

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y PATOGENICA
DE AISLADOS DE *Phytophthora capsici* Leonian EN AJÍ Y PIMENTÓN DE
ZONAS PRODUCTORAS DEL VALLE DELCAUCA**

ELIUD GARCIA BAQUERO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADOS

SEDE PALMIRA

2013

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y PATOGENICA DE
AISLADOS DE *Phytophthora capsici* Leonian EN AJÍ Y PIMENTÓN DE
ZONAS PRODUCTORAS DEL VALLE DELCAUCA**

ELIUD GARCIA BAQUERO

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias, Área
de Mejoramiento**

DIRIGIDO POR

CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA. P.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADOS

SEDE PALMIRA

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN FITOMEJORAMIENTO

En Palmira a los 18 días del mes de Junio de 2013, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores CARLOS HUERTAS DAVEY y MARIO AUGUSTO GARCÍA DÁVILA.

Para calificar la Tesis de Grado de:

ELIUD GARCÍA BAQUERO

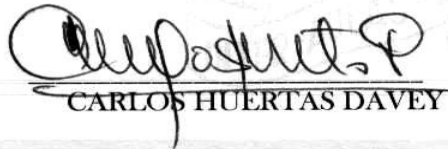
Titulada:

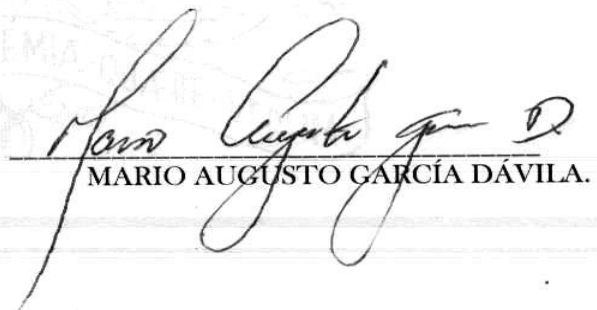
“Caracterización de la variabilidad genética y patogénica de aislados de *Phytophthora capsici* Leonian en ají y pimentón de zonas productoras del Valle del Cauca”. bajo la dirección del doctor Carlos Germán Muñoz, PhD.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores CARLOS HUERTAS DAVEY y MARIO AUGUSTO GARCÍA DÁVILA, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA


CARLOS HUERTAS DAVEY


MARIO AUGUSTO GARCÍA DÁVILA.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación « Mejoramiento genético, agronomía y producción de semillas de hortalizas»

Al grupo de investigación « En Diversidad Biológica»

A COLCIENCIAS programa Jóvenes Investigadores e Innovadores «Virginia Gutiérrez de Pineda 2010»

Al Departamento de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira (DIPAL).

Al Ministerio de Agricultura y desarrollo rural – Asohofrucol

La facultad y los jurados de tesis no se
harán responsables de las ideas
emitidas por el autor.

Articulo 24, resolución 04 de 1974

CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	16
1.1 Importancia del ají	16
1.2 Problemas de producción	20
REVISIÓN DE LITERATURA.....	22
2.1 Agente causal.....	22
2.2 Hospederos	25
2.3 Sintomatología	26
2.4 Epidemiología.....	27
2.4.1 Ciclo de vida.....	27
2.4.1 Diseminación.....	28
2.6 Diversidad genética de <i>P. capsici</i>	29
2.7 RAMS (microsatélites amplificados al azar)	30
2.8 Detección molecular de <i>Phytophthora capsici</i>	32
3METODOLOGIA	34
3.1 Ubicación geográfica.....	34
3.2 Obtención de aislamientos	34
3.3 Purificación de los aislamientos	36
3.4 Identificación y obtención de monozoosporicos	37
3.5 Conservación	38
3.6 Extracción de DNA	38
3.7 Identificación molecular de los aislamientos de <i>P. capsici</i>	39
3.8 Caracterización de los aislamientos de <i>P. capsici</i> microsatelites amplificados al azar (RAMs)	40
3.9 Análisis de datos	42
4. Evaluación la patogenicidad de los aislamientos de <i>P. capsici</i>	43
5. RESULTADOS	46
5.1 Obtención de la colección	46
5.2 Obtención del monozoospòrico	48
5.3 Identificación de <i>Phytophthora</i> empleando técnicas moleculares	50

5.4 Patogenicidad.....	59
5.5 Genotipificación por marcadores moleculares RAMs	64
5.6 Análisis descriptivo	66
5.7 Coeficiente de diferenciación genética (Fst).....	69
5.8 Distancia genética	70
5.9 Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	73
6. CONCLUSIONES.....	76
7. ANEXOS	77
8. BIBLIOGRAFIA.....	89

Lista de Tablas

Tabla 1. Principales productores de ají a nivel Mundial.....	17
Tabla 2. Área, Producción y rendimiento del cultivo de Ají en Colombia.....	18
Tabla 3. Principales diferencias entre los Oomycota en los Chromista y los hongos verdaderos (Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota)	23
Tabla 4. Aislamientos de <i>Phytophthora spp.</i>	35
Tabla 5. Condiciones del coctel de reacción para RAMs	41
Tabla 6. Perfil térmico para PCR – RAMs	42
Tabla 7. Numero de sustituciones por nucleótidos en sitios específicos entre las secuencias en la región ITS.....	59
Tabla 8. Características del cebador, número de bandas por cebador, heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para los 64 individuos de <i>Phytophthora spp.</i> evaluados.....	65
Tabla 9. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al Fst propuesta por Wright(1978).....	70
Tabla 10. Distancias genéticas obtenidas mediante el índice de Nei (1978) para las ocho poblaciones de <i>Phytophthora spp.</i> estudiadas.	71
Tabla 11. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de los ocho sitios de muestreo para <i>Phytophthora.</i>	73
Tabla 12. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de <i>Phytophthora</i>	75

Lista de figuras

Figura 1 Distribución por departamentos de la partición en la producción de ají en Colombia. (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural 2010)	19
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Phytophthora capsici</i> en ají (Ristaino y Johnston, 1999)	27
Figura 3 Inoculación de plantas, prueba de patogenicidad A: siembra variedad Cayenne (<i>Capsicum annum</i>) en bandejas de 128 alveolos, B: transplante plántulas 10 días después de la germinación, C: preparación inóculo con palillos de 1cm de largo, D: inoculación de palillos colonizados cuando las plantas se encuentran en prefloración, E: evaluación del avance de la enfermedad a lo largo del tallo.....	44
Figura 4 Distribución geográfica de los aislamientos de <i>Phytophthora capsici</i> colectados en el Valle del Cauca.....	47
Figura 5 Daños característicos de <i>Phytophthora capsici</i> en ají. A: necrosamiento desde la base del tallo, B: apariencia general de una planta enferma.....	48
Figura 6 Siembra de trozos de tallo colonizados por <i>P. capsici</i> . A: crecimiento selectivo de <i>P. capsici</i> , B: inhibición del crecimiento de otros hongos presentes en las muestras.....	48
Figura 7 Proceso para obtener monozoosporicos. A: corte trozos de medio colonizado para ser depositado en cajas petri; B: depositar semillas de ají; C: agregar 10ml de extracto suelo estéril; D: colocar las cajas en un recipiente rectangular de plástico; E: incubar a temperatura de laboratorio por 4 días; F: Observar esporangios al microscopio, objetivo 10x; G: esporangio lisado por efecto del stress por choque térmico; H: siembra con asa de transferencia bacterias sobre medio agar-agua; I: zoosporas enquistadas y germinadas; J: corte área circundante zoospora germinada; K: siembra en medio agar-avena.....	49
Figura 8 Identificación molecular de aislamientos de <i>Phytophthora</i> empleando los primer PCAP y ITS5, los cuales generan un fragmento de 894bp, y corte con la enzima MspI.....	50
Figura 9 Identificación molecular de aislamientos de <i>Phytophthora</i> empleando los primer A2 y I2, y la enzima de restricción MspI.....	51
Figura 10 Árbol filogenético de las secuencias analizadas por el método (neighbor-joining method) (Takamura y Kumar, 2004).	52

Figura 11 Alineamiento de secuencias del género <i>Phytophthora</i>	57
Figura 12 Dendrograma de análisis de medias Ward para patogenicidad total a los 21ddi.	63
Figura 13 Diversidad genética de la población de <i>Phytophthora capsici</i> en ají y pimentón en el Valle del Cauca.	68
Figura 14 Dendrograma por sitios de muestreo en el Valle del Cauca para la enfermedad causada por <i>Phytophthora capsici</i> en Ají y pimentón.	71
Figura 15 Porcentaje de variación del análisis de varianza molecular para los nueve grupos de <i>Phytophthora</i>	74

Lista de Anexos

Anexo 1. Análisis de varianza para la patogenicidad de la enfermedad causa por <i>Phytophthora</i> expresada como avance a través del tallo en cm. a los 21 días después de la inoculación.	77
Anexo 2. Medio de cultivo agar-avena selectivo	78
Anexo 3. Análisis de Duncan para detectar diferencias mínimas significativas a una probabilidad del 0,05%	79
Anexo 4. Promedio para los grupos de patogenicidad.....	80

RESUMEN

En ají y pimentón *Phytophthora capsici* es una de las enfermedades más limitantes a nivel mundial. En nueve municipios del Valle del Cauca (Roldanillo, Toro, Darién, La Unión, Palmira, Candelaria, Yumbo, Bolívar, y Yotoco) se obtuvieron 62 aislamientos de fincas productoras. La identificación de la especie se llevó a cabo usando los cebadores PCAP y ITS5 los cuales amplificaron un fragmento de 864bp, el corte con la enzima MspI generó cuatro fragmentos de 140, 194, 219, y 290bp, característicos de la especie *Phytophthora capsici*. Dos aislamientos del municipio de Darién (DR59 y DR60), no generaron el patrón de bandas característico para la especie *P. capsici*. Para corroborar estos resultados se emplearon los primers A2 y I2 los cuales amplifican un fragmento de 752bp, el corte con la enzima MspI generó cuatro fragmentos de 77, 204, 221, y 250bp lo cual permitió identificar 60 aislamientos como *P. capsici*. Los aislamientos de Darién (DR59 y DR60) al ser cortados con la enzima MspI mostraron tres fragmentos de 221, 250 y 281bp permitiendo identificarlos como *P. capsici*.

Los amplificados con los cebadores A2 y I2 para los aislamientos DR59, DR60, RD39, y YB41 se secuenciaron y se alinearon por el método CLUSTAL W con secuencias reportadas en las bases de datos para las especies *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. tropicalis*, y *P. mexicana*.

La patogenicidad se evaluó por el método de decapitación, los aislamientos fueron analizados mediante el agrupamiento de medias de Wards, formando cuatro grupos de patogenicidad. Estos resultados muestran que hay variabilidad en la capacidad para causar enfermedad entre los aislamientos por lugar de origen, y también variación en la patogenicidad dentro de cada sitio de muestreo.

Para determinar la variabilidad genética de los aislamientos se utilizó la amplificación aleatoria con cebadores microsatelites RAMs: AG, CA, CCA, GT, CGA.. El valor de heterocigosidad total fue de 0,276 lo cual sugiere que en las poblaciones evaluadas hay una diversidad genética intermedia, dato relacionado con el porcentaje de loci polimórfico, que para nuestro caso fue de 93,90%. El método de clasificación UPGMA mostró significancia entre los grupos geográficos, a un nivel aproximado de similitud de 0,70 se formaron cuatro grupos. El valor de F_{st} encontrado en este estudio fue de 0,2863 (D.S= 0,0254; 1000 repeticiones) lo que indica que existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones de *Phytophthora*. El análisis de varianza molecular para los grupos por sitio de colecta mostrò que existe un 46% variación entre los aislamientos de cada población. Esta variación podría indicar la existencia de subpoblaciones dentro de cada grupo. El 54% restante se debe al componente de varianza genética entre grupos, la cual fue significativa ($P > 0.010$), indicando que existe diferenciación genética entre los grupos de *Phytophthora* evaluados.

Palabras clave: *Phytophthora capsici*, RAMs, variabilidad genética, secuenciación, patogenicidad.

ABSTRACT

Phytophthora capsici from pepper and sweet pepper is one of the most important disease of the world. In nine locations from Valle del Cauca (Roldanillo, Toro, Darien, La Union, Palmyra, Candelaria, Yumbo, Bolivar, and Yotoco) were obtained 62 isolates producing fields. The identification of the species was carried out using primers ITS5 and PCAP, which amplified a 864bp fragment, cutting with the enzyme MspI generated four fragments of 140, 194, 219 and 290bp, characteristic of the species *Phytophthora capsici*. Two isolates from Darién (DR59 and DR60), did not generate the characteristic banding pattern for *P. capsici*. To confirm these results we used the primers A2 and I2 which amplify a 752bp fragment, cutting with the enzyme MspI generated four fragments of 77, 204, 221, and 250BP which allowed identifying 60 isolates as *P. capsici*. Darien isolates (DR59 and DR60) when cut with MspI enzyme showed three fragments of 221, 250 and 281bp provide for identification as *P. capsici*.

The amplified with primers A2 and I2 for isolates DR59, DR60, RD39, and YB41 were sequenced and aligned by CLUSTAL W method with sequences reported in the databases for the species *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. tropicalis*, and *P. mexicana*.

Pathogenicity was assessed by the method of decapitation, the isolates were analyzed by grouping Wards average, forming four groups of pathogenicity. These results show that there is variability in the ability to cause disease among isolates by origin, and variation in pathogenicity within each sampling location.

To determine the genetic variability of the isolates were used random amplified microsatellite (RAMs): AG, CA, CCA, GT, CGA. The results showed a Heterozygosity of 0.276 suggesting that there are populations evaluated genetic

diversity intermediate data related to the percentage of polymorphic loci (93.90%). The method of classification UPGMA showed significance differences between geographical groups, of similarity of 0.70 were formed five groups. The F_{st} value was 0.2863 (SD = 0.0254; 1000 replications) indicating that there is a high genetic differentiation among populations of *P. capsici*. The analysis of molecular variance for collecting site groups showed that there is a 46% variation between isolates of each population. This variation indicated the existence of subpopulations within each group. The remaining 54% is due to genetic variance component among groups, which was significant ($P > 0.010$), indicating that there is genetic differentiation between groups of *Phytophthora capsici* evaluated.

Keywords: RAMs, genetic variability, sequencing, pathogenicity.

1. INTRODUCCION

1.1 Importancia del ají

La comercialización de ajíes y pimentones ha registrado un crecimiento positivo a causa del aumento de la población, la demanda para la exportación y el significativo aumento en los usos industriales (Rodríguez, 2000).

Según FAO (2010), la superficie cultivada de *Capsicum* tanto en fresco como seco en el mundo está alrededor de 3.601.703 has, que representan una producción de 29.907.932,8 toneladas y un rendimiento promedio de 15.2 ton/ha. Asia es el continente donde más se lo cultiva, China, Indonesia son los principales países productores. En América, México es el principal productor. En África también se ubican grandes productores (Tabla 1).

Colombia esta sembrando ají para exportar en los departamentos de Magdalena, Valle del Cauca, Bolívar, La Guajira, Córdoba (Figura 1), en pequeña cantidad para mercados de Estados Unidos y México. Magdalena es el principal departamento productor con 843 hectareas y un rendimiento de 79Ton/ha, en segundo productor de ají es Bolívar con 367hectareas y 8,9Ton/ha, pero es el Valle del Cauca el que presenta los mayores rendimientos con 15,7Ton/ha y un área sembrada para el 2011 de 134 hectáreas (tabla 2).

