sin embargo muchos otros estudios denotan otras especies que también afectan los chiles o ajíes, tales como *P. cinnamomi* y *P. infestans*. De esta manera, no es posible definir si es una sola especie de *Phytophthora* o varias a la vez las que generan la afección y esto complica el control de la enfermedad.

Las especies del género *Phytophthora* son fitopatógenos devastadores tanto en agroecosistemas como en ecosistemas naturales [4]. El género *Phytophthora* es responsable de algunas de las más serias enfermedades en plantas [8], tales como la putrefacción de la raíz de la soya [49], la putrefacción de raíz del tomate, la marchitez de la pimienta [52], la marchitez del chile [34] y la muerte repentina del roble [32]. Debido a su significativo impacto económico y ambiental, el interés por los aspectos genéticos y genómicos de estos Oomycetes ha aumentado. De igual manera, se han incrementado los esfuerzos por recopilar la información fenotípica y genotípica de este género [4].

La mayoría de las especies de *Phytophthora* son invasoras primarias de tejidos sanos de plantas con capacidad saprofítica limitada; muchas de las cuales son responsables de enfermedades de hortalizas de importancia económica o causantes de daños a las comunidades vegetales de los ecosistemas naturales [8].

Phytophthora es un patógeno con un mecanismo de acción eficiente debido a que puede sobrevivir en los residuos de cosecha eliminados y/o abandonados en un campo que ha sido destruido por la enfermedad. Bajo condiciones ambientales favorables, produce esporangios, los cuales se diseminan por el aire o por el suelo a otros cultivos. El patógeno inicia su desarrollo y los esporangios pueden infectar, a través del suelo, del agua de riego y del aire, las raíces, los tallos y el follaje sanos. El patógeno se incrementa en las plantas infectadas, luego invade plantas del mismo campo y posteriormente, constituye un foco de infección para otros campos. Las oosporas, las cuales se encuentran en los residuos vegetales y/o en el suelo y tienen una viabilidad hasta de 2 años, constituyen otra fuente de infección. [3].

El mecanismo de infección se da cuando las estructuras reproductivas se establecen en las hojas y/o en el lugar de inserción de la hoja con el tallo. La infección en las hojas se produce en el ápice y en los bordes de los folíolos, donde casi siempre existe una película de agua. La infección en campo normalmente ocurre bajo condiciones de temperatura y humedad relativa alta, por encima de los 25°C y 90-95% de humedad relativa. Los esporangios penetran a través de los estomas o directamente por la cutícula. Finalmente, las células mueren, los tejidos se necrosan y las hojas infectadas muestran manchas negras o marrones. El desarrollo del patógeno continúa dentro de los tejidos a lo largo de los espacios intercelulares y también dentro de las células. Otro mecanismo de infección es a través del suelo. La humedad, la cantidad de esporangios viables que caen, la temperatura del suelo y probablemente la condición supresiva de los suelos y la susceptibilidad de la especie favorecen la infección en el campo [14, 18].

Este fito-patógeno puede infectar las raíces, flores, tallos, hojas y frutos del ají provocando el tizón foliar, la putrefacción de frutos y la putrefacción de la raíz y del tallo, en cualquier etapa del desarrollo de las plantas [52]. Las etapas iniciales de infección son biotróficas ya que a menudo no muestran síntomas. Dependiendo de la temperatura, existe un período de incubación de 24 h antes de que las primeras lesiones necróticas sean visibles. Aunque *Phytophthora* es considerado como un patógeno del suelo, puede existir una abundante putrefacción de estructuras reproductivas en la superficie del suelo, en material vegetal en descomposición. Los frutos infectados pueden ser considerados como agentes de dispersión, ya que solamente requieren de lluvia o agua de riego para que ocurra una dispersión masiva de zoosporas [52]. Este patógeno puede producir pérdidas hasta del 80% en la producción de ají [32].

Phytophthora es un patógeno con un mecanismo de acción eficiente debido a que puede sobrevivir en los residuos de cosecha eliminados y/o abandonados en un campo que ha sido destruido por la enfermedad. Bajo condiciones ambientales favorables, produce esporangios, los cuales se diseminan por el aire o por el suelo a otros cultivos. El patógeno inicia su desarrollo y los esporangios pueden infectar, a través del suelo, del agua de riego y el aire, las raíces, tallos y follaje sanos. El patógeno se incrementa en las plantas infectadas, luego invade plantas del mismo campo y posteriormente, constituyen un foco de infección para otros campos. Las oosporas, las cuales se encuentran en los residuos vegetales y/o en el suelo y tienen una viabilidad hasta de 2 años, constituyen otra fuente de infección [3].

El mecanismo de infección se da cuando las estructuras reproductivas se establecen en las hojas y/o en el lugar de inserción de la hoja con el tallo. La infección en las hojas se produce en el ápice y en los bordes de los folíolos, donde casi siempre existe una película de agua. La infección en campo normalmente ocurre bajo condiciones de temperatura y humedad relativa alta, por encima de los 25°C y 90-95% de humedad relativa. Los esporangios penetran a través de los estomas o directamente por la cutícula. Finalmente las células mueren, los tejidos se necrosan y las hojas infectadas muestran manchas negras o marrones. El desarrollo del patógeno continúa dentro de los tejidos a lo largo de los espacios intercelulares y también dentro de las células. Otro mecanismo de infección se produce a través del suelo. La humedad, la cantidad de esporangios viables que caen, la temperatura del suelo y probablemente la condición supresiva de los suelos y la susceptibilidad de la especie favorecen la infección en el campo [14, 18].

Phytophthora capsici incluye aislados obtenidos de pimienta negra (*Piper nigrum*) [6]; se considera el agente causal de más de 50 especies de plantas, entre ellas, el causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) en Nuevo México. [26, 35, 50] encontraron esta especie como la responsable de daños de importancia económica en solanáceas como el chile, el tomate y la berenjena, y cucurbitáceas como el pepino, la calabaza, y el melón, alrededor del mundo.

Recientemente, se le ha encontrado atacando cultivos de habas (*Vicia faba*) y habichuelas (*Phaseolus lunatus*), plantas que previamente se había demostrado no eran hospedantes viables de este patógeno [45].

Este patógeno es responsable de grandes pérdidas a nivel mundial [35]. En muchas partes del mundo, *P. capsici* es el factor limitante más importante de producción vegetal [26], actualmente, se le considera el factor fitosanitario más importante para la producción de ají en México [15].

