

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *PHYTOPHTHORA* EN AJÍ *CAPSICUM FRUTESCENS* var. TABASCO), VALLE DEL CAUCA

Natalia Aristizábal Castillo

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: natalia.aristizabal@correounivalle.edu.co / nacsui88@gmail.com

Celina Torres González

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: Celina.torres@correounivalle.edu.co

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de posibles estados quiescentes de *Phytophthora* en un terreno que apenas comenzaría a ser usado para la producción de Ají Tabasco (*Capsicum Frutescens* Var. *Tabasco*) de calidad exportación en una zona productora del Valle del Cauca. *Phytophthora* es un *Oomiceto* fitopatógeno que ataca gran variedad de plantas, desde hortalizas hasta árboles maderables, y tiene varias especies que se han encontrado en estudios del tizón tardío, mildew polvoso y pudrición de raíz del ají. El ají Tabasco es una de las variedades de mayor demanda en el mercado, y por ende es preciso profundizar en los estudios referentes a la prevención y control de las enfermedades que atacan este cultivo. Para esta investigación se hizo una colecta aleatoria de suelo del cultivo de Ají Tabasco dentro de un perímetro de 20cm alrededor de la plántula y dentro del canal entre camas de siembra. Se aislaron dos morfotipos de *Phytophthora* a los que se extrajo ADN con el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (laboratorios MO-BIO Inc.), y se corrió una PCR donde se evidenció diferencia del tamaño de bandas. Al comparar las secuencias de las regiones ITS1 e ITS4, se encontró una similitud del 98 % del aislamiento P1 con *Phytophthora cinnamomi*; el caso del aislamiento P2 tuvo una estrecha relación con el grupo perteneciente a *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae* y *P. tentaculata*.

Palabras Claves ADN, aislamientos, fitopatógeno, patogenicidad, PCR, suelo.

ABSTRACT

The purpose of this work was to search for possible quiescent states of *Phytophthora* in a field that just begun to be used for the production of Tabasco pepper (*Capsicum frutescens* Var. *Tabasco*) of exporting quality, in a growing area of Valle del Cauca. *Phytophthora* is an oomycete pathogen which attacks wide variety of plants, from vegetables to timber trees, and has several species that have been found in studies of late blight, powdery mildew and root rot of pepper. The Tabasco pepper is one of the market's greater demand varieties, and therefore it is necessary to deepen the studies on the prevention and control of diseases that attack the crop. For this investigation a random collection of soil was made from the Tabasco pepper crop, within a perimeter of 20cm around the seedling and inside the channel between planting beds. Two *Phytophthora* morphotypes were isolated to which DNA was extracted with the kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories Inc.), and a PCR was run, showing different band sizes. By comparing the sequences of the ITS1 and ITS4 regions, a similarity of 98 % was found between P1 isolation and *Phytophthora cinnamomi*; the P2 isolation had a close relationship with the group belonging to *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae* and *P. tentaculata*.

Key Words DNA, isolations, plant pathogen, pathogenicity, PCR, soil.

INTRODUCCIÓN

El Ají es un fruto perteneciente al género *Capsicum* L., el cual incluye aproximadamente 30 especies provenientes de zonas comprendidas entre el sur de Estados Unidos y Chile; ocupa el primer lugar en importancia dentro de los frutos y hortalizas que se cultivan en países de Latinoamérica,

principalmente México, Perú, Bolivia, Chile y Colombia. Se puede decir que tanto los ajíes y chiles, como los pimientos (pertenecientes al mismo género) vienen siendo utilizados en América desde hace miles de años, según yacimientos arqueológicos en México y Perú, y han perdurado hasta llegar a tal influencia que hoy en día se puede ver reflejada en el cultivo, comercialización

y consumo en países muy lejanos a su procedencia. A partir del siglo XVI el cultivo del pimiento, en sus variados tipos dulces o picantes, de carne gruesa o delgada, como especia o como hortaliza, aparece ampliamente distribuido por toda Europa y por todo el mundo.