Tabla 1. Principales productores de ají a nivel Mundial

País	Área cosechada (ha)	Producción (t)
China	652510	14026272
Indonesia	204048	1128790
Nigeria	92500	723000
Turquia	88000	1759224
Mexico	87863	1890428
Ghana	78000	279000
Etiopia	63800	138191

Fuente: FAOSTAT 2009

Tabla 2. Área, Producción y rendimiento del cultivo de Ají en Colombia

DEPARTAMENTO	2007			2008			2009			2010			2011		
	Área (Ha)	Produo. (t)	Rend (Kg/ha)	Área (Ha)	Produo. (t)	Rend (Kg/ha)	Área (Ha)	Produo. (t)	Rend (Kg/ha)	Área (Ha)	Produo. (t)	Rend (Kg/ha)	Área (Ha)	Produo. (t)	Rend (Kg/ha)
ANTIOQUIA				44	145	3.295	99	340	3.434	142	551	3.880	55	292	5.363
ATLÁNTICO	82	490	5.976	155	748	4.826	89	415	4.663	118	633	5.364	169	903	5.343
BOLÍVAR	413	2.840	6.877	333	2.269	6.814	487	3.865	7.936	553	4.322	7.816	367	3.280	8.937
BOYACÁ													15	73	4.867
CAUCA	8	22	2.750												
CESAR	85	866	10.188	65	694	10.760	78	832	10.667	15	120	8.000	39	138	3.538
CÓRDOBA	103	877	8.515	236	2.396	10.153	159	1.433	9.013	154	1.567	10.175	114	922	8.088
LA GUAJIRA	162	1.175	7.253	207	1.601	7.734	186	1.393	7.489	232	1.619	6.978	244	1.527	6.258
MAGDALENA	945	7.571	8.012	1.217	10.196	8.378	986	7.485	7.591	592	5.451	9.208	843	6.674	7.917
SANTANDER	15	79	5.267	28	140	5.000	17	78	4.588	24	112	4.667	8	32	4.000
SUCRE	156	1.379	8.840	189	1.224	6.476	122	889	7.287	66	577	8.742	57	563	9.877
VALLE DEL CAUCA	190	3.238	17.051	151	2.477	16.404	145	2.415	16.655	187	3.040	16.257	134	2.111	15.754
TOTAL	2.159	18.537	8.586	2.625	21.890	8.341	2.368	19.145	8.085	2.083	17.992	8.638	2.045	16.515	8.078

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2012)

El consumo de ají se ha incrementado y puede ser una importante fuente de vitaminas para la población mundial. Los antioxidantes de las vitaminas A, C y E están presentes en altas concentraciones en varios tipos de ají. El ají es una buena fuente de muchos de los nutrientes esenciales. El ají produce alta cantidad de vitamina C, provitamina A, E, P (citrina), B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), y B₃ (niacina) (Bosland y Votava, 2000).

No es sólo su calidad nutricional lo que hace al ají un alimento importante. Según Melgarejo *et al.* (2000), por su naturaleza medicinal el género posee propiedades terapéuticas: con frecuencia se utiliza para estimular el apetito, como diurético, para ayudar a desinfectar las mucosas y aliviar las molestias de algunas afecciones de las vías respiratorias.

MAYOR PRODUCTOR
DEPARTAMENTO: Magdalena
MUNICIPIO: Fundación



Departamento	Participación %
Magdalena	40,4
Bolívar	19,9
Valle del Cauca	12,8
La Guajira	9,2
Córdoba	5,6
Otros	12,1
Total	100,0

Información correspondiente al año agrícola



Figura 1 Distribución por departamentos de la participación en la producción de ají en Colombia. (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural 2010)

1.2 Problemas de producción

Las enfermedades y plagas son la limitante primaria de la producción del ají y el pimentón. El ají es susceptible a varias enfermedades y plagas las cuales pueden reducir la producción y calidad de los frutos (Bosland y Votava, 2000).

Según Pardey (2008), el cultivo de *Capsicum* presenta una serie de enfermedades limitantes causadas por hongos bacterias y virus. Las producidas por hongos y bacterias se hacen agresivas especialmente en periodos de lluvias.

Dentro de las enfermedades que afectan el cultivo de ají y pimentón en el Valle del Cauca se encuentra la causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian, una de las mas importantes enfermedades del ají (Silvar *et al.*, 2005)

La marchitez causada por *Phytophthora capsici* es una enfermedad de importancia económica a nivel mundial. En las zonas productoras de ají para exportación en el Valle del Cauca, este oomicete se ha convertido en una de las principales limitantes para el cultivo de ají, debido a que es capaz de infectar virtualmente cualquier parte de la planta, atacando raíces, tallos, hojas y frutos, y su control es muy deficiente. Actualmente no existen en el mercado nacional cultivares con resistencia efectiva contra esta enfermedad.

El desarrollo de cultivares que posean resistencia genética durable proporciona la mejor perspectiva para un control seguro eficiente, económico, y ambiental contra *Phytophthora* (Paz, 2004). De esta forma el mejoramiento genético es una alternativa viable para reducir el efecto negativo del patógeno en la producción de ají y pimentón. El programa de Mejoramiento genético, agronomía y producción de semillas de Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia, en proyectos de mejoramiento para resistencia a *P. capsici* en ají y pimentón ha obtenido aislamientos de diferentes zonas productoras en el Valle del Cauca.

De ahí la importancia de conocer la diversidad de este microorganismo ya que esto posibilitará planear estrategias de manejo de la enfermedad y será pieza clave para optimizar el programa de mejoramiento de ají y pimentón.

Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar la variabilidad de aislamientos del oomiceto, en el Valle del Cauca, y específicos identificar molecularmente las especies de *Phytophthora* causantes de la enfermedad en ají y pimentón, caracterizar la variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora capsici*, colectados en cultivos de ají y pimentón en el Valle del Cauca, y evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *P. capsici*.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Agente causal

El tizón causado por *Phytophthora capsici*, es una enfermedad devastadora en ají. *P. capsici* fue primero descrita por Leonian en 1922 en ají en Nuevo México. Esta enfermedad fue subsecuentemente reportada en muchas otras áreas del mundo donde se siembra ají, causando pérdidas de producción hasta del 100% (report on *Plant Disease*, 2001).

Nueva Clasificación Taxonómica de *Phytophthora capsici*

Reino: Chromista

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora capsici*

Fuente: Catalogue of life 2013

Los oomycetes, están más relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de

naturaleza diploide. Son conocidos como organismos “heterocarintes”, lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo u adornado con nastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y un flagelo más corto, delgado, cilíndrico y en forma de látigo o flecha (Jaramillo, 2003).

Los oomycota han sido considerados hongos porque ellos obtienen sus nutrientes por absorción y muchos de ellos producen hilos filamentosos conocidos como micelio característico de muchos hongos. Los oomycota son ahora clasificados como un grupo distinto basados en un número único de características (Tabla 3). Todos los miembros de los oomycota experimentan reproducción oogama, lo cual significa que las oosferas diploides son producidas como cigotos seguidos de la fertilización de las oosferas haploides por los gametos haploides. Estas oosferas pueden ser largas y solitarias o pequeñas y numerosas dentro del oogonio (Rossman y Palm, 2007).

Tabla 3. Principales diferencias entre los Oomycota en los Chromista y los hongos verdaderos (Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota)

Carácter	Oomycota	Hongos verdaderos
Reproducción sexual	Heterogamantangia, fertilización de oosferas por núcleos del anteridio formando oosferas	No producen oosferas ; la reproducción sexual resulta en zygosporas, ascosporas o basidiosporas
Estado nuclear del micelio vegetativo	Diploide	Haploide o dikariótico

Composición de la pared celular	Beta glucanos, celulosa	Quitina, raramente celulosa esta presente
---------------------------------	-------------------------	---

Tipos de flagelos en las zoosporas, si son producidos	Heterokonte, de dos tipos, uno de movimiento orientado posteriormente, la otra fibrosa, ciliada, orientada posteriormente	Si producen flagelos, generalmente de un solo tipo: posterior, de movimiento
---	---	--

Mitocondria	Con cristales tubulares	Con cristales planos
-------------	-------------------------	----------------------

Rossmann y Palm, 2007

Todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo, de paredes paralelas o irregularmente calibradas, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. El micelio es cenocítico, observándose solo raramente la presencia de algunos tabiques que normalmente se encuentran separando las partes viejas carentes de protoplasma (Boccas y Lavilla, 1976; Waterhouse, 1963; citado por Echemendía, 2007).

Los esporangios de varias especies de *Phytophthora* varían bastante en la forma, usualmente son ovoides-elipsoides a piriformes (Hermes, 1987), según Islam et al. (2005), el rango medio de la longitud de los esporangios de *P. capsici* se encontró entre 42.2 a 55.4µm, y el rango medio del ancho de los esporangios varió desde 24.0 a 39.1µm. La relación longitud/ancho del esporangio varió desde 1.3 a 1.8 entre los 57 aislamientos evaluados.

Las zoosporas son básicamente de forma ovoide y poseen una ranura que la atraviesa longitudinalmente la zoospora desde punta anterior hasta rodear la parte posterior de la célula. Esta ranura es superficial hacia cada final y más profunda en el centro de los dos flagelos (Hermes, 1987), ya que las zoosporas son biflageladas, el flagelo anterior es plumoso y el flagelo posterior es liso (Carlile, 1987).

Las clamidosporas desarrolladas por *Phytophthora* por expansión esférica de algunos tipos de hifas o por una hinchazón localizada de una hifa tubular para producir un espora Terminal o intercalaría de un rango de 8 a 15µm de diámetro. Las clamidosporas pueden ser producidas individuales, en cadena, o el clusters intercalados con hifas hinchadas no diferenciadas (Hermes, 1987). Islam et al. (2005) encontró para *Phytophthora capsici* clamidosporas individuales, terminales, o intercaladas, de color amarillo pálido. El diámetro de las clamidosporas estuvo entre 20 a 27.5µm. El grosor de la pared de las clamidospora estuvo entre 2 a 2.5µm.

2.2 Hospederos

Phytophthora capsici puede infectar gran variedad de plantas cultivadas, ornamentales, forestales, y de malezas pertenecientes a diversas familias de plantas, Tian y Babadoost (2004), evaluaron 45 especies de plantas, encontrando 22 especies de plantas cultivadas y 2 especies de malezas exhibiendo síntomas de dampingoff. Todas las *Cucurbitáceae* y *Solanaceae*, y la mayoría de las plantas de *Chenopodiaceae*, evaluadas presentaron síntomas de la enfermedad. Siendo las *Cucurbitaceas* y el ají las más susceptibles a *P. capsici*, con más del 50 y 95% de sus plántulas infectadas y desarrollando síntomas dentro de los 3 y 12 días después de la inoculación, respectivamente. La infección en remolacha, zanahoria, berenjena, frijol verde, frijol blanco,

hierba mora, rábano, arveja, espinaca, acelga, tabaco, tomate, nabo, y hojas de terciopelo desarrollaron síntomas leves. Sin embargo, más del 50% de las plántulas de estos cultivos desarrollaron síntomas dentro de los 12 días después de la inoculación. La cebolla fue la menos susceptible. Algunos forestales y arboles de navidad (*Abies fraseri*) típicos de norte America también son infectados por *P. capsici* (Quesada, 2009), la especie *Epipremnum aureum* fue reportada por Wick y Dicklow como nuevo hospedero de *P. capsici* en 2002, en geranio por French *et al.* (2006).

2.3 Sintomatología

P. capsici es capaz de infectar virtualmente cada parte de la planta de ají. El patógeno causa pudrición de la raíz y de la corona en ají y forma lesiones negras distintivas en el tallo. El patógeno también puede infectar las hojas y causar lesiones que son circulares, marrón grisáceo y lesiones húmedas (Ristaino y Johnston, 1999). En todos los hospederos afectados por la pudrición de la raíz causada por *Phytophthora*, muchas de las raíces pequeñas mueren, mientras que las raíces grandes muestran lesiones necróticas cafés. En plantas jóvenes o en plantas suculentas viejas todo el sistema de raíces se debilita, seguido por una muerte más o menos rápida de la planta (Agrios, 2005). En especies menos susceptibles se presenta retraso en el crecimiento, llagas, y anillado (Granke *et al.*, 2012).

2.4 Epidemiología

2.4.1 Ciclo de vida

P. capsici produce esporangios caducos que pueden ser dispersados por el viento-lluvia o liberar de 20 a 40 zoosporas móviles en presencia de agua libre en la superficie. La fase policíclica del desarrollo de la enfermedad se piensa está dirigido principalmente por la dispersión de esporas asexuales a una escala local (dentro y entre los surcos) (Lamour y Hausbeck, 20002).

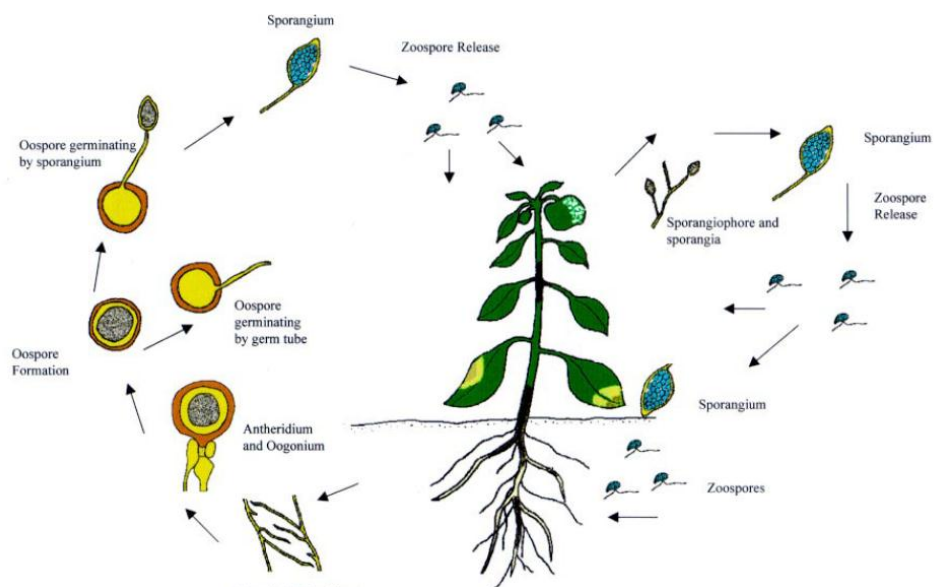


Figura 2 Ciclo de vida de *Phytophthora capsici* en ají (Ristaino y Johnston, 1999)

Los esporangios pueden germinar directamente, formando hifas que penetran la superficie del hospedero. Los esporangios de la mayoría de los oomicetos, incluyendo ambos patógenos de hojas y de raíces, son capaces también de germinar indirectamente, produciendo zoosporas móviles que inician la interacción con la planta (Hardham, 2007).

Phytophthora tiene un genoma diploide (Rossman y Palm, 2007; Bartual et al. 1991), la reproducción sexual requiere de ambos tipos de apareamiento A1 y A2, para completar el estado sexual (Hausbeck y Lamour, 2004; Lamour y Hausbeck, 2002; Bartual et al., 1991). Cada tipo de apareamiento produce hormonas que son responsables de la diferenciación de los gametangios en tipos de apareamiento opuestos, produciendo un gametangio masculino, llamado anteridio, y uno femenino, llamado oogonio. La meiosis ocurre dentro del gametangio, y la plasmogamia y kariogamia resulta en la formación de oosporas, las cuales son esporas sexuales (Ristaino y Johnston, 1999).