Como complemento del diagnóstico y caracterización de los patógenos de mayor importancia económica, se deben buscar alternativas de control con el propósito de saber con exactitud las especies de los patógenos que se encuentran en las áreas de siembra, en las plantas enfermas o en los viveros, para determinar el uso de una tecnología, con un enfoque más definido hacia el patógeno en particular y que evite dañar las características del suelo y de los microorganismos benéficos en los sustratos. Este trabajo buscó, mediante técnicas básicas de fitopatología, evaluar el estado fitosanitario de un terreno en inicio con un cultivo de ají tabasco (*Capsicum frutescens* var. Tabasco) de calidad de exportación, donde se propuso encontrar posibles estados quiescentes de *Phytophthora* con alto potencial perjudicial para la producción y por medio de técnicas moleculares complementarias se determinó la especie de *Phytophthora* que está específicamente en los terrenos de cultivo.

2 Metodología

2.1 Zona de muestreo

Las muestras de suelo fueron colectadas en el cultivo que se encuentra en los terrenos de una finca destinada únicamente a la siembra de ají tabasco, ubicada en el corregimiento de Rozo, a 20 minutos de la cabecera municipal de Palmira (Departamento del Valle del Cauca), coordenadas 03°37'35,5"N, 76°25'02,5"W, una altitud de 974 m.s.n.m, temperatura promedio 25°C, 83% de humedad relativa, suelos FrA, con un pH de 7.5.

Recolección y procesamiento de muestras

Dejando un margen de un metro desde el borde del cultivo se tomó como referencia dos zonas para la toma de muestra: la primera, por debajo del plástico de protección dentro de un perímetro de 20 cm alrededor de la plántula y la segunda, dentro del canal entre camas de siembra, tomando dos muestras aleatorias de cada zona. Se tomaron 300 gramos de suelo y se llevaron a laboratorio. Se preparó una solución inicial con 100g de suelo en 100mL de agua destilada estéril. Con esta muestra, se realizó un seriado de diluciones desde 10⁻² hasta 10⁻⁷. Se tomaron las últimas cuatro diluciones (10⁻⁴ a 10⁻⁷) y se sembraron en medio de cultivo Rosa Bengala vertiendo 1 ml. de la dilución y extendiéndolo por todo el medio con un asa Drigalsky de vidrio. Por cada dilución se hicieron 3 repeticiones.

2.3 Identificación macroscópica y aislamiento de *Phytophthora* spp.

Después de 7 días de incubación a 25°C, los hongos que crecieron sobre Rosa Bengala (ARB) se aislaron sembrándolos en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Las colonias obtenidas luego de 4 días de crecimiento en PDA se clasificaron por medio de una selección visual preliminar con base en las características de las colonias [14] y la identificación de estructuras reproductivas y vegetativas [42, 45].

Para las características microscópicas se hicieron montajes de micelio con tinción de azul de lactofenol en placas porta objetos y se observaron bajo un microscopio Nikon® Eclipse E200 con aumento de 100x. Las imágenes fueron tomadas con una cámara de la serie Optikam® Pro instalada en el microscopio y analizadas con el software Optika Visión® Pro 5 para realizar la medición de las estructuras encontradas.

Siguiendo las claves de identificación y guías de características morfológicas de *Phytophthora* [20, 18, 3, 2], se seleccionaron los hongos con colonias de color blanco o crema con crecimiento distintivo, presencia de hifas coraloides, hifas con hinchamientos, esporangios ovalados, oogonios y clamidosporas intercalares. Una vez identificados morfológicamente como *Phytophthora*, se sembraron en medio Agar Avena (A.A), Agar jugo V8 (V8A) y medio líquido de jugo V8 (V8L) para la formación de estructuras reproductivas mejor desarrolladas y hacer otras comparaciones con la literatura que cita características en otros medios de cultivo.

2.4 Evaluación patológica

2.4.1 Plantas a evaluar y pre-tratamiento

Para realizar las pruebas patogenicidad, se tomaron plantas de ají tabasco de 3 meses de edad con 6 a 8 hojas verdaderas y se sometieron a un pre-tratamiento en cámara húmeda por 48 horas. Para lograr este efecto, se regó el sustrato y se cubrieron las plantas con bolsas plásticas transparentes, (Figura 1a). El propósito de este pre-tratamiento fue crear un microclima propicio para el desarrollo de la enfermedad; una emulación de las condiciones que se dan en el campo después de una lluvia o en temporada húmeda, donde los patógenos desarrollan síntomas de las enfermedades.

2.4.2 Preparación del inóculo

Con la ayuda de un sacabocados #3, se tomaron discos de 5 mm de diámetro del borde de las colonias de *Phytophthora* aislados de las muestras de suelo y se sembraron por separado en medio de cultivo Agar Avena (medio A.Av.) con puntas estériles de palillos, incubándolos a 25°C hasta que el hongo colonizara por completo las puntas. (Figura 1b).

2.4.3 Inoculación

Una vez terminado el pre-tratamiento de las plantas, se realizó la inoculación siguiendo la metodología de inoculación de corona propuesta por Pochard et al. (1976) y Bartual et al. (1991) [29, 15, 13, 27] y modificándola según la inoculación con palillos propuesta por

Salazar et al. (1977) y De La Torre et al. (2009) [20]. Se realizó un corte transversal en el área inter-nodal entre la sexta y séptima hoja madura, donde se insertó la punta del palillo colonizado con micelio del patógeno. Se cubrió con cinta Parafilm®M (Laboratory Film - National American Can™) para evitar la desecación del inóculo (Figura 1c).