Dentro del género *Capsicum* hay cinco especies domesticadas y 26 especies salvajes, y del total solo 12, incluyendo algunas variedades, son empleadas por el hombre (López Riquelme 2003; *The Chileman Organization*). En Colombia se cultivan diferentes especies de ají, entre las que se destacan el ají dulce, el ají topito dulce y el ají picante; principalmente semillas foráneas de variedades e híbridos tales como tabasco, cayena, habanero, y jalapeño en menor escala y el chivato (Análisis de agro negocios alianza productiva y comercial ají. Proyecto Apoyo Alianzas Productivas). Como representante de las especies domesticadas picantes se encuentra el ají Tabasco (*Capsicum frutescens* var. Tabasco) el cual es originario del estado Tabasco (de ahí su nombre), México (Valdez 1994), aunque la OECD (2006) afirma que su centro es el este amazónico. Ésta variedad tiene un gran reconocimiento alrededor del mundo por su palatabilidad, su variado uso culinario, el cual es producido y consumido tanto fresco como procesado y desde hace 145 años es conocida particularmente por la famosa “salsa Tabasco” de la empresa de *Mc Ilhenny Co. Louisiana*, Estados Unidos (Small 1999, Tabasco *Mc Ilhenny Corporation*).

Colombia tiene condiciones espectaculares para la siembra del ají, con lo que ha alcanzado 70 tn/ha en invernadero (PTP 2013), y el departamento del Valle del Cauca ha registrado altos niveles de producción desde el 2006 hasta el 2011. Sin embargo, para el 2012 su producción sufrió una reducción considerable junto con la producción nacional (una caída del 7%) (MADR 2012), esto debido tanto a factores fitosanitarios como de la producción en sí. Según la Corporación Colombiana Internacional (CCI) los principales destinos de las exportaciones colombianas de Ají hasta el año 2005 fueron Estados Unidos (52%), Arabia Saudita (46%), Canadá y las Antillas Holandesas (1% c/u). A pesar de que el mayor importador de ají tanto en seco como verde es Estados Unidos, es importante destacar que el ají colombiano en fresco no tiene acceso autorizado a éste país por no tener el Análisis de Riesgo de Plagas (ARP) requerido por las estrictas medidas sanitarias y fitosanitarias, lo que le resta un gran porcentaje del capital de ingreso a Colombia por

razón de la exportación de éste fruto (CCI 2007).

La inocuidad alimentaria es uno de los grandes puntos que Colombia debe acometer en los próximos años para alcanzar más rápidamente objetivos de competitividad de comercio internacional, ya que según el Plan de Negocios del Ají (Programa de Transformación Productiva, Noviembre 2013, Elaboración y acompañamiento del Plan de Negocios para el Sector Hortofrutícola en Colombia, Fase IV), se presenta una carencia importante desde el punto de vista del estatus fitosanitario y de inocuidad en las cadenas de frutas y hortalizas que puede condicionar la exportación de las mismas. Esto se puede evidenciar en la reducción del número de pedidos registrados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en cuanto a exportación, especialmente de ají, cebolla cabezona y fresa (ICA 2013).

Un factor importante en el cultivo de plantas de ají, es la susceptibilidad a diferentes tipos de enfermedades y plagas, lo que resulta en billones de dólares en daños y pérdidas al año en este cultivo (Rosseman & Palm 2006). Entre las enfermedades que afectan el ají, se pueden resaltar el gusano Marggot y los nematodos, bacterias como *Erwinia* y *Xantomonas*, hongos del género *Fusarium* y también virus. Otro grupo de organismos que causa graves daños al ají es el *Oomycota* (Rosseman & Palm, 2006), el cual es excluido del grupo de los hongos verdaderos e incluido en el reino *Chromista* de acuerdo a una nueva clasificación debido a que la mayor parte de su ciclo de vida es diploide mientras que los otros hongos son haploides (Ko 1998).