2.4.1 Diseminación

El patógeno puede dispersarse por varios mecanismos distintos de acuerdo con Ristaino y Johnston (1999), incluyendo movimiento de inoculó primario desde la raíz a otras raíces cercanas vía i) crecimiento de la raíz hacia el inoculó, ii) movimiento del inoculo hacia la raíces, iii) contacto raíz a raíz (Ristaino y Johnston, 1999). El inoculó también puede dispersarse en la superficie del agua, o el inoculo puede ser dispersado por la salpicadura desde el suelo a las hojas, tallos, o frutos. La dispersión aérea de lesiones esporuladas en tallos, hojas o frutos también puede ocurrir en este patosistema.

El oomiceto produce esporangios asexuales, en aquellas especies en las cuales los esporangios son dehiscentes (caducos), ellos pueden ser transportados grandes distancias con el viento y, como ejemplo la rápida dispersión de *P. infestans* a través de Europa en 1800, son propágulos efectivos de diseminación (Hardham, 2007).

2.5 Variabilidad patogénica de *P. capsici*

Islam et al. (2005) estudiaron 57 aislamientos de *P. capsici* colectados de 22 campos de calabazas en seis ciudades en el centro de Illinois durante el

periodo comprendido entre 2000-2001. Los resultados de este estudio mostraron diferencias significativas en virulencia entre los aislamientos, el análisis de Cluster separó 24 aislamientos de *P. capsici* en seis grupos RAPD, los cuales correspondieron a seis grupos de patogenicidad. No se encontraron relaciones significativas entre ambas virulencia o genéticas de los aislamientos y las localidades. Probablemente porque la zona de estudio se encontraba localizada dentro de aproximadamente 30Km a la redonda.

En Korea nueve aislamientos de *P. capsici* provenientes de calabazas y ají de diverso origen geográfico, incluyendo Korea, Francia, Italia, y Estados Unidos, fueron evaluados en nueve cultivares de calabaza Koreanos y Japoneses bajo condiciones controladas. Se encontró diferencias significativas entre la patogenicidad de los aislamientos, los aislamientos de calabaza P98130, P98131, y P98132 fueron más patogénicos que los aislamientos provenientes de ají; lo cual sugiere que los aislamientos provenientes de calabaza pueden poseer factores de virulencia específicos para la interacción de calabaza en comparación con ají (Kook et al., 2001).

2.6 Diversidad genética de *P. capsici*

Investigaciones moleculares significantes en la diversidad genética de *P. capsici* no se registran en la literatura hasta pasados los 80s y principios de los 90s, cuando análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de ambos DNA mitocondrial y nuclear fue conducido en aislamientos de localidades geográficas ampliamente diferentes, años, y hospederos localizado en colección de cultivo de *Phytophthora* de todo el mundo de la Universidad de California Riverside (Forster et al., 1989; Mchau et al., 1995; Oudemans et al.; 1991; citado por Hausbeck y Lamour, 2004).

En el suroeste de Michigan una zona con historial de siembra de ají, calabazas y zuquinis, se realizó un experimento para estudiar la dinámica de la

insensibilidad al mefenoxamen una población recombinante de *Phytophthora capsici* caracterizada por marcadores AFLP. La población consistió de 403 aislamientos colectados durante tres años, 1998, 1999, y 2000. Los resultados obtenidos por Lamour y Hausbeck (2001), sugieren que la recombinación sexual impacta significativamente la estructura de las poblaciones de *P. capsici*, al encontrar que AFLP multilocus únicos en genotipos los cuales son consistentes con un alto nivel de diversidad genotípica, indicando esto que la recombinación genética juega un papel importante en mantener la diversidad genotípica y de genes.

Seis sitios a lo largo del sistema de ríos en el suroeste de Michigan, en una región con 40 años de historia de producción de pepino. 211 aislamientos de *P. capsici* fueron colectados durante un periodo de 4 años, usando un par de primers los E-12/M-21, un total de 27 marcadores AFLP reproducibles fueron generados. 16 de los marcadores fueron polimórficos y otros 11 estaban presentes en todos los aislamientos (monomórficos). La genotipificación de AFLP reveló que en todos los marcadores monomórficos encontrados en este conjunto de datos son comunes en aislamientos conocidos de *P. capsici* soportado por la identificación morfológica de la especie de los aislamientos de este estudio. El fingerprinting genético de los aislamientos de *P. capsici* colectados de sitios de agua monitoreados desde 2002 a 2004 no indicaron una asociación entre grupos de similaridad y las localizaciones específicas, o años de colecta. Tres grupos de similaridad (con 80% de similaridad) se originaron en el análisis de Cluster de 56 aislamientos (Gevens et al., 2007).

2.7 RAMS (microsatélites amplificados al azar)

Los microsatélites son regiones de secuencias de ADN pequeñas y repetidas, generalmente de dos a tres nucleótidos, los cuales pueden o no estar asociadas con genes. Dado que la repetición por si misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de

secuencia. Estas regiones son a menudo altamente variables y muy útiles para medir similitudes entre especies o variedades relacionadas. (Henriquez, 2003). Los RAMs se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método es altamente reproducible y permite la detección de polimorfismos en el ADN intra e interespecifico. Los fragmentos de ADN amplificados en la reacción están compuestos de dos microsatelites suficientemente cercanos para amplificar por PCR el área entre ellos. (Muñoz *et al.*, 2008).

La base genética de estos marcadores es la misma de los RAPD, es decir, utiliza un solo primer de secuencia arbitraria, por lo cual la secuencia blanco también es desconocida; difiere de los RAPD porque estos tienen menor tamaño del cebador que los RAM. Al igual que los RAPD, los RAM detectan un solo alelo por locus. El poder de resolución de los marcadores genéticos esta determinado por el nivel de polimorfismo que puede detectar. Esto se ve afectado principalmente por la frecuencia de mutación en los sitios del genoma involucrados. Como el rango evolutivo entre los microsatelites es considerablemente mas alto que la mayoría de los otros tipos de ADN, hay gran probabilidad de hallar polimorfismo mediante los RAM que por otras técnicas, incluyendo los RAPD. . (Muñoz *et al.*, 2008).

Los Microsatelites Amplificados al Azar (RAM) se utilizan en caracterización de diversidad genética en microorganismos, animales y plantas. Se estudian poblaciones, se muestra la base de la variación de los individuos, se permite seleccionar regiones del ADN, se permite analizar la información que se expresa y la que no se expresa ya que el número de polimorfismos detectable es teóricamente ilimitado. Además la técnica no requiere estimación exacta de la cantidad del ADN antes de la reacción, la cual es útil cuando se analizan grandes tamaños de muestra. La metodología se ajusta para pequeños laboratorios en términos de equipos y facilidades de costo, no requiere conocimiento previo de secuencias ni uso de isotopos radioactivos. (Muñoz *et al.*, 2008).

En décadas recientes, los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados para medir la variación dentro de una población de patógenos. La Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), secuencias simples repetitivas (Microsatelites), inter secuencias simples repetitivas (ISSR), Microsatelites amplificados al azar (RAMs), Fragmentos polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), DNA genómico y Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Son algunos de los marcadores empleados para caracterizar la diversidad de *Phytophthora capsici*. (Truong *et al* 2010; Silvare *et al* 2006; Gevenset *et al.* 2005; Jantula *et al.* 1997)

2.8 Detección molecular de *Phytophthora capsici*

La identificación convencional de *Phytophthora capsici* conlleva una ardua tarea que empieza con la elección del medio de cultivo semi-selectivo (Smart *et al.* 2000, Erwin y Ribeiro 1996, Tay *et al.* 1983, Masago *et al.* 1977, Papavizas *et al.* 1961). Inicialmente la forma de la colonia da una aproximación a los investigadores del tipo de microorganismo, pero dado que es muy difícil encontrar estructuras reproductivas en medios de cultivo, hay que recurrir a medios y condiciones especiales de crecimiento para producir estructuras que permitan el uso de claves taxonómicas para determinar la forma y tamaño de los esporangios, producción de clamidosporas, caducidad de los esporangios, formación de oosporas, posición del anteridio, temperatura cardinal, entre otras (Waterhouse *et al.* 1983). Lo cual hace de la identificación una labor intensa, que requiere mucho tiempo y posiblemente no se logre establecer con certeza la identidad taxonómica del patógeno.

En la actualidad las técnicas moleculares permiten realizar un diagnóstico más rápido y confiable que el simple hecho de observar al microscopio características fenotípicas variables. La PCR ha permitido acelerar este proceso y empleando primers especie específicos que amplifican regiones del DNA ribosomal, que en los oomicetos consiste de una subunidad pequeña

5,8s, y una subunidad grande separada por espacios de transcripción interna, el ITS 1 y el ITS2, la cual evolutivamente es una región muy conservada. Hace posible la distinción entre especies de *Phytophthora*, aun entre las más estrechamente relacionadas. (Drenth *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006; Silvar *et al.* 2005). Se han desarrollado diferentes primers para la identificación de la especie *Phytophthora capsici*, entre ellos CAPFW, CAPRV1, y CAPRV2; PCAP y ITS5, I2, y A2, PC-1, y PC-2 (Drenth *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006; Silvar *et al.* 2005, Ristaino *et al.* 1998), los cuales amplifican fragmentos de DNA ribosomal de variados pesos moleculares, permitiendo diferenciar a *P. capsici* de otras especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*.

Más recientemente la secuenciación de bases claramente permite la distinción entre especies estrechamente relacionadas, por ejemplo entre *Phytophthora ipomoeae*, *P. infestans*, *P. mirabilis*, *P. phaseoli* (Flier, GWilbert *et al.* 2002). Estas secuencias son analizadas en las diferentes bases de datos disponibles en la web, como BLAST, GenBank, *Phytophthora* ID, y *Phytophthora* database.

3 METODOLOGIA

3.1 Ubicación geográfica

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira y en los invernaderos de la misma, ubicada en el municipio de Palmira, carrera 32, Vía candelaria.

3.2 Obtención de aislamientos

Los aislamientos se colectaron durante el periodo de 2008 a 2009 en fincas cultivadas con Aji y Pimentón en el Valle del Cauca.. En total se seleccionaron 64 aislamientos, provenientes de 9 zonas productoras de aji en el Valle del Cauca (tabla 4).

En diferentes regiones visitadas se tomaron muestras de daños característicos de la enfermedad causada por *Phytophthora* spp. las cuales fueron llevadas en bolsas de papel e introducidas en cajas de icopor, debidamente rotuladas (municipio, vereda, finca, nombre del agricultor, coordenadas, cultivar).

Tabla 4. Aislamientos de *Phytophthora capsici*.

Numero de aislamientos	Municipio	corregimiento	coordenadas	Cultivo
9	Yumbo	San José		Ají
4	La Unión	Vía a Toro: Finca la Tejeda	N 04°33'46", W 076°03'48"	Pimentón
15	Roldanillo	Santa Rita	N 04°26'06,7", W 76°07'25,3"	Ají
2	Darién	San José: Finca la Cabaña	N 03°56'50,8", W076°29'22,8"	Ají
18	Yotoco	Media Canoa	N 03°54'04,4", W076°22'40,6"	Pimentón
2	Toro			Pimentón
5	Candelaria	CEUNP	N 03°25'36,2", W 076°25'48,3'	Ají
5	Bolívar	Cantabria- Guacas	N 04°22'33,4", W076°14'17,4"	Pimentón
4	Palmira	Corpoica	N 04°22'24,6", W076°14'41,9"	Ají

Una vez en el laboratorio las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Se realizó limpieza con bisturí de, tejido enfermo (raíces, tallos frutos), procurando retirar la epidermis.
2. Luego se realizaron cortes de tejido en la interface tejido sano- tejido enfermo, en forma de bisel de 0,2cm ancho por 0,5cm de largo. Los cuales fueron introducidos en un beaker de 50ml el cual contenía agua destilada.
3. Posteriormente las muestras se sometieron a desinfección con agua de la llave por espacio de 20min. Cubriendo el beaker con una malla, para evitar la pérdida de las muestras.
4. En el mismo beaker una vez retirado el exceso de agua se agregó Hipoclorito al 0,5% por 2min.
5. Se retiró el hipoclorito y se agregó alcohol al 35% por 2min.
6. Enseguida se procedió a realizar 3 lavados con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar.
7. Las muestras fueron entonces secadas con papel toalla y depositadas en otra toalla seca, esparciendo las muestras lo más separadas posible por 15min.

La siembra se realizó en medio de cultivo agar-avena selectivo (anexo 2), incubando las cajas petri a temperatura del laboratorio. Las observaciones se realizaron a los 3 días después de la siembra, el medio agar-avena presentó una alta selectividad para el género *Phytophthora*.

3.3 Purificación de los aislamientos

El principal contaminante encontrado fue una bacteria íntimamente asociada con este oomyceto, ya que crecía al mismo tiempo que las hijas de *Phytophthora* colonizaban el medio de cultivo. La purificación más apropiada fue aquella en la cual empleamos medio de cultivo selectivo en cajas de petri

inclinado, sembrando un trozo de medio contaminado con bacteria y colonizado con *Phytophthora* a 0,4cm de distancia del medio, esta superficie seca impidió que la bacteria atravesara y alcanzara el medio de cultivo.

Para verificar la pureza del oomiceto se procedió a sembrar en medio de cultivo ϕ (Fi)(Anexo 2) un disco de medio colonizado en dos tubos de ensayo, y incubado por un día a 28°C (Erwin y Ribeiro 1996).

3.4 Identificación y obtención de monozoosporicos

Dado que ninguno de los aislamientos fue posible observar esporangios bajo condiciones de laboratorio y del medio empleado. Fue necesario inducir la esporulación con extracto de suelo al 50%. El extracto de suelo se obtuvo modificando la metodología propuestas por Sanchez *et al* 2001, se procedió precipitar una solución de 1kg de suelo en 10lts de agua destilada. Al cabo de 7 días se extrajo el sobrenadante, al cual se le ajustó la concentración a 1:1 (una parte de extracto por una de agua destilada) el cual fue esterilizado.

En una caja de petri estéril se depositaron 4 trozos de medio de cultivo colonizado y se agregaron 15ml de extracto de suelo, además de agregaron entre 3-5 semillas de ají al medio líquido, previamente desinfectadas (hipoclorito al 1% por 5 min., seguido de alcohol al 76%, tres lavados con agua destilada estéril, y por ultimo secadas por tres días a 30°C).

Las cajas fueron introducidas en recipientes rectangulares de 20cm x 15cm x 40cm y debidamente selladas. Al cabo de 3 días se revisa al microscopio de Leica, con ampliaciones de 100 y 400 (ocular 10X y objetivos 10X y 40X) se observaron esporangios.

Partiendo de la preparación anterior los esporangios se lisaron por estrés de temperatura, el cual consistió en mantener las cajas esporuladas a 5°C por 30min. (Andres *et al.* 2005), posteriormente se colocaron a 28°C por 1hr. Este cambio de temperatura rompe los esporangios liberando las zoosporas.

Una vez liberadas las zoosporas se agregan 20µl de este preparado en una caja petri con medio agar – agua (16gr agar en 1lt agua destilada, se esteriliza y se agregan 10ml por caja petri). Con un asa de transferencia de bacterias se realiza el rayado para esparcir la muestra y lograr que algunas zoosporas queden aisladas.

Una hora después de la siembra se revisaron las cajas al microscopio Leica de luz, con los objetivos 5X y 10X, logrando observar zoosporas enquistadas y germinadas. La extracción de las zoosporas se realizó con una hoja de bisturí, cortando el medio de agar- agua, y depositando el fragmento en medio de cultivo agar- avena selectivo. Esta metodología fue modificada de Lamour y Hausbeck , 2000).