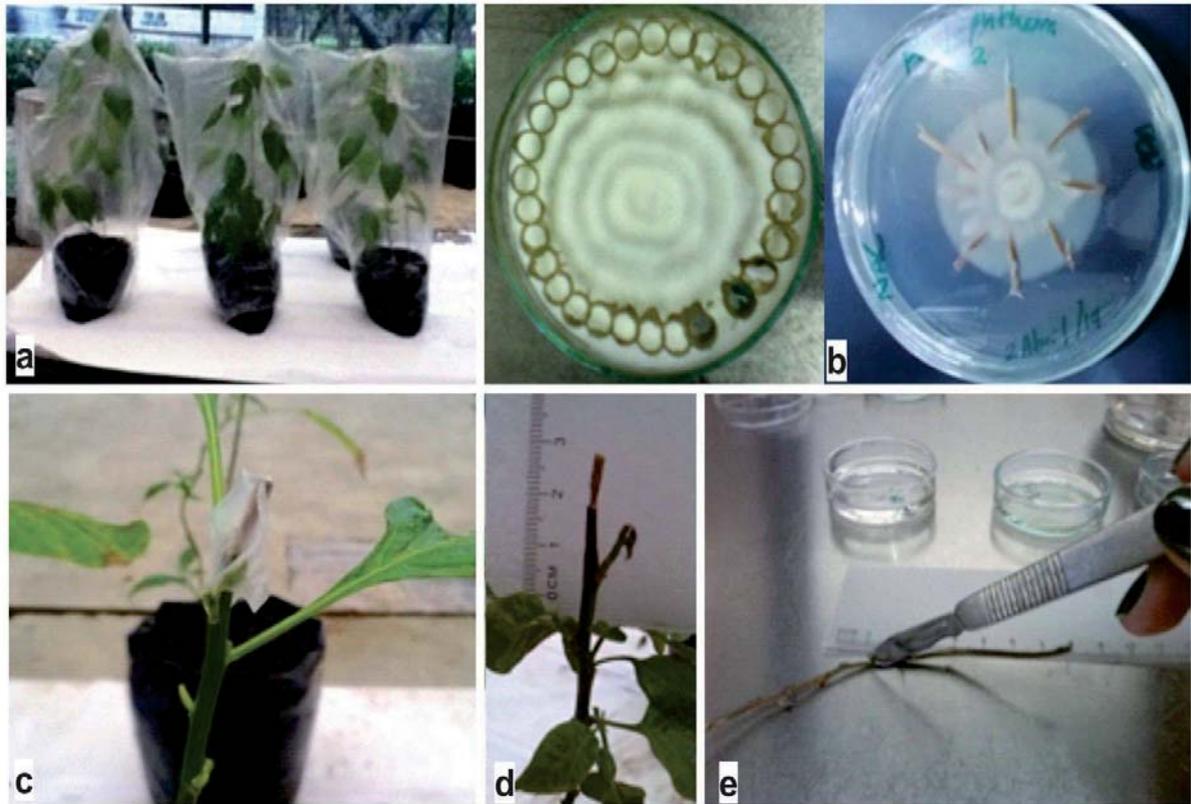


Figura 1. Evaluación patológica. A) pre-tratamiento de las plantas, B) puntas de palillos cubiertas por el hongo, C) inoculación, D) registro fotográfico y E) re-aislamiento.

2.4.4 Evaluación

A partir del tercer día de inoculación se procedió a llevar un registro del área afectada durante 20 días. Se evaluó la variable Avance Progresivo de la Infección (en milímetros) producido por el hongo en los días 3, 7, 10, 14, 17 y 21 posteriores a la inoculación [2], [27]. Se realizó registro fotográfico de la zona de inoculación, (Figura 1d). Las fotos fueron procesadas con el software ImageJ® para medir el avance de la enfermedad. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de los datos obtenidos con un intervalo de confianza del 95% en el programa Statistica® v7 para encontrar diferencias significativas entre los dos aislamientos a través del tiempo.

2.4.5 Re-aislamiento

Se realizó re-aislamiento de los hongos inoculados para confirmar la etiología de la enfermedad mediante los postulados de Koch siguiendo la metodología de Lucas et al. (2002), (Figura 1e). Los hongos que crecieron fueron observados al microscopio para comprobar que fueran *Phytophthora*.

2.4.6 Identificación molecular

Para la extracción del ADN genómico se empleó el PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO). El ADN extraído se amplificó empleando los cebadores ITS1 y ITS4 [49]. El coctel de la PCR se preparó con base en las concentraciones finales: buffer (10x), MgCl₂ (1.75 μ m), dntp's (20 μ m cada), primer (4 μ m cada uno), taq polimerasa (1 unidad). El programa utilizado en el termociclador fue: Fase de desnaturalización 95°C 5 min, fase de extensión (- 95°C 30 seg; - 54°C 40 seg; - 72°C 40 seg) y extensión final de 72°C por un período de 10 min. El programa fue igual para ITS, sólo se modificó la temperatura de 54°C a 52 °C.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas directamente con las secuencias depositadas en las bases de datos del GenBank, usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica, editadas de forma manual con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor [19] con el objetivo de eliminar y corregir los errores que se pudieran presentar en el proceso de secuenciación automática. La clasificación filogenética fue inferida mediante el método de máxima verosimilitud con el software PAUP versión 4.0b10. Se realizó una búsqueda heurística con diez repeticiones, el algoritmo de TBR (Tree-Bisection-Reconnection) fue usado para reajustar la topología (Branch-swapping), usando la herramienta BLAST.

3 Resultados

3.1 Identificación y aislamiento de *Phytophthora*

A partir de las colonias que crecieron de la siembra de diluciones de suelo en Agar Rosa Bengala, se lograron aislar 32 hongos en medio PDA. Se realizó la clasificación preliminar con base en las características de las colonias y las estructuras observadas al microscopio. Se encontraron dos hongos con características afines a *Phytophthora*: El primero se aisló de la concentración 10⁻⁴ de la muestra #1 de la zona del canal entre camas de siembra, denominado P1 y el segundo, en la misma concentración, pero de la muestra #2 de la zona dentro del perímetro de la plántula, denominado P2.

El aislamiento P1 mostró un crecimiento algodonoso no muy elevado, con circunferencias concéntricas que a medida que maduraba eran menos visibles hasta que la colonia quedaba algodonosa sin evidencia de circunferencias (Figura 2). En el caso de P2, la colonia mostró un crecimiento arrosado o en forma de crisantemo, concéntrico bien definido con puntas protuberantes (Figura 3). La velocidad de crecimiento en los medios de cultivo (ARB, PDA, A.Av, V8A) siempre fue más rápida para P2, con un máximo de 7 mm por día, mientras P1 tuvo un máximo de crecimiento de 4mm por día.