Perteneciente al reino *Chromista*, clasificado dentro de la familia *Pythiaceae*, se encuentra *Phytophthora* el responsable del marchitamiento del ají. Éste *oomiceto* lo promueve el clima húmedo o el exceso de agua de riego, muy común en el trópico donde se encuentra gran parte de la producción no solo del ají Tabasco sino también de las demás especies de *Capsicum* como la paprika o pimentón dulce, invade cualquier parte de la planta y puede causar cuatro síntomas por separado: tizón foliar, pudrición de la fruta, necrosis basal del tallo y pudrición de la raíz.

La especie que más se cita al momento de hablar del tizón en Chiles o ajíes, es *P. capsici* (Bartual *et al* 1991, Babadoost 2004, Hurtado 2010, Velasquez & Medina 2003), sin embargo muchos otros estudios denotan otras especies que participan

de la afección como *P. cinnamomi* y *P. infestans*. De esta manera, no es posible definir si es una sola especie de *Phytophthora* o varias a la vez las que generan la afección, y esto complica el control de la enfermedad.

En la actualidad, fungicidas químicos sintéticos han sido el método más eficiente para el control de las enfermedades en los cultivos. Sin embargo, el uso de fungicidas ha sido asociado con el deterioro de las propiedades físico-químicas del suelo, la acumulación de toxinas y el incremento de la resistencia de los patógenos. La longevidad y baja tasa de degradación de los químicos crea potenciales preocupaciones de carácter medioambiental, de salud humana y de calidad de exportación, sobre todo para un país como Colombia que está en aras de incrementar su comercio exterior. Estas inquietudes han forzado a los investigadores a encontrar inocuos pero eficaces métodos de control de la enfermedad.

De este modo, y como complemento al uso de nuevas técnicas de control de plagas, es muy importante saber con exactitud las especies de los patógenos que se encuentran en el área de siembra, en las plantas enfermas o en los viveros, para designar el uso de una tecnología, con un enfoque más definido hacia el patógeno en particular, y que evite dañar las características del suelo y de los microorganismos benéficos en los sustratos. Este trabajo buscó, mediante técnicas básicas de fitopatología, evaluar el estado fitosanitario de un terreno en inicio como cultivo de Ají Tabasco (*Capsicum frutescens* var. *Tabasco*) de calidad exportación, donde se propuso encontrar posibles estados quiescentes de *Phytophthora* con alto potencial perjudicial para la producción, y por medio de técnicas moleculares complementarias se determinó la especie de *Phytophthora* que está específicamente en los terrenos de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de Muestreo

Las muestras de suelo fueron colectadas en el cultivo que se encuentra en los terrenos de una finca destinada únicamente a la siembra de Ají Tabasco, ubicada en el corregimiento de Rozo, a 20 minutos de la cabecera municipal Palmira (departamento del Valle del Cauca), a una altitud de 974 m.s.n.m. La locación está ubicada 03°37'35,5"N, 76°25'02,5"W.

Recolección y Procesamiento de Muestras

Dejando un margen de un metro desde el borde del cultivo se tomó como referencia dos zonas para la toma de muestra: la primera, por debajo del plástico de protección dentro de un perímetro de 20cm alrededor de la plántula, y la segunda dentro del canal entre camas de siembra (Fig. 1), tomando dos muestras aleatorias de cada zona. Con la ayuda de una pala de jardinería desinfectada, se tomaron 300 gramos de suelo, se almacenaron en bolsas plásticas de cierre hermético y se guardaron en una nevera hasta su procesamiento en el laboratorio. Se preparó una solución inicial con 100g de suelo en 100mL de agua destilada estéril, de la cual se tomó 10mL y se diluyó en 90mL de agua destilada estéril para generar una solución madre. A partir de ésta última se realizaron diluciones seriadas de la siguiente forma: se tomó 1mL de la solución madre y se adicionó a un tubo de ensayo con 9mL de agua estéril para generar una concentración de 10^{-1} , de éste se tomó 1mL y se pasó a otro tubo de ensayo con 9mL de agua estéril para generar una concentración de 10^{-2} , y así sucesivamente hasta 10^{-7} . Se tomaron las últimas cuatro diluciones (10^{-4} a 10^{-7}) y se sembraron en medio de cultivo Rosa Bengala vertiendo 1mL de la dilución y extendiéndolo por todo el medio con un asa *Drigalsky* de vidrio. Por cada dilución se hicieron 3 repeticiones.