3.5 Conservación

La conservación se llevó a cabo en agua destilada (10ml por tubo) a temperatura ambiente en tubos de ensayo con tapa rosca (de 15cm de largo por 1,5cm), tres repeticiones por aislamiento e introduciendo 5 discos de 0,4cm de diámetro de medio colonizado, de cultivos de 8 días de renovado (Angel, 2006; Hsiung, 2003; Boessewinkel, 1976;).

3.6 Extracción de DNA

Los aislamientos colectados en el Valle del Cauca de cultivos de ají y pimentón infectados con *P. capsici* se sembraron en medio de avena clarificado (20gr avena, 2gr extracto de levadura, 10gr de dextrosa), se colocaron a crecer a

temperatura del laboratorio bajo agitación constante, transcurridos 7 días se extrajo el micelio y se liofilizó. Posteriormente se colocaron 20mg en un mortero para realizar la extracción de ADN usando el kit de extracción QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La calidad y cantidad del ADN se determinó en gel de agarosa al 0,8% corrido en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) a 80 voltios durante 40 min. El gel fue sumergido en 100ml de agua destilada que contenía 5µl con bromuro de etidio. La concentración del ADN se determinó comparando las muestras con concentración conocidas de ADN del bacteriófago lambda. Una vez conocida las concentraciones de cada una de las muestras se realizaron diluciones del ADN y se llevó a una concentración de 10ng/µl.

3.7 Identificación molecular de los aislamientos de *P. capsici*

La identificación de los aislamientos se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los primer específicos PCAP (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC), y el primer ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) de acuerdo con el método descrito por Ristaino *et al.* 1997. La PCR tuvo un volumen final de 25µl. Cada tubo de reacción contendrá aproximadamente 10ng/µl de ADN ósea 2µl, 2,5µl de buffer 10x, 10,2µl de agua, 4µl de dNTPs, 2,5µl de 10mM de MgCl₂, 1,5µl de cada primer, y 0,1µl de Taq de 5U/µl. La amplificación con estos primers generó un fragmento de 899pb, la cual se realizó en un termociclador (biorad) con una desnaturalización inicial a 96°C por 2min., seguido por 35 ciclos que consisten de desnaturalización a 96°C por 1 min., alineación 55°C por 1min., y extensión a 72°C por 2min. Una extensión final a 72°C por 10min.

Los fragmentos amplificados fueron digeridos por la enzima MspI. La digestión de restricción contenía 20µl, de los cuales 9,8µl son agua, 0.1µl de la enzima MspI, 2µl de Buffer, y 8µl de amplificado. El ADN fue digerido en un termociclador a 37°C por 1,5horas y entonces fue inactivada la enzima a 65°C

por 30min. La digestión con esta enzima generó cuatro (4) fragmentos de 290, 219, 194, 140pb (figura 3) para la especie *Phytophthora capsici*. Los fragmentos fueron visualizados en geles de agarosa 1,5%.

También se emplearon los cebadores

A2 (forward) ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA

I2 (reverse) GATATCAGGTCCAATTGAGATGC

Los cuales amplifican aislamientos de *Phytophthora* que comprenden un amplio rango de diferentes especies y en todos los casos el amplificado tiene un tamaño entre 752 y 832 pares de bases, los cuales abarcan las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del DNA ribosomal de las especies de *Phytophthora* (Drenth *et al*, 2006). El protocolo de PCR se llevo a cabo de acuerdo con las condiciones descrita por Drenth *et al.*, 2006.

Este fragmento fue digerido con la enzima de restricción MspI, generando cuatro fragmentos de 281, 250 y 221bp. Además este fragmento fue secuenciado para los aislamientos DR59, y DR 60 de Darien, YB41 de Yumbo, y RD39 en la Universidad del Estado de Iowa, se introdujeron las secuencias al programa GENEIOUS versión 6.1, y el alineamiento múltiple de las secuencias se realizó en el programa MEGA 5.0. Y analizado en las diferentes bases de datos existentes, haciendo énfasis en la base de datos de *Phytophthora* (PD; <http://www.phytophthoradb.org/>).

3.8 Caracterización de los aislamientos de *P. capsici* microsatélites amplificados al azar (RAMs)

Para determinar la variabilidad genética de los aislamientos se utilizó la amplificación aleatoria con cebadores microsatélites RAMs: AG, CA, CCA, GT,

CGA. Las condiciones del coctel fueron las mismas para todos los cebadores (Tabla 5), las condiciones de hibridación se establecieron de acuerdo con el primer RAMs seleccionado (Tabla 6). Los productos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) corridos a 160 voltios, y 400mA por una hora y cinco minutos. Posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio (5µl en 100ml de agua destilada) en agitación por treinta minutos. Los marcadores RAMs CT, TG no fue posible amplificarlos para la población en estudio, a pesar de que se modificaron las concentraciones de los reactivos, y se probaron diferentes temperaturas de alineación.

Tabla 5. Condiciones del coctel de reacción para RAMs

Reactivos	[] Inicial	[] Final	Volumen
Buffer TAQ	10X	1X	2,5 µl
DNTPs	1,25Mm	2 Mm	4 µl
Primer	50Mm	1,52 µM	1,5 µl
MgCl ₂	50Mm	2,5mM	2.5 µl
ADN		10ng	2 µl
Taq polimerasa	5U/ µl	0,625U	0,1 µl
BSA(albumina de suero bovino)	10mg/µl		2 µl
Agua		10,4	10,4 µl
Volumen total			25µl

Tabla 6. Perfil térmico para PCR – RAMs

Pasos	Temperatura	Tiempo	Etapas
1	95°C	5 min	Desnaturalización
2	95°C	30 seg	Desnaturalización
3	*	45 seg	Hibridación
4	72°C	2 min	Extensión
5	37 veces desde el paso 2		
6	72°C	7 min	Extensión final
7	16°C	A	

*Temperaturas de hibridación primers:

AG, CA = 50°C

CCA =55°C;

GT, CGA =58°C

3.9 Análisis de datos

El polimorfismo en RAMs se interpretó de acuerdo al patrón general de bandas utilizando como criterio la presencia o ausencia de los fragmentos generados, producto del polimorfismo conformacional. La similitud genética entre los aislamientos se calculó utilizando el coeficiente de Nei Li (1979). El análisis cluster se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma utilizando el paquete estadístico NTSYS Numerical Taxonomy System for personal Computer, version 1.8 PC). Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad insesgada y el porcentaje de loci polimórficos empleando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic

Analysis version 1.3; se determinó Fst' estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95%.

4. Evaluación la patogenicidad de los aislamientos de *P. capsici*

Para evaluar la patogenicidad de los aislamientos se empleó el método de inoculación por decapitación. El experimento se llevó a cabo en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, se realizó una siembra en bandejas de 24 alvéolos, con 4 repeticiones y 6 plantas por repetición. En cada bandeja de 24 alvéolos se asignaron al azar 4 aislamientos, de tal forma que en cada bloque queden asignados todos los aislamientos.

Diez días antes se toman cajas petri con medio de cultivo Agar Avena con antibióticos (18gr azarosa, 20gr avena entera y macerada, 2gr de extracto de levadura, 10gr dextrosa, y 1000ml de agua destilada), una vez autoclavado el medio y antes de verterlo a las cajas petri se le agregaron los antibióticos (50mg/L penicilina, 250mg/L ampicilina, 12,5mg/L cloramfenicol, 10mg/L rifampicina, 100mg/L pentaclornitrobenzeno, 25mg/L benomyl, y 50mg/L de hymexazol), una vez agregados los antibióticos se procedió a agregarlo a las cajas petri 20ml por caja. Luego se sembraron los aislamientos por transferencia de cuatro trozos de medio de 0.4ml de diámetro por caja. Una vez sembrados los trozos se agregaron palillos (Salazar *et al.* 1977, De la Torre *et al.* 2009, Hurtado 2010) de 2mm de grosor por 7mm de largo, los cuales deben ser previamente esterilizados en autoclave. Esto con el fin de que *P. capsici* colonice el medio y los palillos.

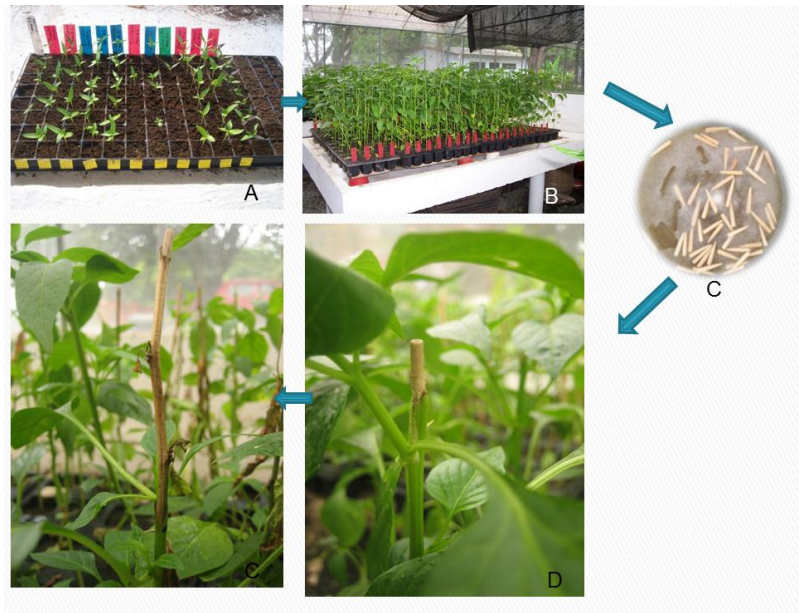


Figura 3 Inoculación de plantas, prueba de patogenicidad A: siembra variedad Cayenne (*Capsicum annum*) en bandejas de 128 alveolos, B: transplante plántulas 10 días después de la germinación, C: preparación inoculo con palillos de 1cm de largo, D: inoculación de palillos colonizados cuando las plantas se encuentran en prefloración, E: evaluación del avance de la enfermedad a lo largo del tallo.

La inoculación propuesta por Porchard *et al.* 1976 fue la empleada en este estudio, por la facilidad de analizar los resultados. El método se conoce como el de decapitación, consistiendo en seccionar transversalmente el tallo de una planta por encima de la sexta o séptima hoja verdadera una vez alcanzado el estado fenológico de la floración. Una vez colonizados los trozos de palillos se extrae uno y se introduce en la parte que ha sido decapitada, para seguidamente, cubrirla con cristal-papel, con el objeto de evitar la desecación del micelio.

Tres días después de la inoculación se tomó la primera medida del avance de la enfermedad, a los 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días después de la inoculación se tomaron las demás lecturas, las cuales consistieron en medir el avance de la enfermedad con una regla calibrada en milímetros, a partir del sitio de inoculación, donde se toma la primera medida se señala con un marcador y a partir de esta se tomó la siguiente hasta los 21 días después de la inoculación.

Reaislamiento: La presencia y la ausencia de la sintomatología en los tejidos de la raíz y el tallo de las plántulas fu comprobada reaislando a *P. capsici* en el medio Agar-Avena según Paz, 2004.

El diseño estadístico utilizado fue Bloques Completos al Azar. El análisis de los datos se realizó por medio del análisis de varianza ANDEVA y la prueba de promedios de DUNCAN.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de la colección

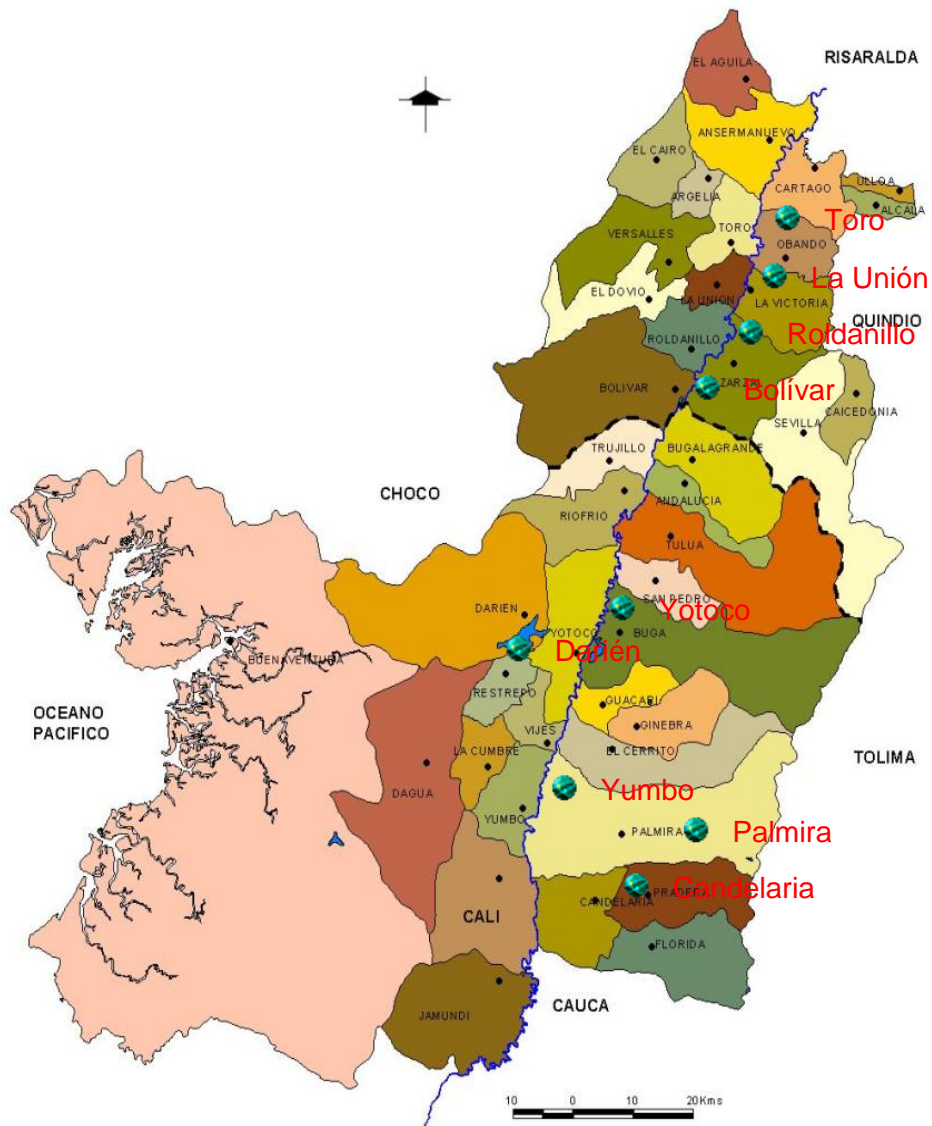
Los aislamientos fueron obtenidos de diferentes muestras de raíces, tallos, hojas y frutos, plantas que presentaban marchitez general y necrosamiento, o pudrición seca en las hojas (Figura 4).

Las muestras se colectaron en fincas del Valle del Cauca ubicadas en los municipios de La Unión, Roldanillo, Bolívar, Yotoco, Darién, Yumbo, Palmira y Candelaria (Figura No 3).

Su obtuvo una colección de 64 aislamientos, de los diferentes sitios de colecta, 38 aislamientos fueron obtenidos de trabajos previos realizados por la estudiante de Ingeniería Agronómica Natalia Andrea Mendoza entre los años 08-2009.

El medio agar-avena selectivo ofreció las condiciones adecuadas para el crecimiento de *Phytophthora*, ya que inhibía el crecimiento de otros hongos (Figura 5).

DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA
DIVISION POLITICO ADMINISTRATIVO



FUENTE: IGAC - CVC
Carografía Básica IGAC 1:300000

myriam s. -2000

Figura 4 Distribución geográfica de los aislamientos de *Phytophthora capsici* colectados en el Valle del Cauca.



Figura 5 Daños característicos de *Phytophthora capsici* en ají. A: necrosamiento desde la base del tallo, B: apariencia general de una planta enferma

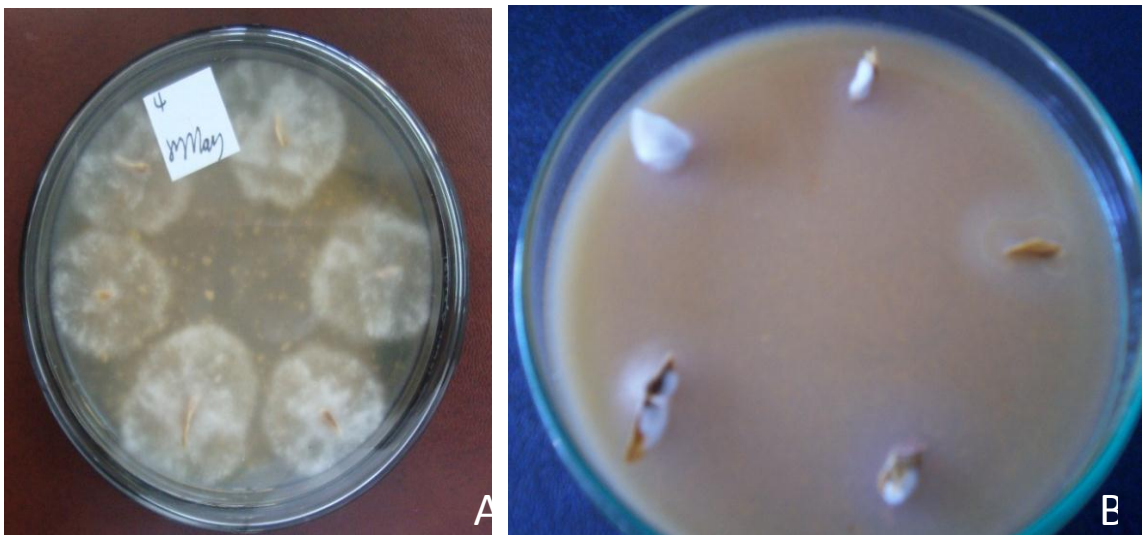


Figura 6 Siembra de trozos de tallo colonizados por *P. capsici*. A: crecimiento selectivo de *P. capsici*, B: inhibición del crecimiento de otros hongos presentes en las muestras.

5.2 Obtención del monozoospórico

Una vez obtenidos los cultivos puros se procedió a inducir la esporulación de los aislamientos, ya que bajo condiciones normales de laboratorio no producen esporangios, para ello tomaron crecimientos de 8 días de renovados y se depositaron trozos en una caja petri estéril. Se agregaron semillas de ají estériles y extracto de suelo previamente autoclavado. Se introdujeron las

cajas dentro de un recipiente de plástico rectangular por espacio de 3-4 días. Pasados los cuatro días se montaron placas para verificar la presencia de esporangios al microscopio (objetivo 10X). Las cajas petri esporuladas (Figura 6 F) fueron introducidas a la nevera a 4°C por 1hr., transcurrido este tiempo se sacan de la nevera y se colocan en la incubadora a 28°C por 1hr., este proceso causa stress y lisa los esporangios (figura 6 G). Al cabo del cual se tomaron 20µl de la suspensión y se siembra (medio agar-agua) con un asa de transferencia de bacterias, y se hace un rayado. Pasada una hora se observa al microscopio con el objetivo 10x, se aprecian zoosporas enquistadas y germinadas, las cuales se extraen con un bisturí y se depositan en una caja de agar-avena.

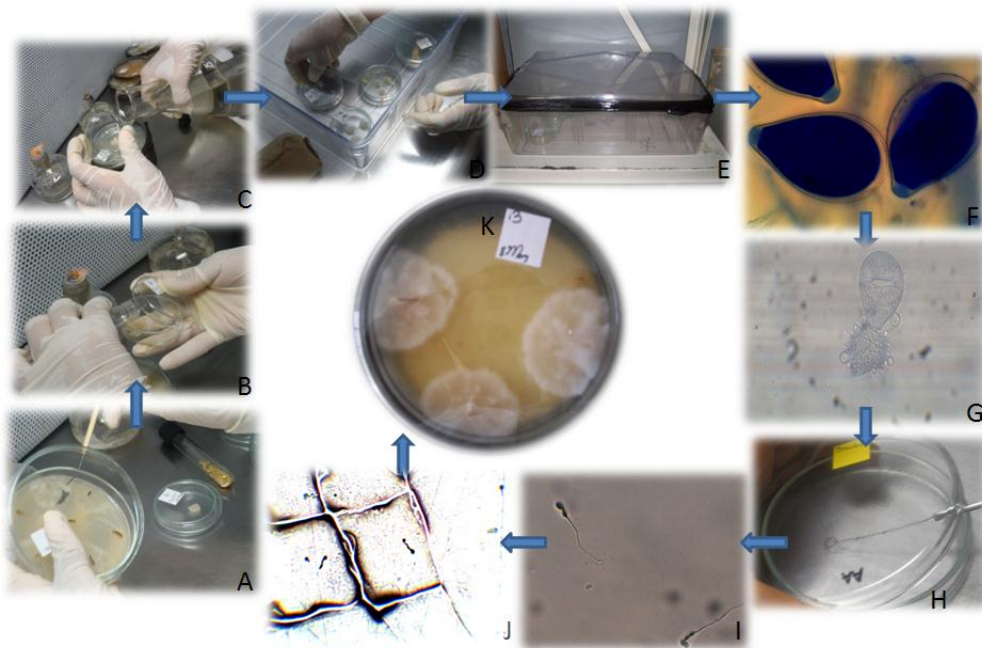


Figura 7 Proceso para obtener monozoospòricos. A: corte trozos de medio colonizado para ser depositado en cajas petri; B: depositar semillas de aji; C: agregar 10ml de extracto suelo estéril; D: colocar las cajas en un recipiente rectangular de plástico; E: incubar a temperatura de laboratorio por 4 días; F: Observar esporangios al microscopio, objetivo 10x; G: esporangio lisado por efecto del stress por choque térmico; H: siembra con asa de transferencia bacterias sobre medio agar-agua; I: zoosporas enquistadas y germinadas; J: corte área circundante zoospora germinada; K: siembra en medio agar-avena.

5.3 Identificación de *Phytophthora* empleando técnicas moleculares

Los cebadores específicos diseñados por Ristaino *et al.* (1997) PCAP (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC), y el primer ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) diseñados para identificación de *Phytophthora capsici* Leonian generaron un fragmento de 894bp, dato reportado por estos autores para esta especie. El corte realizado con la enzima *MspI* logró identificar 60 aislamientos, generando cuatro (4) fragmentos (290, 219, 194, y 140bp) como pertenecientes a la especie *Phytophthora capsici* (Figura 7). Los cuatro aislamientos restantes, 2 de ellos aislados en el municipio de Darién y 2 de Candelaria, amplificaron con estos primers y generaron una banda del mismo peso molecular (894bp), y el corte con la enzima *MspI* generó 3 fragmentos (390, 360 y 150bp) (Figura 7) con lo cual no fue posible establecer su identidad taxonómica, de acuerdo por los reportado por Ristaino *et al* 1998.

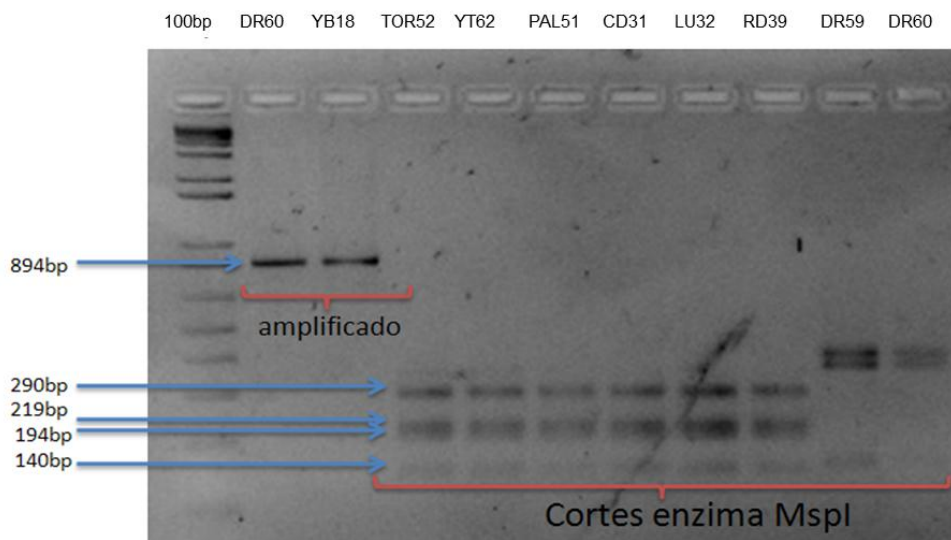


Figura 8 Identificación molecular de aislamientos de *Phytophthora* empleando los primer PCAP y ITS5, los cuales generan un fragmento de 894bp, y corte con la enzima *MspI*.

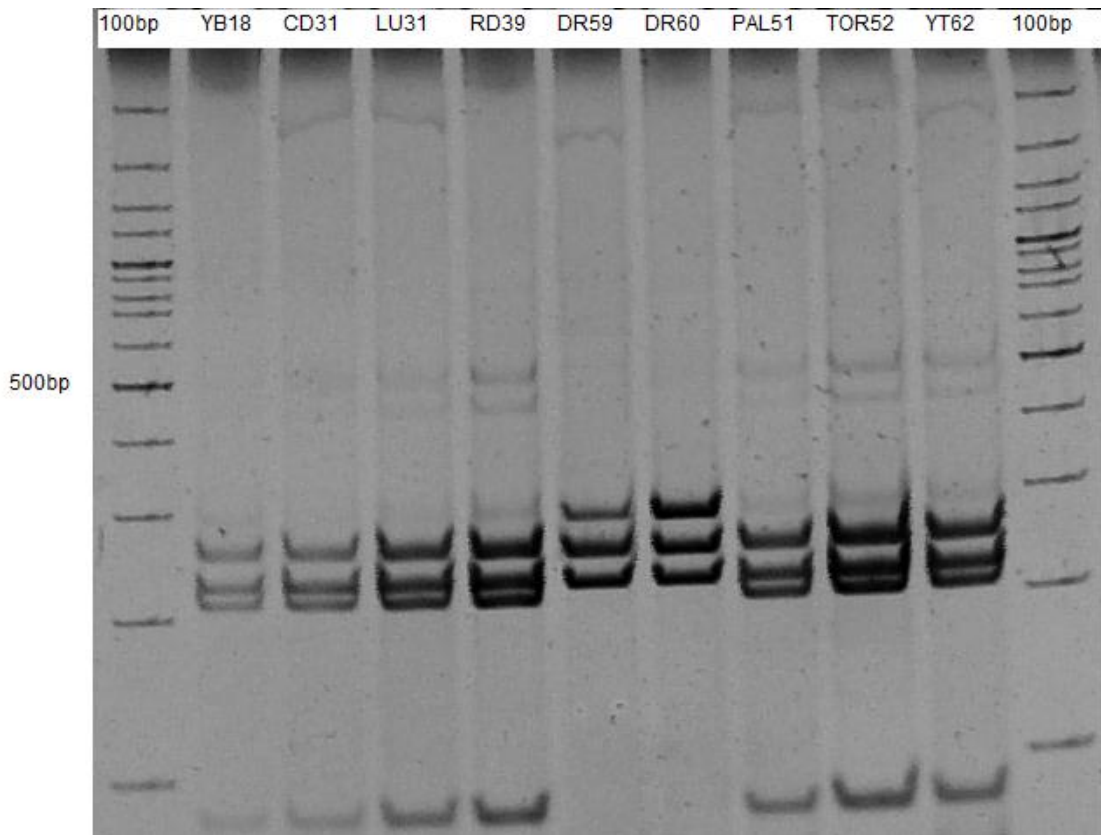


Figura 9 Identificación molecular de aislamientos de *Phytophthora* empleando los primers A2 y I2, y la enzima de restricción MspI.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos con los primers A2, y I2 los cuales amplifican un fragmento de 752bp lo cual está de acuerdo con lo reportado por Drenth *et al.*, 2006. Al realizar el corte con la enzima MspI se generan cuatro fragmentos de 77, 204, 221, y 250bp lo cual permitió identificar 60 aislamientos como *P. capsici*, Drenth *et al.*, 2006 reporta el aislamiento UQ2819 que ha fijado una mutación en el DNA ribosomal.

Los aislamientos de Darién (DR59 y DR60) al ser cortados con la enzima MspI mostraron tres fragmentos de 221, 250 y 281bp lo cual según lo reportado por Drenth *et al.*, 2006 corresponde con el aislamiento de *P. capsici* (UQ1529).

Los fragmentos amplificados con los primers A2, y I2 para los aislamientos RD39, YB41, DR59, y DR60 fueron secuenciados y alineados se presentan a continuación:

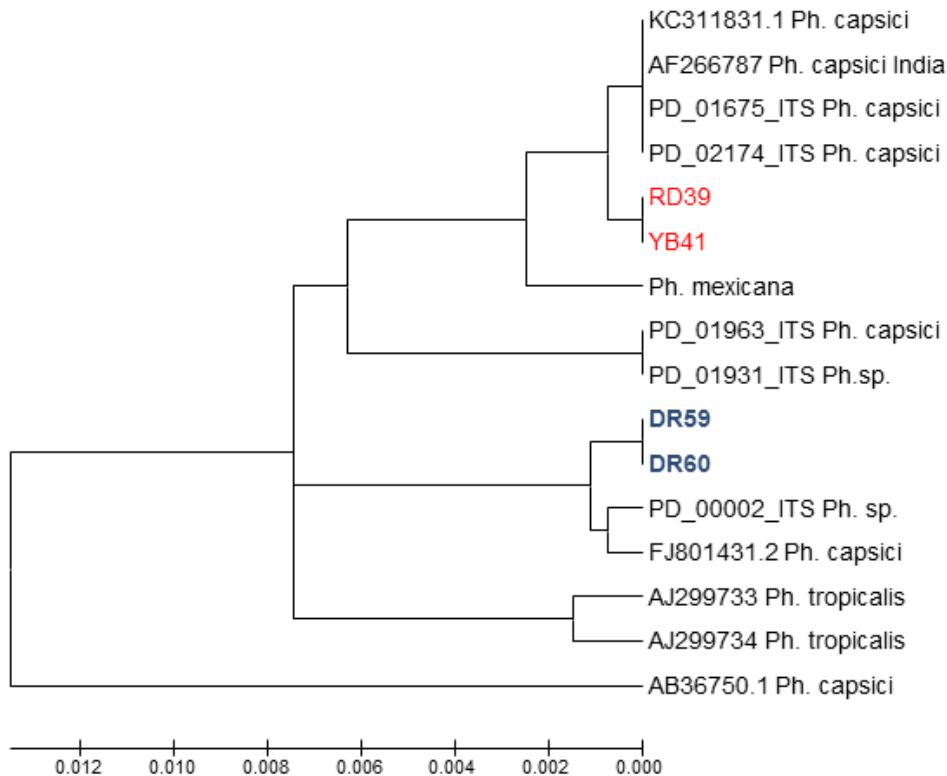


Figura 10 Árbol filogenético de las secuencias analizadas por el método (neighbor-joining method) (Takamura y Kumar, 2004).