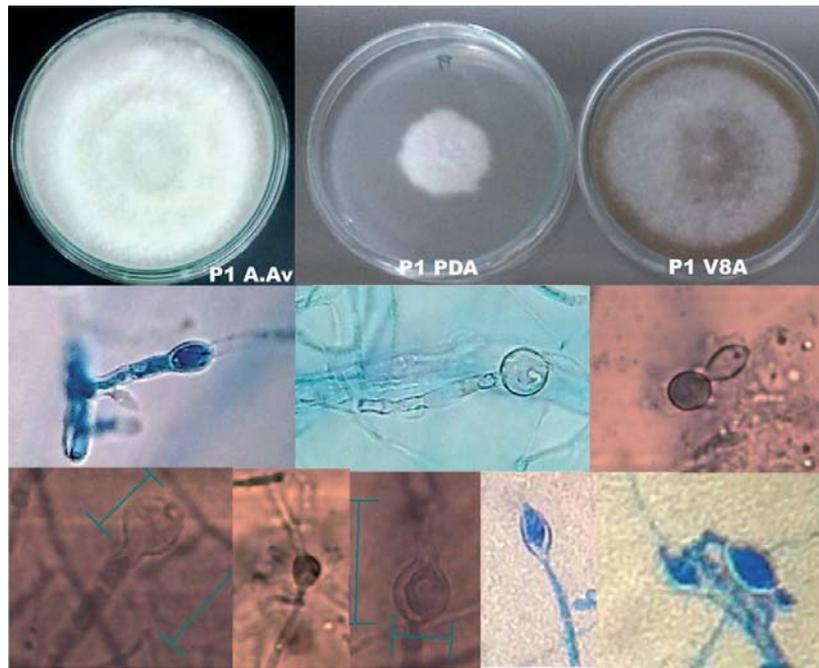


Figura 2. Características morfológicas del aislamiento P1. Crecimiento de las colonias 7 días después de la siembra en PDA, A.Av y V8A y estructuras observadas al microscopio.

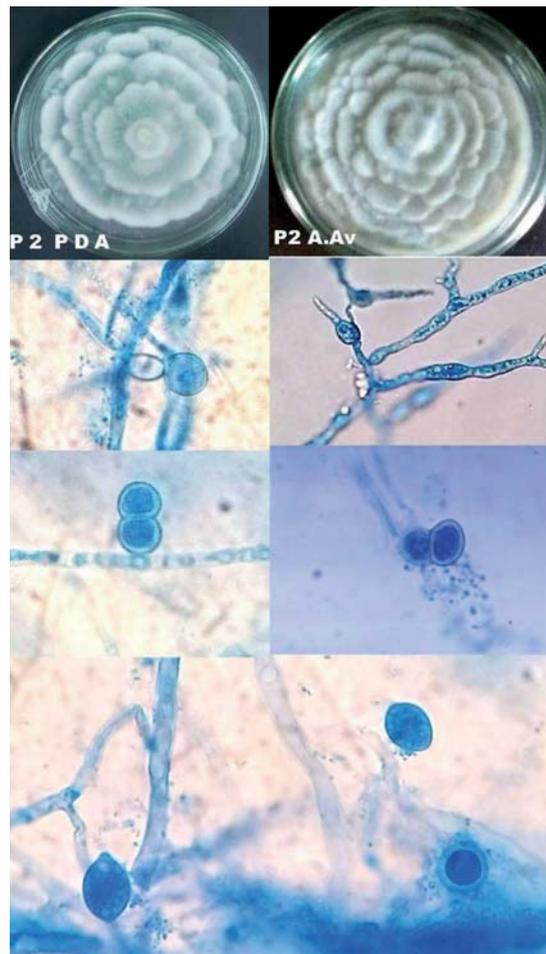


Figura 3. Características morfológicas del aislamiento P2. Crecimiento de las colonias 7 días después de la siembra en PDA y A.Av y estructuras observadas al microscopio

Del hongo P1 se obtuvieron esporangios ovoides alargados papilados con un promedio de 29,3 μm de largo y 14 μm de ancho, con Oogonios de entre 9 a 13 μm de diámetro y clamidosporas con pared delgada. Por otro lado, el hongo P2 generó esporangios ovoides no muy alargados alimonados y medianamente papilados, con longitudes de 11 a 54 μm de largo y de 9 a 36 μm de ancho, clamidosporas alrededor de 9,5 μm de diámetro y oogonios con oosferas con media de 37,3 μm de diámetro.

3.2 Evaluación patológica

El Avance de la enfermedad fue ligeramente diferente entre las cepas aisladas (P1 y P2), por ende el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los dos *Phytophthora* (Figura 4). De manera cualitativa, P1 mostró un comportamiento más homogéneo, con lesiones de 5 mm inicialmente en todas las repeticiones (R1–R4) y avanzando regularmente hasta llegar al desecamiento del tallo con lesiones de 21,5 a 33,4 mm (Figura 5a). Por otro lado, las plantas inoculadas con el hongo P2 mostraron diferentes longitudes del avance de la enfermedad desde el primer día de evaluación (día 3 post inoculación), con necrosis iniciales de 2 a 12 mm, hasta llegar a valores donde la diferencia máxima entre repeticiones fue de 21 mm (Figura 5b).

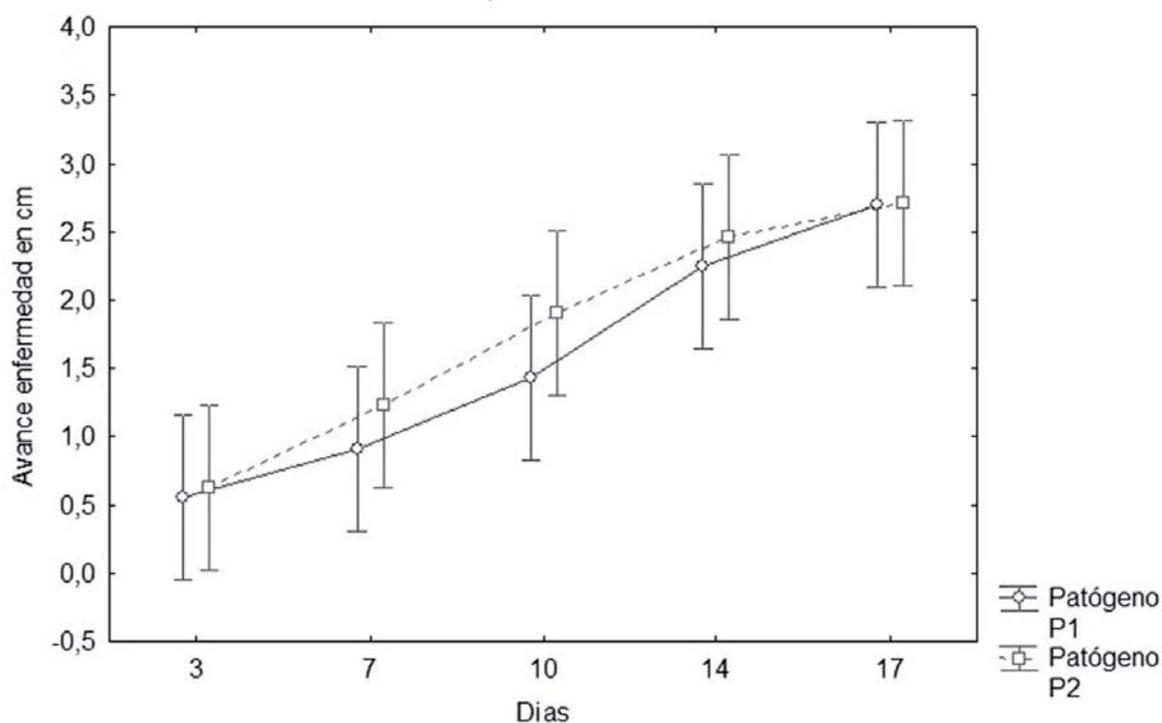


Figura 4. Análisis de varianza del avance de la enfermedad para P1 y P2. Intervalo de confianza del 95%.