Figura 1. Cultivo de Ají Tabasco. Zona de muestreo A) dentro de un perímetro de 20cm alrededor de la plántula y B) dentro del canal entre camas de siembra.

Identificación Macroscópica y Aislamiento de *Phytophthora* spp.

Después de 7 días de incubación a 25°C, los hongos que crecieron sobre Rosa Bengala (ARB) se aislaron sembrándolos en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Las colonias obtenidas luego de 4 días de crecimiento en PDA se clasificaron por medio de una selección visual preliminar con base a las características de las colonias (Erwin & Ribeiro 1996) y la identificación de estructuras reproductivas y vegetativas (Sánchez *et al.* 1998, Stamps *et al.* 1990).

Para las características microscópicas se hicieron montajes de micelio con tinción de azul de lactofenol en placas porta objetos y se observaron bajo un microscopio *Nikon® Eclipse E200* en un aumento de 100x. Las imágenes fueron tomadas con una cámara de la serie *Optikam® Pro* instalada

en el microscopio y analizadas con el software *Optika Visión® Pro 5* para realizar la medición de las estructuras encontradas.

De este modo y siguiendo las claves de identificación y guías de características morfológicas de *Phytophthora* (Hurtado 2010, Godínez & Rosales 2008, Biles *et al.* 1995, Bartual *et al.* 1991), se seleccionaron los hongos con colonias de color blanco o crema con crecimiento distintivo (Fig. 2a), presencia de hifas coraloides, hifas con hinchamientos, esporangios ovalados, oogonios y clamidosporas intercalares (Fig. 2b). Una vez identificados morfológicamente como *Phytophthora*, se sembraron en medio Agar Avena (A.A), Agar jugo V8 (V8A) y medio líquido de jugo V8 (V8L) para la formación de estructuras reproductivas mejor desarrolladas y hacer otras comparaciones con la literatura que cita características en otros medios de cultivo.

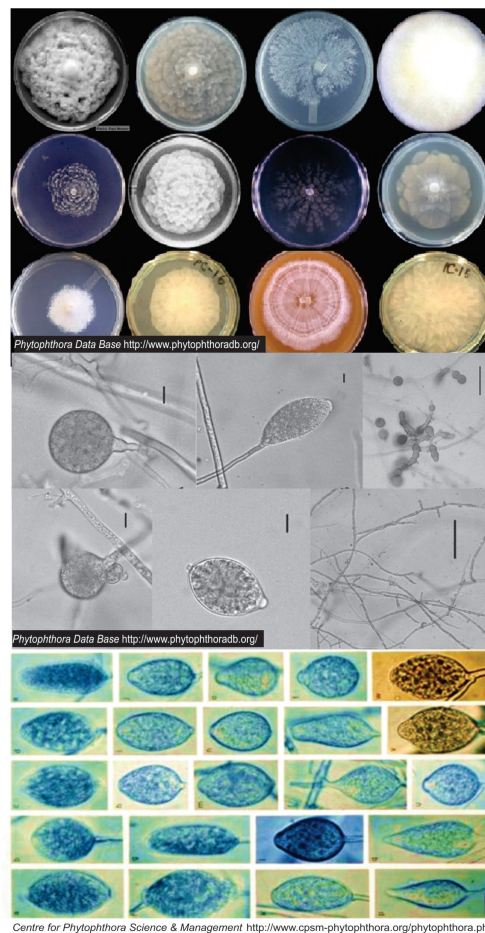


Figura 2. Características distintivas de *Phytophthora*, A) Crecimiento en medios de cultivo, B) estructuras microscópicas.