El análisis filogenético de las secuencias por el método UPGMA, reveló 4 grupos (Fig. 9), mostrando que los aislamientos de Darien (DR59 y DR60) se agruparon con las accesiones PD_00002_ITS *P. sp.* (database *Phytophthora*) y FJ801431.2 (GenBank), el cual fue almacenado como *P. capsici*. Los aislamientos RD39 y YB41 formaron un grupo aparte con las accesiones PD_02174_ITS, PD:01675_ITS y KC311831.1 todos identificados como *P. capsici*, además están estrechamente relacionados con el aislamiento de *P. mexicana* incluido en este análisis.

sustituciones entre los aislamientos identificados como *P. capsici* con los primers PCAP y ITS5 fue de 0. Las secuencias seleccionadas de las bases de datos mostraron valores bajos de sustitución indicando una estrecha relación entre los aislamientos analizados (tabla 7).

5.4 Patogenicidad

El método desarrollado por Porchad (1976), el cual consiste en la decapitación de plantas por encima de la 6 hoja verdadera, cuando la planta está entrando en estado de prefloración, permitió evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *Phytophthora*. La sintomatología observada en plantas de ají (Variedad Cayenne) consistieron en necrosamiento de color marrón desde el sitio de inoculación con palillo colonizado hasta la base del pie, pasados los catorce días después de la inoculación (ddi) se observó que el tallo necrosado estaba completamente seco y con tendencia a desprenderse por los nudos de la planta.

Se observaron diferencias significativas en la patogenicidad los aislamientos, medida esta como la capacidad de causar un mayor o menor avance de la enfermedad a través del tallo en el tiempo (Anexo 1). Mediante el análisis de diferencias Mínimas significativas ($P=5\%$) los aislamientos fueron analizados mediante el agrupamiento de medias de Wards (Figura 11), formando cuatro grupos de patogenicidad.

El grupo 1 de patogenicidad muestra los aislamientos con baja capacidad de causar enfermedad bajo las condiciones de Palmira (Valle del Cauca), con un promedio de 1,6cm (Anexo 3, y 4) de avance de la enfermedad durante el periodo evaluado. Este grupo está encabezado por los aislamientos de Darién y Candelaria (en total 4 aislamientos) que no han sido identificados como *Phytophthora capsici*, y por un aislamiento de cada uno de estos sitios Yotoco, Roldanillo, Yumbo, y Candelaria. Estos aislamientos representan el 12,5% del total (64) de aislamientos colectados en este trabajo. Hay que tener en cuenta que los aislamientos de Darién y Candelaria, cuando fueron colectadas las plantas, estas expresaban los síntomas característicos de la enfermedad. En tanto que bajo condiciones de invernadero no mostraron esta capacidad de

causar enfermedad y por el contrario los daños causados consistieron en un avance superficial y lineal sobre la epidermis de la planta.

Tabla 7. Numero de sustituciones por nucleótidos en sitios específicos entre las secuencias en la región ITS.

AI SLAMI ENT O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.RD39														
2.YB41	0,00 0													
3.DR59	0,01 6	0,01 6												
4.DR60	0,01 6	0,01 6	0,00 0											
5.PD_00002_ ITS P. sp.	0,02 0	0,02 0	0,00 3	0,00 3										
6.PD_01963_ ITS P. capsici	0,01 3	0,01 3	0,01 2	0,01 2	0,01 2									
7.PD_01931_ ITS P. sp.	0,01 3	0,01 3	0,01 2	0,01 2	0,01 2	0,00 0								
8.PD- 02174_ITS P. sp.	0,00 1	0,00 1	0,01 8	0,01 8	0,01 8	0,01 2	0,01 2							
9.PD_01675_ ITS P. capsici	0,06 3	0,06 3	0,08 1	0,08 1	0,07 8	0,07 5	0,07 5	0,06 2						
10.AB36750. 1 Ph., capsici	0,03 2	0,03 2	0,02 4	0,02 4	0,02 4	0,02 4	0,02 4	0,03 0	0,09 5					
11.KC311831 .1 P. capsici	0,00 1	0,00 1	0,01 8	0,01 8	0,01 8	0,01 2	0,01 2	0,00 0	0,06 2	0,03 0				
12.FJ801431. 2 P. capsici	0,01 8	0,01 8	0,00 1	0,00 1	0,00 1	0,01 0	0,01 0	0,01 6	0,08 0	0,02 3	0,01 6			
13.P. mexicana	0,00 6	0,00 6	0,02 0	0,02 0	0,02 0	0,01 3	0,01 3	0,00 4	0,06 3	0,03 2	0,00 4	0,01 8		
14.AJ299733 P. tropicalis	0,01 8	0,01 8	0,01 5	0,01 5	0,01 5	0,00 7	0,00 7	0,01 6	0,08 0	0,02 3	0,01 6	0,01 3	0,01 8	
15.AJ299734 P. tropicalis	0,01 8	0,01 8	0,01 5	0,01 5	0,01 5	0,00 7	0,00 7	0,01 6	0,08 0	0,02 3	0,01 6	0,01 3	0,01 8	0,00 3

El grupo 2 de patogenicidad está conformado por los aislamientos que presentaron el mayor progreso de la enfermedad durante los 21 días evaluados (Figura 11), correspondiendo esto con necrosamiento y muerte total de la planta. El promedio del avance de la enfermedad fue de 22,96cm (Anexo4), representado por 19 aislamientos (o 29,69% del total de aislamientos), el aislamiento más patogénico es el RD35 proveniente de Roldanillo (Anexo 1, y 3). Este grupo está constituido por aislamientos de Yotoco (47,37% del total de aislamientos que representa este grupo), Roldanillo (21,05% de 19 aislamientos), La Unión, y Bolívar con 2 aislamientos (10,53%) cada uno, y Palmira con un aislamiento (5,26%). Estos resultados muestran que hay dentro de cada sitio de muestreo aislamientos con alta capacidad para causar enfermedad en plantas de ají y pimentón.

Un progreso de la enfermedad promedio de 12,78cm fue encontrado para el grupo 3, el cual está conformado por 22 aislamientos, ósea, el 37,5% del total de aislamientos. Este grupo tiene representantes de cada sitio de muestreo a excepción de Darién más o menos con la misma proporción, mostrando una baja patogenicidad a los 21 días después de inoculada las plantas de ají, permitiendo que la planta continúe con su ciclo de vida y emita nuevos brotes a partir de los nudos más cercanos a la base de la planta. Esto ocurrió tan solo en plantas inoculadas en estado fenológico de prefloración, caso contrario a lo que ocurre cuando se inoculan plántulas, ya que bajo estas condiciones las plantas no sobreviven (datos no mostrados).

El grupo 4 de patogenicidad son aquellos que tienen una patogenicidad intermedia- alta cuyo avance a los 21 días fue en promedio de 17,78cm, con un mínimo de 16,1cm y un máximo de 18,98cm para un aislamiento proveniente de Roldanillo. El 42,86% de 14 aislamientos está representado por los provenientes de Roldanillo, en tanto que el 21,43% (de 14) son de Yotoco y Yumbo, y 2 aislamientos con el 14,29% provienen del municipio de Bolívar (Figura 11).

En resumen se encontró variabilidad en la capacidad para causar enfermedad entre los aislamientos por lugar de origen, y también se encontró variabilidad en la patogenicidad dentro de los sitios de muestreo. Esta variación en la patogenicidad está de acuerdo con lo encontrado por Islam *et al.* (2005), Sedegui *et al.* (2000) y Ristaino (1990). Los datos muestran que los aislamientos cuyo origen se encuentra en los municipios de Yotòco y Rodanillo tienden a ser más patogénicos que el resto de aislamientos. Esto dado posiblemente a que estas zonas son las más importantes para el cultivo de ají en el Valle del Cauca, y el uso indiscriminado de agroquímicos para el control de esta enfermedad puede estar cambiando la capacidad patogénica de esta especie en estos lugares.

Datos similares han sido reportados por Kooket *al.* 2001 con nueve aislamientos recuperados de ají y calabaza de diversos orígenes geográficos, donde encontraron diferencias significativas entre los aislamientos probados en diferentes cultivares, lo cual sugiere que los aislamientos poseen factores específicos de virulencia.

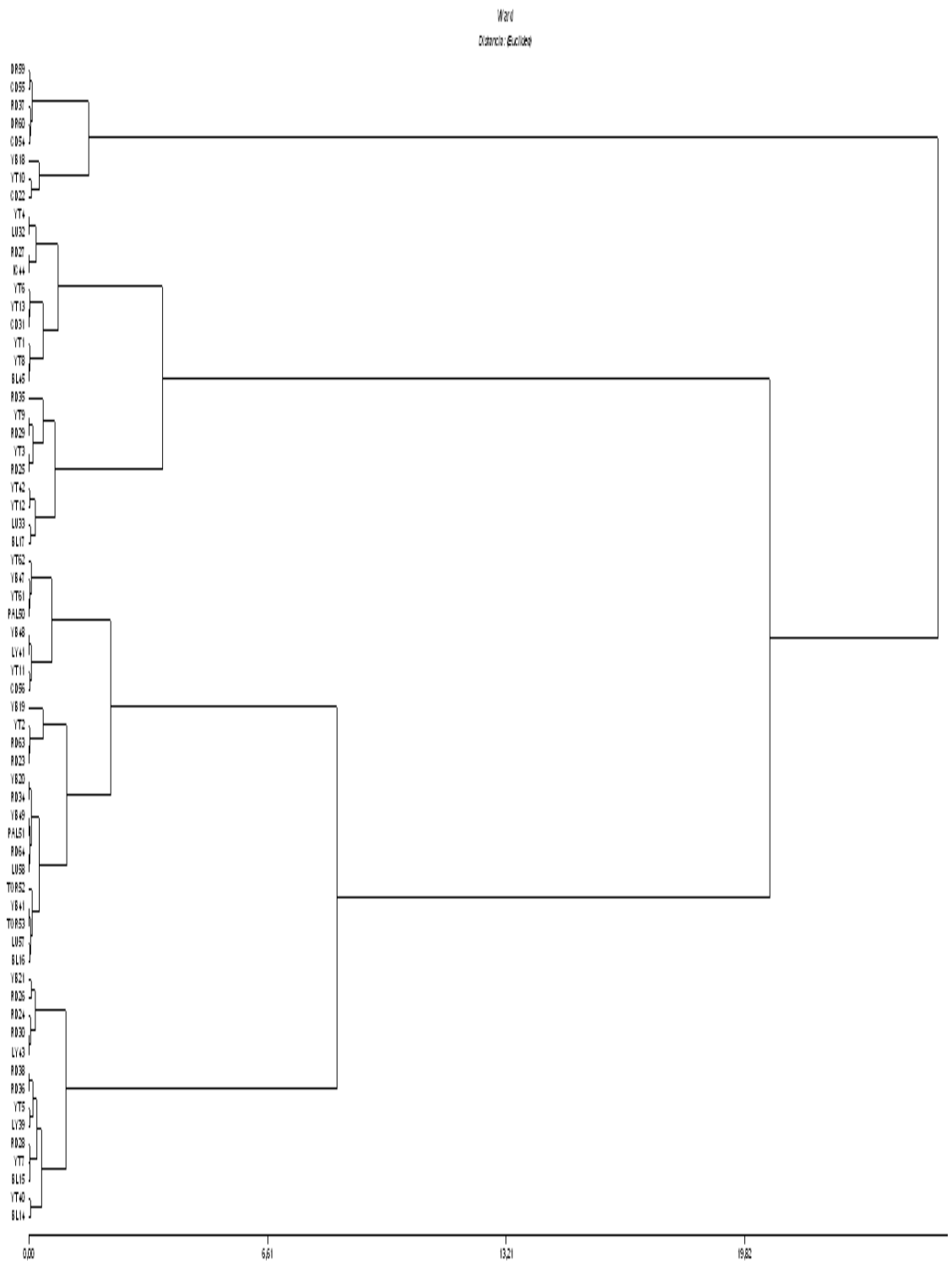


Figura 12 Dendrograma de análisis de medias Ward para patogenicidad total a los 21ddi.

5.5 Genotipificación por marcadores moleculares RAMs

Se emplearon seis (6) de los siete cebadores RAMs propuestos para esta investigación, porque presentaron algún grado de polimorfismo en los aislamientos de *Phytophthora* estudiados. El primer CT no amplificó para la población, a pesar de que se probaron diferentes concentraciones de los reactivos, también se cambió la marca de la TAQ polimerasa (se emplearon las marcas : Vivantis, Fermentas), por otro lado se realizaron cambios en las temperaturas. No obteniendo resultados favorables.

Los seis primers (Tabla 8) empleados generaron un patrón de 147 bandas con pesos moleculares entre 300 a 1400bp y ocho fue el menor número de bandas presentado por el primer GT, y el primer con mayor número de bandas fue el CGA el cual tuvo 35. Empleando siete primers RAPD Islam *et al.* (2005) analizaron un total de 65 bandas polimórficas en 24 aislamientos de *P. capsici*. Truong *et al.*(2010),utilizando cinco primer RAMs caracterizó 118 aislamientos, estos primers generaron un total de 48 bandas polimórficas. Datos que se encuentran muy por debajo de los reportados en este estudio empleando la técnica RAMs.

Tabla 8. Características del cebador, número de bandas por cebador, heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para los 64 individuos de *Phytophthora* spp. evaluados.

Cebador	Secuencia	Bandas totales	Bandas polimórficas	Rango bp.	He	Porcentaje de loci polimórficos
AG	*HBHAGAGAGAGAGAGAGAG	20	19	300-1400	0,3679	95,0000
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	34	30	300-1400	0,3158	88,2353
CA	DBDACACACACACACACACA	29	29	400-1200	0,3091	100,0
CCA	DDBCCACCACCACCA	21	16	400-1400	0,2072	76,1905
CGA	DHBCGACGACGACGACGA	35	29	400-1300	0,1888	82,8571
GT	VHV GTG TGT GTG TG	8	8	300-1300	0,3210	100,0
TOTAL		147	131		0,2758	89,1156

* sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T)

La diversidad genética de una población de *Phytophthora capsici* aislada de ají y calabaza durante los años 1998 y 2000 en Michigan muestra un heterocigosidad de 0,17 la cual es baja (Lamour y Hausbeck, 2001).

El análisis genético en pimienta negra realizado por Truong *et al.*(2010),empleando 118 aislamientos de *P. capsici* encontró que el 83,3% de los loci fueron polimórficos, de 48 bandas amplificadas con los primer RAMs ACA, AG, CGA, GT, y TG. Y la heterocigosidad para los 118 aislamientos fue

de 0,19 mostrando una diversidad genética relativamente baja. Por otra parte Mfegue *et al.*, encontró en una población de *Phytophthora megakarya* empleando marcadores microsatélites una heterocigosidad extremadamente alta de 0,575 en promedio.

Un análisis de la estructura genética de las poblaciones Peruanas de *P. infestans* muestra una Heterocigosidad entre 0,08 y 0,8 indica una amplia diversidad expresada en las múltiples razas detectadas en la mayoría de los campos (Perez *et al.*,2001).