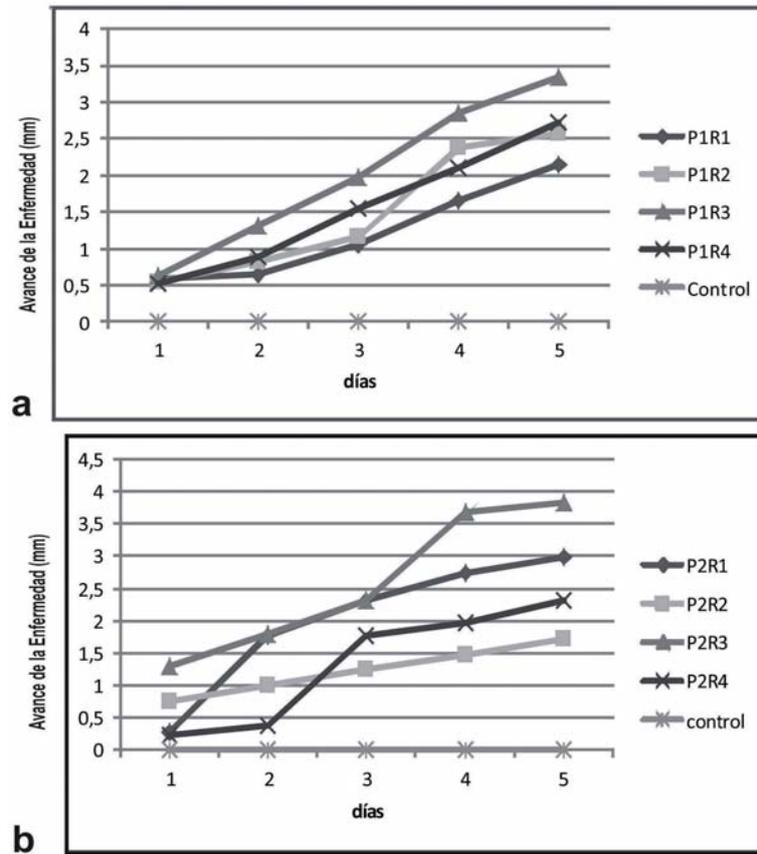


Figura 5. Gráfica del avance de la enfermedad para A) P1 y B) P2, durante los cinco días de evaluación. Cada hongo con cuatro repeticiones (R1 – R4).

3.3 Identificación molecular

El ADN amplificado con los cebadores ITS1 e ITS4, se visualizó en geles de agarosa al 1 %, los fragmentos amplificados mostraron diferentes tamaños: una de 530pb para P1 y 642pb para P2 (Figura 6a). Una vez determinadas, comparadas y alineadas las secuencias, se comprobó la relación de los hongos aislados con los datos de los representantes del género *Phytophthora* almacenados en GenBank. Se construyó un árbol de máxima verosimilitud tomando secuencias pertenecientes a diferentes especies del género *Phytophthora*, las cuales estaban representadas en los diferentes clados reportados para esta especie. El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue GTR+G con 0.3370 como parámetro alfa de la distribución gamma, las frecuencias nucleotídicas fueron T = 0.2942, C = 0.2189, A = 0.2225 y G = 0.2645.

El ADN amplificado con los cebadores ITS1 e ITS4 se visualizó en geles de agarosa al 1%, donde se presentaron dos bandas bien definidas y de diferentes tamaños: una de 530pb para P1 y 642pb para P2 (Figura 7a). Una vez determinadas, comparadas y alineadas las secuencias, se comprobó la relación de los hongos aislados con los datos de los representantes del género *Phytophthora* almacenados en GenBank, con lo que se generó el árbol de máxima verosimilitud, mostrando una relación del 99% con *Phytophthora cinnamomi* para P1, y para P2 una relación entre *Phytophthora infestans*, *tentaculata* y *nicotianae* (Figura 7b).