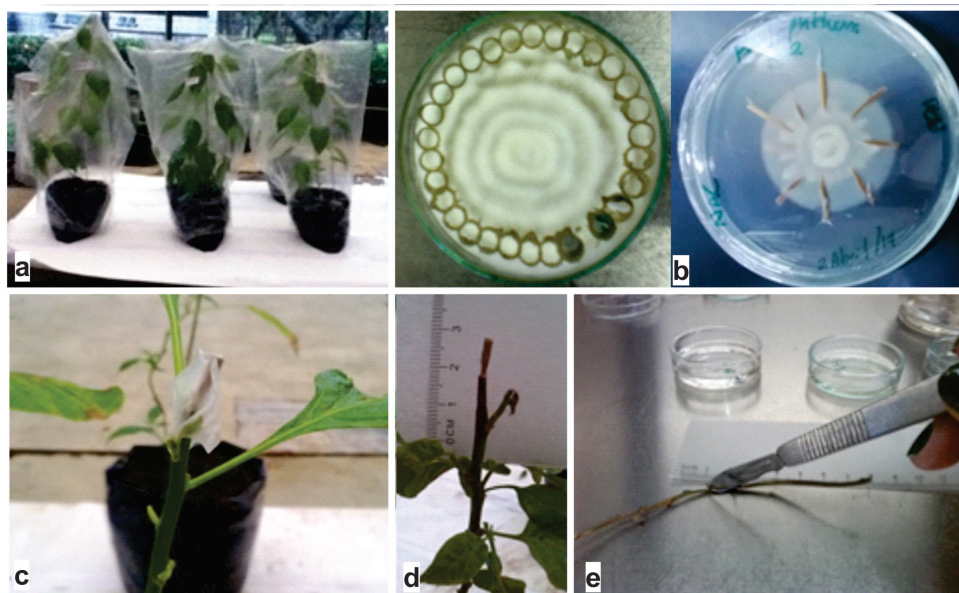


Figura 3. Evaluación Patológica. A) Pre-tratamiento de las Plantas, B) puntas de palillos cubiertas por el hongo, C) Inoculación, D) registro fotográfico, y E) Re-aislamiento.

Evaluación Patológica

Plantas a evaluar y Pre-tratamiento

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

Preparación del Inoculo

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

Inoculación

Una vez terminado el pre-tratamiento de las plantas, se realizó la inoculación siguiendo la

metodología de inoculación de corona propuesta por Pochard *et al* (1976) y Bartual *et al* (1991) (citado por Longo *et al.*, 2013; Ezziyyani *et al.*, 2005; Engelhard & Ploetz, 1979; Lefebvre & Palloix 1996), y modificándola según la inoculación con palillos propuesta por Salazar *et al* (1977) y De La Torre *et al* (2009) (citados por Hurtado-Tenorio, 2010). Se realizó un corte transversal en el área inter-nodal entre la sexta y séptima hoja madura, donde se insertó la punta de palillo colonizado con micelio del patógeno, se cubrió con cinta Parafilm®M (Laboratory Film - National American CanTM) para evitar la desecación del inóculo (Fig. 3c). Se inocularon cuatro plantas por aislamiento, cada unidad experimental se tomó como una repetición, más un testigo al que se le insertó una punta de palillo estéril.