En este estudio se encontró un valor de heterocigosidad total de 0,2758 lo cual sugiere que en las poblaciones evaluadas hay una diversidad genética intermedia, dato relacionado con el porcentaje de loci polimórfico, que para nuestro caso fue de 89,1156%. El primer AG muestra una He de 0,3679, el GT de 0,3210, el TG de 0,3158, CA de 0,3090 primers que soportaron en gran medida la diversidad observada; lo cual sugiere que estos cuatro cebadores pueden ser empleados para realizar futuras investigaciones sobre estructura genética. En tanto que los primers CCA (0,2072) y CGA (0,1888), y presentaron un porcentaje de loci polimórficos de 76,19 y 82,85 % respectivamente, siendo los primers que menos aportaron a la diversidad.

5.6 Análisis descriptivo

Para el análisis descriptivo se realizó un dendrograma con el coeficiente de Dice Nei-Li(1978). Mediante el método de clasificación UPGMA (Figura 12), se mostró que existe una relación significativa entre los grupos geográficos. A un nivel aproximado de similitud de 0,70 se formaron cuatro grupos (1, 2, 3, y 4). El grupo 1 está compuesto por los 60 aislamientos de *Phytophthora capsici* en el cual se puede apreciar que los aislamientos tienden a agruparse por sitio de colecta. Los grupos dos y tres están compuestos por los aislamientos DR60 y DR59 proveniente de Darien, respectivamente. El grupo 4 está compuesto por dos aislamientos de Candelaria, Centro de investigación CEUNP de la

Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Perteneciente a una especie de *Phytophthora* no identificada.

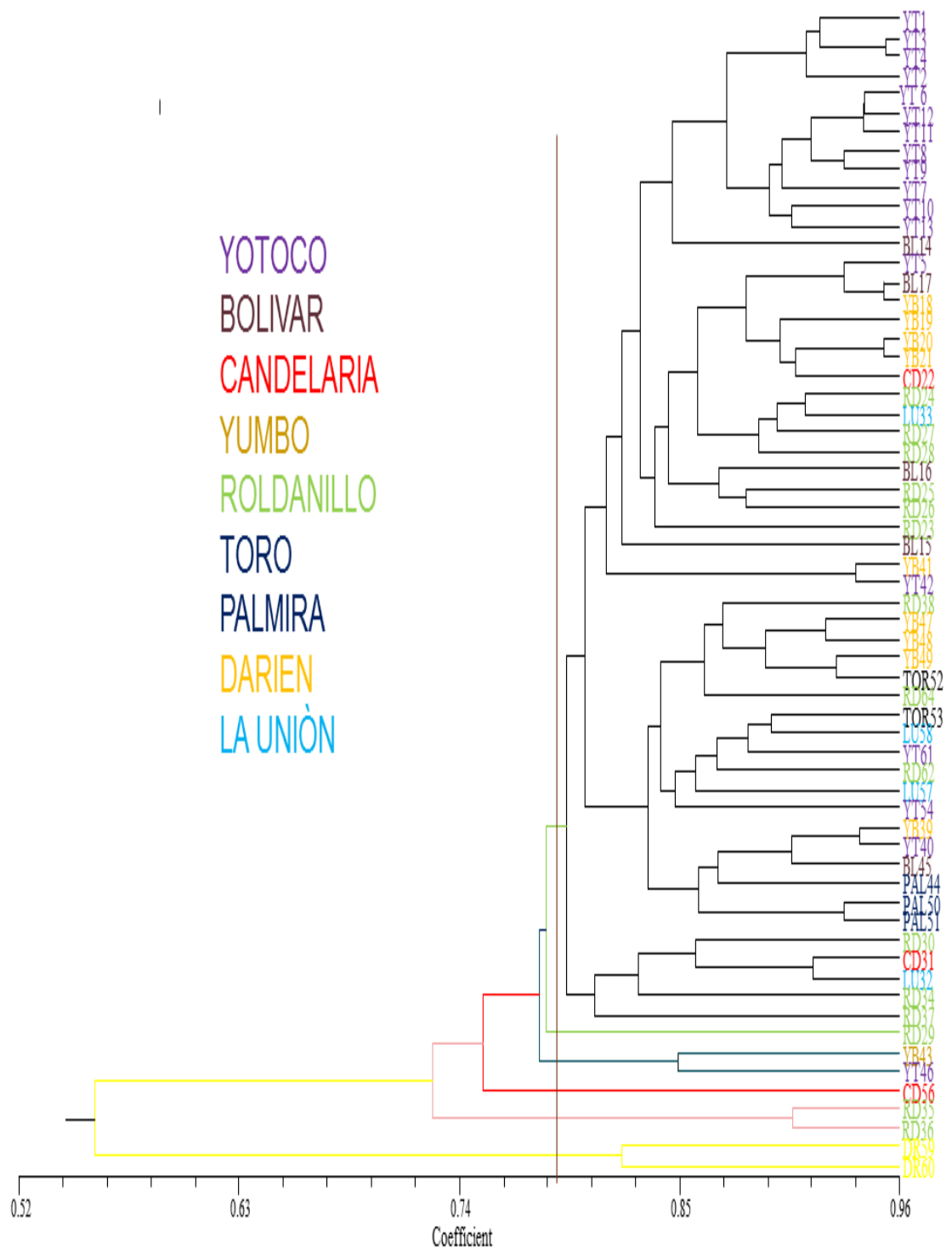


Figura 13 Diversidad genética de la población de *Phytophthora capsici* en ají y pimentón en el Valle del Cauca.

5.7 Coeficiente de diferenciación genética (Fst)

El Fst cuantifica la consanguinidad de las subpoblaciones en relación a la población total de la cual forman parte, se interpreta como la proporción de la variación total atribuible a la diferenciación entre poblaciones (Caujapé, 2006, citado por Rugeles, 2011).

Se realizó la estimación del índice de fijación (Fst) para verificar la existencia de diferenciación genética entre los sitios de muestreo en el Valle del Cauca para la enfermedad causada por *Phytophthora capsici*. El valor de Fst encontrado en este estudio fue de 0,2590 (D.S= 0,0170; 1000 replicaciones) lo que indica que existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones de *Phytophthora* (Tabla 9). En contraste con este estudio, Lamour y Hausbeck (2001a) estudiaron la dinámica de la supervivencia y evolución de la sensibilidad al Mefenoxam en poblaciones de *Phytophthora capsici* durante los periodos de 1998 a 1999, empleando la técnica AFLP encontraron en estas poblaciones una baja diferenciación genética $F_{st} < 0,05$ de acuerdo con la tabla de Wright's.

Lamour y Hausbeck (2001b) investigando la estructura genética de aislamientos de *P. capsici* aislados de ají, pepino, calabaza, tomate, y zapallo encontraron una diferenciación genética para el periodo de 1998 y 2000, fue de 0,04 y 0,03 respectivamente. Indicando estos resultados que en estas poblaciones hay muy baja diferenciación genética o pérdida de heterocigosidad. En otro estudio Lamour y Hausbeck (2003) llevado a cabo entre el 1998 al 2001 en Michigan, aislando *P. capsici* de pepeno y tomate en un sistema de rotación de cultivos encontraron entre las poblaciones colectadas un índice de fijación (Fst) de 0,05 con una variación de 0,01, lo cual indica una muy baja diferenciación genética, o pérdida de la heterocigosidad durante el periodo evaluado.

Tabla 9. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al Fst propuesta por Wright(1978)

Valores de Fst	Grado de diferenciación
0 - 0.05	Poca diferenciación genética
0.06 - 0.15	Moderada diferenciación genética
0.16 – 0.25	Alta diferenciación genética
Mayor de 0.25	Gran diferenciación genética

(Hartl y Clark, 1997)

El valor de Fst obtenido en este estudio indica que existe una alta diversidad genética en los sitios cultivados con ajì y pimentòn en el Valle del Cauca, esto sugiere que la reproducción sexual juega un papel importante en la conformación de la estructura genética de las poblaciones de *Phytophthora* en el Valle del Cauca.

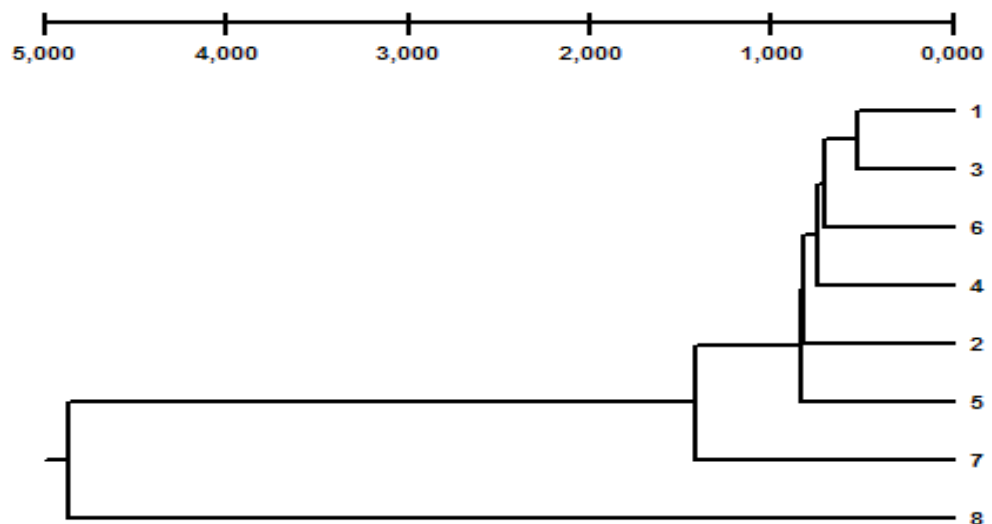
5.8 Distancia genética

Los valores de distancia genética calculados con el índice de Nei(1978) fueron muy altos comparados con los resultados obtenidos por Islam *et al.*, (2005), mediante la técnica RAPD lograron formar seis grupos, agrupados de acuerdo con características de patogenicidad y no de sitio de origen. Los valores de distancia genética para los aislamientos de *Phytophthora capsici* de Michigan fluctuaron entre 0,03 y 0,45. La diversidad genética en nuestro caso de estudio fue mayor entre los grupos 8 y 9 con un valor de 0,5194, los grupos 7 y 8 (0,4275), los grupos 6 y 8 (0,4016), los valores de diversidad genética más bajos se encontraron entre los grupos 1 y 3 (0,0402) (Tabla 10). Los valores

para las comparaciones realizadas de diversidad genética con el grupo 8 fueron altas, principalmente debido a que este grupo está representado por los aislamientos de *Phytophthora* provenientes de Darién los cuales no pertenecen a la especie *P. capsici*.

Tabla 10. Distancias genéticas obtenidas mediante el índice de Nei (1978) para las ocho poblaciones de *Phytophthora* spp. estudiadas.

Population	1	2	3	4	5	6	7	8
1	*****							
2	0,0535	*****						
3	0,0431	0,0602	*****					
4	0,0676	0,0826	0,0487	*****				
5	0,0722	0,0743	0,0726	0,0720	*****			
6	0,0657	0,0693	0,0462	0,0515	0,0640	*****		
7	0,1166	0,1365	0,1008	0,1321	0,1534	0,1348	*****	
8	0,4096	0,4622	0,4279	0,4102	0,3970	0,4607	0,4972	



*

Figura 14 Dendrograma por sitios de muestreo en el Valle del Cauca para la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en Ají y pimentón.

El dendrograma para los ocho grupos construidos mediante el método UPGMA (Figura 13 y con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones mostró un alto porcentaje de loci que soporta la formación de los nodos (Tabla 11) lo que indica una alta confiabilidad de los loci utilizados en el análisis de diversidad genética, y la efectividad de la técnica molecular RAMs para el estudio realizado.

Este dendrograma muestra una cercanía entre las poblaciones 1, 3, 6 2, y 5, esta diversidad es explicada por la cercanía entre los sitios de muestreo, ya que estos se encuentran ubicados en la zona norte del Valle donde el flujo genético es más alto.

Mientras que las poblaciones 7 y 9 forman un grupo separado provenientes de los sitios Palmira y Toro, lo cual indica que no hay una relación clara entre la distancia genética y la distancia geográfica. Las poblaciones más distanciadas corresponden con la 4, y 8 cuyo origen en Candelaria y Darién, este distanciamiento de estas poblaciones es claro que es motivado por las especies de *Phytophthora* aún no identificadas.

Tabla 11. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de los ocho sitios de muestreo para *Phytophthora*.

Nodo	No. De loci que Soportan el nodo	Proporción de Réplicas similares (1000 repeticiones)	% total de loci que Soportan el nodo
1	11	7,48%	10,00 %
2	2	1,36%	18,2%
3	0	0,00%	0,00%
4	1	0,68%	0,91%
5	2	1,36%	1,82%
6	52	35,37%	47,27 %
7	110	74,83%	100,00 %

5.9 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Este método permitió verificar la existencia de diferenciación de las poblaciones de acuerdo a los sitios geográficos donde fueron aislados. Se asumió que cada uno de los nueve grupos correspondía a una población separada. El análisis de varianza molecular para los grupos (Tabla 12) muestra que existe una variación entre los aislamientos de cada población (46%) (Figura 13). Esta variación podría indicar la existencia de subpoblación dentro de cada grupo. El 54% restante se debe al componente de varianza

genética entre grupos, la cual fue significativa ($P > 0.010$), indicando que existe diferenciación genética entre los grupos de *Phytophthora* evaluados.

Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Lamour y Hausbeck (2001), donde el análisis de la AMOVA mostró un set de todas las localidades indicando que el 40% de la variación se encuentra entre las poblaciones y el 60% de la variación esta localizada dentro de las poblaciones.

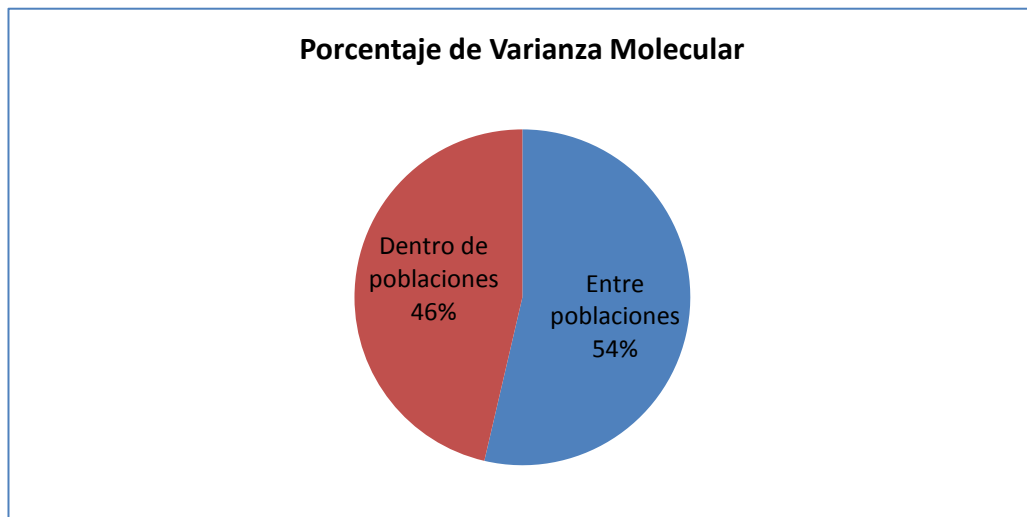


Figura 15 Porcentaje de variación del análisis de varianza molecular para los nueve grupos de *Phytophthora*.

Tabla 12. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de *Phytophthora*

F.V.	df	SC	MS	%
Entre poblaciones	7	6,147	0,768*	54%
Dentro de poblaciones	54	4,900	0,089	46%
Total	61	11,047		100%

Significativo para $\alpha=0,05$; 1000 permutaciones

6. CONCLUSIONES

En los nueve municipios visitados se observó los síntomas característicos de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en plantas de ají y pimentón, en el Valle del Cauca. Logrando obtener 62 aislamientos.