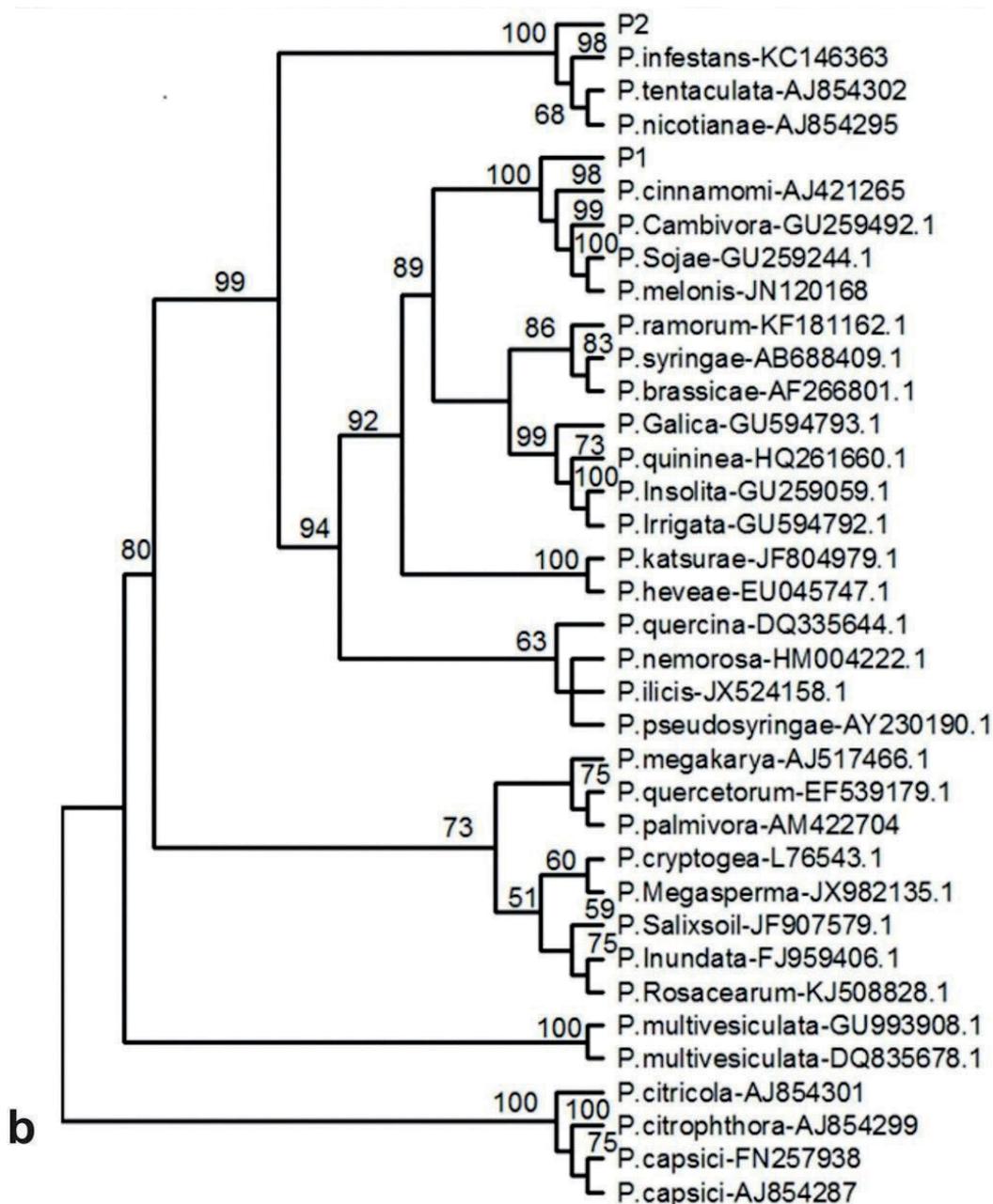


Figura 6. Amplificado en gel de agarosa y reconstrucción de la filogenia para los hongos aislados. Los valores mostrados corresponden al bootstrap de máxima verosimilitud entre los aislamientos y los datos almacenados en el GenBank. El porcentaje de similitud fue del 98% para P1 y para P2 tuvo una estrecha relación con el grupo perteneciente a *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae* y *P.tentaculata*.

4 Discusión

Por sus características de crecimiento en medio de cultivo, se pudo evidenciar una diferencia entre los dos hongos aislados, pero el mayor contraste se dio al comparar posteriormente sus estructuras al microscopio. Las características y mediciones de las colonias [48, 45] y de los esporangios [37, 14] son regularmente usadas para hacer la identificación de las especies de *Phytophthora*. Sin embargo, se encontraron varias discordancias entre la identificación dada únicamente con las características morfológicas y la identificación usando las claves con las características microscópicas [22]. Estos resultados demostraron la necesidad de hacer un acople de estas dos referencias junto con el análisis molecular. Aunque se han publicado varias claves sinópticas para identificar las especies de *Phytophthora* [14, 21] como la de la de Gallegly & Hong (2008), que compila 60 especies conocidas de *Phytophthora* junto con sus fotografías y pruebas de ADN, la identificación por morfología se considera difícil debido a las características variables que a menudo se superponen dentro y entre las especies [50]. Adicional a esto, hay que tener en cuenta que en el análisis de muestras vegetales y de suelo algunas especies de *Phytophthora* pueden no crecer en medios de cultivo, pero ser positivas en PCR y viceversa, como lo reportaron Blomquist et al. (2005) y Donahoo et al. (2006), atribuyéndole este suceso a que la PCR también podría detectar esporas que no son viables o que están en algún estado de dormancia.

En cuanto a las características macroscópicas de P1, su forma algodonosa, con crecimiento en aros concéntricos, se asemeja mucho a las características de *P. cinnamomi*, *P. megasperma*, *P. cambivora* y *P. nicotianae*, pero sus características microscópicas se acercan más a las tres primeras. Aunque se describe como no papilado, en el registro fotográfico de las observaciones al microscopio se puede diferenciar un engrosamiento apical que puede dar una apariencia de esporangios semipapilado, lo cual es aceptado para la clasificación. También puede verse una estructura que, aunque en un principio se consideró como una papila, en el movimiento de enfoque se precisó como una posible germinación o la liberación de una zoospora (Figura 3). Con el uso de las herramientas moleculares se logró relacionar a P1 con *P. cinnamomi*, consiguiendo separar P1 de *P. cambivora* con quien comparte muchas características y que, de hecho, se encuentra en el mismo clado que *P. cinnamomi* [38], [4]. Aunque la especie más reportada que afecta el ají es *P. capsici* [12, 6, 46], *P. cinnamomi* tiene el rango de huéspedes más amplio de cualquier especie de *Phytophthora* [38], ésta es especialmente asociada con enfermedades de las raíces de eucaliptos, robles, castaños, pinos y los miembros de la Ericaceae, así como diversos cultivos agrícolas. La severidad causada por *P. cinnamomi* no sólo se limita a la agricultura y horticultura, también se han visto afectados ecosistemas naturales de países como Australia, donde no se ha podido controlar desde que fue reportada por Zentmyer (1983). Los síntomas van desde la mortalidad de raíces finas que conduce a la disminución gradual del árbol a la ampliación de chancros basales, a menudo con “bleeding cankers” y muerte de los árboles. Sumando esto a la cualidad heterotálica de *P. cinnamom*, no se puede pasar por alto la probabilidad de estar implicadas en las enfermedades que se puedan dar en el cultivo de ají. La especie P1 (*P. infestans*) se encontró en suelo.

Para el caso del aislamiento P2, el registro fotográfico de las estructuras observadas al microscopio evidenció una condición de alta producción de estructuras de reproducción y de resistencia, que le aporta un carácter de alta patogenicidad. Las clamidosporas actúan

como semillas de propagación y son resistentes a condiciones adversas del ambiente como sequías, temperaturas bajas, falta de alimento, etc. Esto concuerda con las características fitopatológicas de las tres especies de *Phytophthora* a las que está emparentado en el árbol generado por el análisis molecular.

Para la cepa P2, que se encuentra en suelo con alta producción de estructuras de reproducción y de resistencia con características altamente patógenas, aunque se procuró hacer un análisis más detallado de los resultados microscópicos y moleculares, no se pudo establecer una especie definitiva para esta cepa, ya que la secuenciación no siempre resulta en distinciones claras cuando se analizan especies que están relacionadas estrechamente y otras pruebas moleculares podrían no ser específicas para una especie [8]. *Phytophthora* es un fitopatógeno muy importante que ataca una gran variedad de cultivos, árboles maderables y arbustos en el mundo entero [52, 28]. La condición heterotática de muchas especies es el mayor problema al que se enfrenta un investigador que pretende hacer un reconocimiento taxonómico de este grupo fitopatógeno. El cruce intra e inter específico genera diferentes aislamientos y variedades, a la vez que reafirma la resistencia a los diferentes métodos de control.