Evaluación

A partir del tercer día de inoculación se procedió a llevar un registro del área afectada durante 20 días. Se evaluó la variable Avance Progresivo de la Infección (en milímetros) producido por el hongo en los días 3, 7, 10, 14, 17 y 21 posteriores a la inoculación (Bartual *et al.* 1991, Lefebvre *et al.*, s.f.). Se realizó registro fotográfico a la zona de inoculación, con un fondo blanco y una regla para mantener las proporciones al momento de analizar la lesión (Fig. 3d). Las fotos fueron procesadas con el software ImageJ® para medir el avance de la enfermedad. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de los datos obtenidos con un intervalo

de confianza del 95 % en el programa Statistica® v7 para encontrar diferencias significativas entre los dos aislamientos a través del tiempo.

Re-Aislamiento

Una vez terminada la evaluación, se realizó un re-aislamiento para confirmar la etiología de la enfermedad mediante los postulados de Koch siguiendo la metodología de Lucas *et al* (2002), la cual clasifica los síntomas en dos tipos: lesión ausente o no superficial y lesión superficial desarrollada. En el primer caso, se procede a cortar un segmento de 9cm del tallo desde la región de la inoculación; y en el segundo caso se corta el segmento de igual medida pero desde el borde de la lesión. Los segmentos de tallo fueron cortados en fragmentos de 1cm (Fig. 3e) y desinfectados pasándolos por un lavado de 1 minuto en agua destilada estéril, 30 segundos en alcohol al 70 %, 30 segundos en agua destilada estéril, 20 segundos en hipoclorito al 0,5 % , y un último lavado de 1 minuto en agua destilada estéril. Una vez desinfectados los fragmentos se cortaron a la mitad con un bisturí estéril y se sembraron en medio V8A, una caja petri por centímetro de tallo. Los hongos que crecieron fueron observados al microscopio para comprobar que fueran *Phytophthora*.

Identificación Molecular

Para comprobar la identidad de los hongos como pertenecientes al género *Phytophthora* se realizó la caracterización molecular (Williams *et al.* 2009). Se extrajo el ADN a partir de fragmentos del micelio de las colonias puras crecidas en medio sólido, con la menor cantidad posible de agar, y procesándolos con el *kit PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO BIO). El ADN extraído se amplificó utilizando los cebadores: ITS1 y ITS4 (White *et al.* 1990). Se determinaron las secuencias mediante procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía *Macrogen*(USA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas directamente con las secuencias depositadas en las bases de datos del *GenBank*, usando la

herramienta de búsqueda de alineación local básica. Las secuencias parciales del gen del ARNr 16S fueron editadas con el programa *Chromas LITE* versión 2.1, estas se alinearon con el programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall 1999). La clasificación filogenética fue inferida mediante el método de máxima verosimilitud con el software PAUP versión 4.0b10, se realizó una búsqueda heurística con diez repeticiones, el algoritmo de TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*) fue usado para reajustar la topología (*Branch-swapping*).

RESULTADOS

Identificación y Aislamiento de *Phytophthora*

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

El aislamiento P1 mostró un crecimiento algodonoso no muy elevado, con circunferencias concéntricas que a medida que maduraba eran menos visibles hasta que la colonia quedaba algodonosa sin evidencia de circunferencias (Fig. 4). En el caso de P2, la colonia mostró un crecimiento arrosado o en forma de crisantemo, concéntrico bien definido con puntas protuberantes (Fig. 5). La velocidad de crecimiento en los medios de cultivo (ARB, PDA, A.Av, V8A) siempre fue más rápida para P2, con un máximo de 7mm por día, mientras P1 tuvo un máximo de crecimiento de 4mm por día.