Los cebadores PCAP e ITS4, A2 e I2, permitieron identificar la totalidad de aislamientos como pertenecientes a la especie *Phytophthora capsici*. De igual forma el análisis de las secuencias de los aislamientos seleccionados corroboró los resultados obtenidos con los cebadores especie- específicos ya mencionados.

Se encontró variabilidad en la patogenicidad de los aislamientos de *P. capsici*, siendo los aislamientos de Darien los menos patogénicos bajo condiciones las condiciones evaluadas.

La diversidad permitiendo distinguir cinco grupos bien definidos a un nivel del 78 por ciento de similaridad se formaron 5 grupos genéticos. El análisis de estructura genética permitió evidenciar que hay una diferenciación moderada en las poblaciones de cada uno de los sitios muestreados en el Valle del Cauca. La mayor va

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para la patogenicidad de la enfermedad causa por *Phytophthora* expresada como avance a través del tallo en cm. a los 21 días después de la inoculación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	35848,69	64	56/,14	54,19	<0,0001
Aislamientos	35801,11	62	577,49	55,87	<0,0001
Bloque	44,58	2	22,29	2,16NS	0,1165
Error	7142,57	691	1/,34		
Total	42991,26	755			

DMS (=5%) aislamientos

CV = 20,62%

R² = 0,82

Anexo 2.

Medio de cultivo agar-avena selectivo

20gr avena entera triturada en mortero

16gr agar

10gr dextrosa

2gr extracto de levadura

1lt agua destilada

Antibióticos

100µg/ml Rifampicina

100µg/ml Penicilina

250µg/ml Ampicilina

12,5µg/ml Clorafenicol

Fungicidas

25µg/ml Benomil

µg/ml Hymexazol

medio ϕ (Fi)

1g Casaminoácidos

10g Peptona

1,5gr Extracto de levadura

1lt agua destilada estéril

Anexo 4.

Promedio para los grupos de patogenicidad

Grupo	No. Aislamientos	Media	mínimo	máximo	desviación
1	19	22,96	19,87	27,08	2,13
2	8	1,60	0,00	4,86	1,90
3	22	12,78	8,45	15,16	1,72
4	15	17,58	16,10	18,98	0,93

8. BIBLIOGRAFIA

AGRIOS G.N. Fitopatologia.2005. editorial Limusa, S.A. de C.V. Mexico.

ANDRES ARES, J. L., RIVERA MARTINEZ, A., y FERNANDEZ PAZ, J. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. 2005. Spanish Journal of Agricultural Research 3(4), 429-436.

ANGEL ALARCON, DILIA IRNEY. Evaluaciòn de tècnicas de conservaciòn para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. 2006.Tesis de grado para obtener el titulo de Microbiologo Industrial.

ARNEDO, Andrés MS.; GARCÉS, Claver A; PALAZÓN, C.; ARTEAGA M., Luis;

GIL ORTEGA, R. Desarrollo de líneas de pimiento (*Capsicum annum*) resistentes a diversas enfermedades. Actas de Horticultura No. 39 – X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. 2003, Pontevedra.

BARTUAL R., MARSAL J.I., CARBONELL E.A., TELLO J.C., y CAMPOS T.Genética de la resistencia a *Phytophthoracapsici* LEÓN en pimiento.1991. Bol. San. Veg. Plagas, 17: 3-124

BOESSEWINKEL H.J.. Storage of fungal cultures in water. 1976. Trans. Br. Mycological Society 66: 183-185.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. Peppers: Vegetable and Spici*Capsicums*. 2000, CABI Publishing.

BRUCHER, H. 1989. Useful Plants of Neotropical Origin and their Wild Relatives. Springer Verlag, Nueva York. pp: 165-172.

Catalogue of life 2009. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org>

DE LA TORRE A., R.; COTA T., M. F; GARCÍA R., L. J; CAMPOS, J. E ; y SAN-MARTÍN F. Etiología de la muerte descendente del Mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán México. 2009. Agrociencia., vol. 43, no. 2., p. 197-208.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B. G. ; LOHNES, D. G. ; FIORITTO, R. J.; GRAEF, G. L.; CREGAN, P. B. ; SHOEMAKER, R. C.; y SPECHT J. E.. Simple Sequence Repeat Markers Linked to the Soybean *Rps* Genes for *Phytophthora* Resistance. *CropSci.* 41:1220–1227 (2001).

DRENTH A., WAGELS G., SMITH B., SENDALL B., O'DWYER C., IRVINE G., and IRWIN G., J.A.. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. 2006. *Australasian Plant Pathology*, 35, 147-159.

ECHEMENDIA M., Yamilé. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. 2007. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.

EGEA G., C.; ALCAZAR, M.D.; CANDELA, M.E. Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annum* a *Phytophthora capsici*. 1996. *Plant Physiology* 98: 737-742.

-----BILOTTI, G.; REQUENA, M.E.; EZZIYANI, M. Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. 2008. *Biologia Plantarum* 52(1): 105 -109.

ERWIN, D.C. and RIBEIRO, O.K. *Phytophthora* disease worldwide. APS PRESS 1996. The American Phytopathological Society.

FAO-ESTADISTICA. 2010 (en línea), consultado el 20 de Agosto de 2012. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

FLIER, G. WILBERT; GRÜNWARD, J. NIKLUS; K; KROON M., N. P. LAURENS; VAN DEN BOSCH M., B. TRUDY; GARY-SERRANO, EDITH; LOZOYA-SALDAÑA, HECTOR; BONANTS M., J. PETER; TURKENSTEEN, J. LODewijk. *Phytophthora ipomoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipedunculata* in the Toluca Valley of central Mexico. 2002. *Mycological Research* 106(7): 848-856.

GALMARINI, CLAUDIO R.. El género las perspectivas del mejoramiento genético de pimiento en Argentina. *Avances en Horticultura* 4(1).1999. Edición on-line.

GEVENS A.J., DONAHOO R.S., LAMOUR K.H., y HAUSBECK M.K..Characterization of *Phytophthoracapsici* causing foliar and Pod blight of snap bean in Michigan. 2008, Plant Disease Vol. 92 No. 2 Research.

----- Characterization of *Phytophthoracapsici* from Michigan Surface Irrigation Water.2007, The American Phytopathological Society, Vol. 97, No. 4.

HARDHAM, Adrienne R. Cell biology of plant-oomycete interactions. 2007 Cellular Microbiology 9(1), 31-39.

HARTL, D. L., and CLARK, A. G.. Principles of Population Genetics. 1997. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA

HEMMES, DON E. Cytology of *Phytophthora*. En *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, y Pathology*. 1987.

ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; y TSAO, P.H. HSIUNG KO, WEN. Long-term storage and survival structure of three species of *Phytophthora* in water. 2003. Journal of Genetic Plant Pathology 69:186-188 (Short communication).

FRENCH MONAR R. D, JONES J. B., ROBERTS P. D. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. 2006. The American Phytopathology Society. Vol. 90 No. 3, page 345-350.

GRANKE L.L., QUESADA OCAMPO L., LAMOUR K., HAUSBECK M. K. Advances in research on *Phytophthora capsici* on Vegetable crops in The United States. 2012. Vol. 96, No. 11. The American Phytopathological Society.

HURTADO T. IFIGENIA. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en Germoplasma de *Capsicum* spp. 2010. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

ISLAM, S.Z.; BABADOOST, M.; LAMBERT, K.N.; y NDEME, A. Characterization of *Phytophthoracapsici* Isolates from Processing pumpkin in Illinois. 2005-February, PlantDisease.

JANTULA Jarkko, LILJA Arja, y PARIKKA Paivi. Genetic variation and host specificity of *Phytophthoracartorum* isolated in Europe. 1997 MycologicalResearch 101(5): 565-571.

JARAMILLO V., Sonia. Monografía sobre *Phytophthorainfestans*(Mont) de Bary. 2003. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. 1980. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

KOOK H.,Byung; JIN K.,Young; y Hoe K., Choong. Differential interactions of *Phytophthoracapsici* isolates with pepper genotypes at various plant growth stages. 1996, European Journal of Plant Pathology 102: 311-316.

KOOK L.,Byung; KIM, Beom S.; CHANG, Seog W.; y HWANG, Byung K. Aggressiveness to Pumpkin Cultivars of Isolates of *Phytophthoracapsici* from Pumpkin and Pepper. 2001- May, Plant Disease .

LAMOUR,K. H.; y HAUSBECK, M. K. Mefenoxam Insensitivity and the Sexual Stage of *Phytophthora capsici* in Michigan Cucurbit Fields. 2000. Vol. 90, No. 4. Phytophthology.

----- The Dynamics of Mefenoxam Insensitivity in a Recombining Population of *Phytophthora capsici* Characterized with Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. 2001a. The American Phytopathological Society. Phytopathology Vol. 91, No. 6,.

-----The spatiotemporal Genetic Structure of *Phytophthora capsici* in Michigan and Implications for Disease Management. 2001b. The American Phytopathological Society, Vol. 92, No. 6.

-----Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. 2001. *Phytopathology* Vol. 91, No. 10

----- . Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* in Michigan. 2003. *Plant Disease*, 87:841-845.

LIPPERT, L.F, P. G. SMITH & B.O. BERGH.1966. Cytogenetics of the vegetable crops, garden pepper, *Capsicum* sp. *Bot. Rev.*, 32: 24-55.

MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKADA, M., AND NAKANISHI, N. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. 1977. *Phytopathology* 67:425-428.

MFEGUE C.V., HERAH C., ADRETT H., MBENOUN M., TECHOU Z., TNE HOOPEN M., THARREAU D., and DUCAMP M.. Microsatellite markers for population studies of *Phytophthora megakarya* (Phyhiaceae), a cacao pathogen in Africa. 2012, *American Journal of Botany* e353-356.

MELGAREJO, L.M.; RODRIGUEZ, F; GIRALDO, M.; CARDONA, G.; CELIS, M.; ARIAS, J.C. Caracterización morfológica , bioquímica y molecular de especies promisorias de la amazonia Colombiana pertenecientes al género *Capsicum* para su conservación y uso. Instituto SINCHI. Bogotá, 2000.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2012. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas – Resultados Evaluaciones Agropecuarias Municipales 2011.

NUEZ F., ORTEGA GIL R., COSTA J. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes Ediciones Mundi-Prensa 1996.

PAPAVIZAS G. I., BONERS J. H., y JOHNSTON S. A. Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soil. 1961. The American Phytopathological society Vol 71, No. 2.

PARDEY R., Catherine. Caracterización y evaluación de accesiones de *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira y determinación del modo de herencia de la resistencia a potyvirus (pepdmv). 2008. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

PAZ, FABIAN A. Desarrollo de una metodología para la evaluación y selección de materiales de *Capsicum* spp. Por su resistencia a *Phytophthora* spp. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, 2004.

PEREZ G. Willmer, GAMBOA Soledad, FALCON V. Yesenia, COCA Mario, RAYMUNDO M. Rubi, and NELSON J. Rebecca. Genetic structure of Peruvian Population of *Phytophthora infestans*. 2001, Phytopathology vol. 91 No. 10.

POCHARD E., CLERJEAU M., y PITRAT M. La resistencia del pimiento, *Capsicum annuum* L. a *Phytophthora capsici* LEÓN I. Mise en évidence d'une induction progressive de la résistance. *Ann Amélior. Plantes*, 26(1): 35-50.

QUESADA OCAMPO L. M., FULLBRIGHT D. W., and HAUSBECK M. K. Susceptibility of Fraser Fir to *Phytophthora capsici*. 2009. Plant Disease Vol.93 No. 2.

report on PLANTDISEASE. RPD No. 947 (New). December 2001. DEPARTMENT OF CROP SCIENCES UNIVERSITY OF ILLINOIS AT URBANA-CHAMPAIGN.

RISTAINO B., Jean. Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. 1990. Phytopathology 80 1253-1259.

----- MADRITCH, Michael; TROUT L., Carol; y PARRA Gregory. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. 1998. Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, No.3.

-----; JOHNSTON, Stephen A. Ecologically Based Approaches to Management of Phytophthora Blight on Bell Pepper. 1999, PlantDisease Vol. 83 No. 12.

ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi. 2007, FeatureStory – American Phytopathology Society.

RUGELES SILVA, PAULA A.. Genotipificación mediante marcadores moleculares RAMs (Microsatélites amplificados al azar) y multiplicación de

materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth. 2011. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

SALAZAR F., VARGAS E. Métodos de evaluación y niveles de resistencia en maíz a la pudrición de la mazorca causado por *Fusarium moniliforme*. 1977. *Agronomía Costarricense*, vol. 1, no. 2., p. 93-99.

SANCHEZ H. E., MUÑOZ G. M., BRASIER C. M., TRAPERO C. A. Identify a pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. 2001. *Plant Disease*. Vol. 85 No.4.

SEDEGUI M., CARROLL R.B., MOREHART A.I., and EVANS T.A.. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. 2000. *Plant disease* Vol.85 No. 2.

SIGITA, Toru; YAMAGUCHI, Kazunori; KINOSHITA, Tetsuji; YUJI, Kenichi; SUGINURA, Yukiyo; NAGAT, Ryutarō; KAWASAKI, Shinji; y TODOROKI,

SILVAR C., DUNCAN J.M., COOKE D.E.L., WILLIAMS N.A., DIAZ J., y MERINO F.. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. 2005 *European Journal of Plant Pathology* 112: 43-52

SMART C. D., MAYTON H., MIZUBUTI E. S. G., WILLMANN M. R., AND FRY W. E. Environmental and Genetic Factors Influencing Self-Fertility in *Phytophthora infestans*. September 2000, Vol. 90, No. 9 Pages 987 – 994. The American Phytopathological Society.

TAMURA K., NEI M., AND KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.

TIAN , D. y BABADOOST, M. Host Range of *Phytophthora capsici* from Pumpkin and Pathogenicity of Isolates. 2004- May, PlantDisease.

TRUONG V., Nguyen; LIEW Y., Edward C.;BURGESS W., Lester. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper in Vietnam. FungalBiology. The British MycologicalSociety. 114(2010) 160-170.

TAY F. C. S., NANDAPALAN K., and DAVISON E. M. Growth and zoospore germination of *Phytophthora* spp. On P₁₀ VP Agar with Hymexazol. 1983. Phytopathology 73: 234-240.

URPA. Gobernación del Valle del Cauca. Secretaria de Agricultura y Pesca. 2001- B.

WATERHOUSE, G.M., NEWHOOK, F.J. AND STAMPS, D.J. present Criteria for classification of *phytophthora*. 1983. En: *Phytophthora*. its biology, taxonomy, ecology, and pathology. (ERWIN, D.C., BARTNICKI-GARCIA, S. AND TSAO, P., EDS), PP. 139–147. St Paul: American Phytopathological Society.

WICK R. L. AND DICKLOW M. B. *Epipremnum*, a new host for *Phytophthora capsici*. 2002. Plant Disease. Volume 86, Number 9 Page 1050.

XUEHUI, Yang; JIE, Yuan; y HAICHENG, Xie. Identification on phytophthora blight resistance in major cultivars of pepper in Guizhou province. 2005, Southwest China Journal of Agricultural Sciences Vol. 18 No. 6 pp. 791-793 (Abstrat)

ZHANG, G. Z.; LI, Q. Y.; FAN, H.; WANG, C. Y.; ZHENG, B. X.. Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. 2006. Plant Pathology 55, 770-775.