P2 se relaciona cercanamente a *P. infestans*, a la que se le atribuyen dos grandes desastres a nivel agrícola: la devastación de la papa [10, 16, 32] y el tizón tardío en cultivos de tomate. Aunque generalmente se considera que tienen una gama de hospedadores limitada y que es un patógeno casi biotrófico, se ha reportado que *P. infestans* causa la infección en un gran número de especies. Erwin y Ribeiro (1996) enlistaron 89 especies hospederas, pero más del 25% de éstas se incluyeron porque las inoculaciones artificiales resultaron en lesiones. En la agricultura, los dos hospederos más importantes son las papas y los tomates, pertenecientes a la misma familia del ají (Solanaceae), lo que abre la duda de su posible susceptibilidad a *P. infestans*. Aislamientos de *Phytophthora* relacionados cercanamente con *P. infestans* también se han encontrado en Sur América en otras solanáceas, como el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y especies silvestres [33]. Estos aislamientos son morfológicamente idénticos a *P. infestans*, pero representan genotipos nuevos basados en análisis de marcadores genéticos neutrales. Por esta razón, la taxonomía de estos aislamientos es indefinida, como podría ser el caso de P2.

Los resultados de este trabajo demostraron que a pesar de que la zona era relativamente nueva para el cultivo, en el suelo había presencia de estas dos especies de *Phytophthora* (P1 y P2) lo que podría considerarse como una gran amenaza a mediano y largo plazos, no solo para el cultivo de ají ya sembrado, sino para otras especies vegetales reconocidas por su susceptibilidad a este patógeno. Es importante considerar la posibilidad de contaminación cruzada por el movimiento que se puede dar de las estructuras de dispersión del patógeno (oosporas y zoosporas). Como lo han registrado varios autores [40, 24, 53], la mayoría de las especies de *Phytophthora* soportan un estado de quiescencia de hasta 6 años, en forma de micelio en suelos húmedos y como clamidosporas mientras el suelo tenga más de un 3% de humedad. También pueden sobrevivir como saprófitos con material vegetal en descomposición (sobrevivencia influenciada por el potencial de la matriz del suelo) y pueden sobrevivir en este sustrato por largos periodos [43]. Todo lo anterior hace de estos dos aislamientos de *Phytophthora* una amenaza latente para el cultivo ya presente y los posibles cultivos que le subsigan.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sistema General de Regalías por la financiación de esta investigación, la cual estuvo enmarcada en el macroproyecto “Desarrollo de un Sistema Agroindustrial Rural Competitivo a Partir de Cultivos Promisorios en una Bioregión del Valle del Cauca CI 767943” y al personal del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Biología de la Universidad del Valle.

Referencias bibliográficas

- [1] Babadoost, M. (2004). *Phytophthora blight: A serious threat to cucurbit industries*. Recuperado de <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Documents/2004/CucurbitPhytophthora>.
- [2] Bartual, R., Marsal, J. I., Carbonell, E. A., Tello, J. C., y Campos, T. (1991). Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 17(1), 3-124.
- [3] Biles, C. L., Bruton, B. D., Wall, M. M., y Rivas, M. (1995). *Phytophthora capsici*: zoospore infection of pepper fruit in various physical environments. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 75, 1-5.
- [4] Blair, J. E., Coffey, M. D., Park S. Y., Geiser, D. M., y Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 266-277.
- [5] Blomquist, C., Irving, T., Osterbauer, N., y Reeser, P. (2005). *Phytophthora hibernalis: A new pathogen on Rhododendron and evidence of cross amplification with two PCR detection assays for Phytophthora ramorum*. Recuperado de <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2010/Rhododendron/>
- [6] Bosland, P. W., y Lindsey, D. L. (1991). A seedling screen for *Phytophthora* Root rot of pepper, *Capsicum annum*. *Plant Disease*, 75, 1048-1050.
- [7] Candole, B. L., Conner, P. J., y Ji, P. (2012). Evaluation of *Phytophthora* root rot-resistant *Capsicum annum* accessions for resistance to *Phytophthora* foliar blight and *Phytophthora* stem blight. *Agricultural Sciences*, 3(5), 732 – 737.
- [8] Cooke, D. E. L., Schena, L., y Cacciola, S. O. (2007). Tools for detecting, identifying, and monitoring *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology*, 89, 13-28.
- [9] Corporación Colombia Internacional (CCI) (2007). Ají colombiano: Grandes oportunidades de mercado. *Sembremos*, 1, 7.
- [10] Cox, A. E., y Large, E. C. (1960). Potato late blight epidemics throughout the world. *Agriculture Handbook*, 174, 230.

- [11] De La Torre-Almaráz, R., Cota-Trujillo, F. M., García-Rojas, J. L., Campos, J. E., y San-Martín, F. (2009). Etiología de la muerte descendente del Mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. *Agrociencia*, 43(2), 197-208.
- [12] Donahoo, R., Blomquist, C. L., Thomas, S. L., Moulton, J. K., Cooke, D. E. L., y Lamour, K. H. (2006). *Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of azalea. *Mycological Research*, 110, 1309-1322.
- [13] Engelhard, A. W., y Ploetz, R. C. (1979). *Phytophthora* crown and stem rot, an important new disease of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*). *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 92, 348-350.
- [14] Erwin, D. C., y Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press. 562.
- [15] Ezziyyania, M., Requena, M. E., Pérez-Sánchez, C., y Candela, M. E. (2005). Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 27, 119-126.
- [16] Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W.,... Sandlan, K. P. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease*, 77(7), 653-661.
- [17] Gallegly, M. E., y Hong, C. (2008). *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. American Phytopathological Society Press.
- [18] Godinez-Regalado, L., y Rosales-Jimenez, V. (2008). *Determinación de la Patogenicidad de Cepas de Phytophthora cinnamomi en Plántulas de Aguacate Raza Mexicana*, (Tesis de posgrado). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
- [19] Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- [20] Hurtado-Tenorio, I. (2010). *Búsqueda de Resistencia a Phytophthora capsici Leonian en Germoplasma de Capsicum spp*, (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- [21] Ho, H. H. (1981). Synoptic keys to the species of *Phytophthora*. *Micología*, 73, 705-714.
- [22] Ho, H. H. (1992). Key to Species of *Phytophthora* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 1, 104-109.
- [23] Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2013). *Elaboración y Acompañamiento del Plan de Negocios para el Sector Hortofrutícola en Colombia, Fase IV, Plan de Negocios de Aguacate, Programa de Transformación Productiva, Fase 3: Diagnóstico del Sector en Colombia, Noviembre, 2013*. Disponible en: www.ptp.com.co/documentos/PLAN

- [24] Kanaskie, A., McWilliams, M., Goheen, E., Hansen, E., Sutton, W., y Reeser, P. (2007). Eradication of *Phytophthora ramorum* from Oregon Forests: Status after six years. Sudden Oak Death Science Symposium III, Santa Rosa, California, March 2007, pp. 5-9
- [25] Ko, W. (1998). Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. *Botanical Bulletin*, 39, 81-86.
- [26] Lamour, et.al (2006). A New species causing leaf blight of *Rhododendron*. *Mycological Research*, 10, 1309-1322.
- [27] Lefebvre, V., y Palloix, A. (1996). Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: A case study the interaction pepper – *Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical Applied Genetics*, 93, 503-511.
- [28] Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, 12, 401-408.
- [29] Longo, L., Galli, M., Haegi, A., Proietti, P., y Belisario, A. (2013). First Report of *Phytophthora nicotianae* causing wilting and desiccation on *Buxus sempervirens* in Italy. *New Disease Report*, 28, 5.
- [30] López-Riquelme, O. G. (2003). Chili: La especia del nuevo mundo. *Ciencias*, 69, 66-75.
- [31] Lucas, A., Colquhoun, I. J., Mc Comb, J. A., y Hardy, G. E. St. J. (2002). A New Rapid and Non-invasive technique to inoculate plants with *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Plant Pathology*, 31(1), 27-30.
- [32] Martin, F. N., Tooley, P. W., (2003). Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. *Mycological Research*, 107, 1379-1391.
- [33] Oelke, L., Bosland, P. y Steiner, R. (2003). Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 213–218.
- [34] Ogundiwin, E. A., Berke, T. F., Massoudi, M., Black, L. L., Huestis, G., Choi, D.,... Prince, J. P. (2005). Construction of 2 intra-specific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome*, 48, 698-711.
- [35] Ordoñez, M. E., Hohl, H. R., Velasco, J. A., Ramon, M. P., Oyarzun, P. J., Smart, C. D.,... Erselius, L. J. (2000). A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans*, attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology*, 90(2), 197-202.
- [36] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2006). Safety assessment of transgenic organisms. *OECD Publishing*, 821.

- [37] Pochard, E., Clerjeau, M., y Pitrat, M. (1976). La résistance du piment, *Capsicum annuum* L., à *Phytophthora capsici* Leon. I. Mise en évidence d'une induction progressive de la résistance. *Annual of Amélior Plantes*, 26, 35-50.
- [38] Programa de Transformación Productiva (PTP) (2013). Elaboración y Acompañamiento del Plan de Negocios para el Sector Hortofrutícola en Colombia, Fase IV, Plan de Negocios del Ají, Noviembre 2013. Disponible en: www.ptp.com.co/documentos/PLAN.
- [39] Ribeiro, O. K. (Ed.). (1978). *A source book of the genus Phytophthora*. Vaduz, Lichtenstein, Germany: In Cramer, J. Cornell University.
- [40] Robin, C., Smith, I., y Hansen, E.M. (2012). *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Phytophthoras*, 2(1). doi: 10.5399/osu/fp.2.1.3041
- [41] Rossman, A. Y., y Palm, M. E. (2006). Why are *Phytophthora* and other oomycota not true fungi?, ASDA Agricultural Research Service, ASDA Animal and Plant Health Inspection Service Systematic Botany & Mycology Laboratory. *American Phytopathology Society Press*.
- [42] Rytönen, A. (2011). *Phytophthora in Finnish nurseries*. *Dissertationes Forestales*. Recuperado de <http://www.metla.fi/dissertationes/df137.htm>
- [43] Salazar, F., y Vargas, E. (1977). Métodos de evaluación y niveles de resistencia en maíz a la pudrición de la mazorca causado por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía Costarricense*, 1(2), 93-99.
- [44] Sánchez, M. E., Ruiz, D., Pérez, A., Blanco, M.A., y Traperó, A. (1998). Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern of Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 347-357.
- [45] Shea, S. R., Gillen, K. J., y Leppard, W. I. (1980). Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm. sites in the northern jarrah forests of south-western Australia. *Protection Ecology*, 2, 135-156.
- [46] Small, E. (2009), Top 100 food plants. *NRC Research Press*, 636.
- [47] Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. y Hall, G. S. (1990). Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. *Mycological Papers*, 162.
- [48] Tabasco Mc Ilhenny Corporation Web site. (02,02,2015) <http://www.tabasco.com/tabasco-products/how-its-made/making-original-tabasco-sauce>
- [49] Tang, Q., Cui, L., Li, D., Dai, T., Yin, W., Dong, S., Xing, H., Zheng, X., y Wang Y. (2011). Resistance evaluation of soybean germplasm from Huanghuai region to *Phytophthora* root rot. *Agricultural Sciences in China*, 10, 246-251.

- [50] Truong, N., Liew, E., y Burgess, L. (2010). Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper in Vietnam. *Fungal Biology*, 114, 160-170.
- [51] Valdez, V. (1994). Cultivo de ají. Fundación de desarrollo agropecuario. Edición centro de información FDA. Boletín No. 20, pp. 22.
- [52] Waterhouse, G. M. (1963). Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*, 92.
- [53] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., y White, T. J. (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). New York, USA: Academic Press, Inc..
- [54] Widmer, T. L. (2010). Differentiating *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* from other species isolated from foliage of rhododendrons. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2010-0317-01-RS
- [55] Williams, N., Hardy, G. E. St. J., y O'Brien, P. A. (2009). Analysis of the distribution of *Phytophthora cinnamomi* in soil at a disease site in Western Australia using nested PCR. *Forest Pathology*, 39(2), 95-109.
- [56] Zentmyer, G. A. (1983). The world of *Phytophthora*. En Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P.H. (Ed.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*(pp. 392). St. Paul, MN: The American Phytopathological Society Press.
- [57] Zentmyer, G. A., y Mircetich, S. M. (1966). Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, Vol. 56, pp. 710-712. En: CABI/EPPO, 1998. Distribution maps of quarantine pests for Europe (edited by Smith, I. M. y Charles, L. M. F.). Data Sheets on Quarantine Pests, *Phytophthora cinnamomi* Wallingford, UK: CAB International, xviii, pp. 768.

Dirección de los autores

Natalia Aristizábal Castillo

Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia
nacsui88@gmail.com

Celina Torres G.

Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia
celina.torres@correounivalle.edu.co