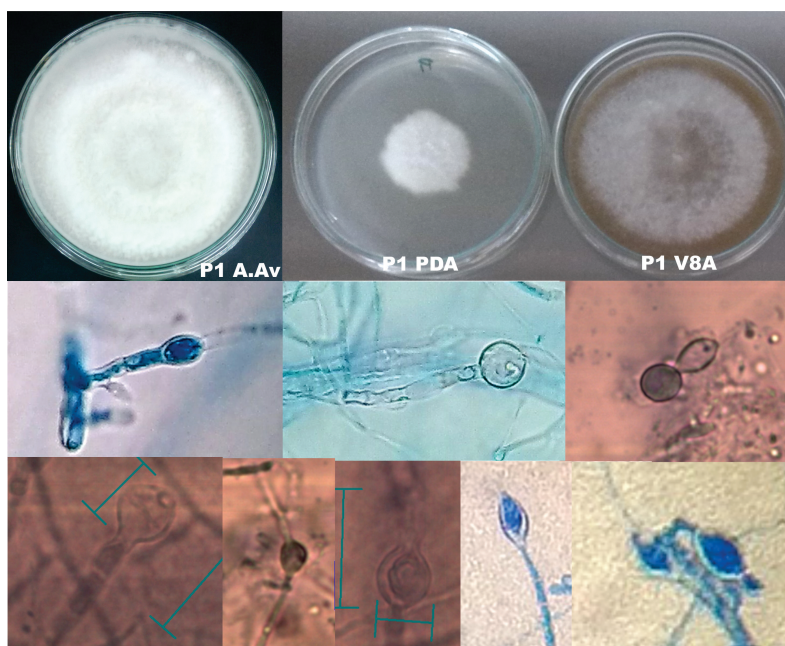


Figura 4. Características morfológicas del aislamiento P1. Crecimiento de las colonias 7 días después de la siembra en PDA, A.Av y V8A, y estructuras observadas al microscopio.

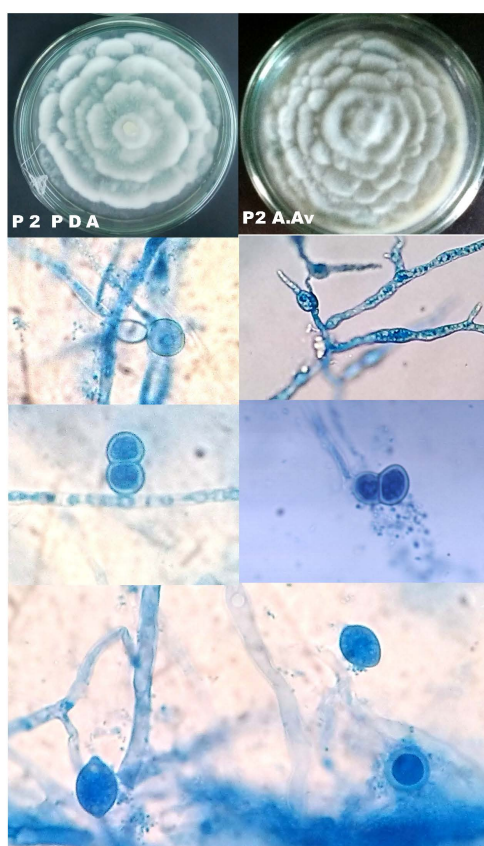


Figura 5. Características morfológicas del aislamiento P2. Crecimiento de las colonias 7 días después de la siembra en PDA, A.Av, y estructuras observadas al microscopio

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

Evaluación Patológica

El Avance de la Enfermedad fue ligeramente diferente entre las cepas aisladas (P1 y P2), por ende el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los dos *Phytophthora* (Fig. 6). De manera cualitativa, P1 mostró un comportamiento más homogéneo, con lesiones de 5 mm inicialmente en todas las repeticiones (R1 – R4) y avanzando regularmente hasta llegar al desecamiento del tallo con lesiones de 21,5 a 33,4 mm (Fig. 7a). Por otro lado, las plantas inoculadas con el hongo P2 mostraron diferentes longitudes del avance de la enfermedad desde el primer día de evaluación (día 3 post inoculación), con necrosis iniciales de 2 a 12mm, hasta llegar a valores donde la diferencia máxima entre repeticiones fue de 21mm (Fig. 7b).

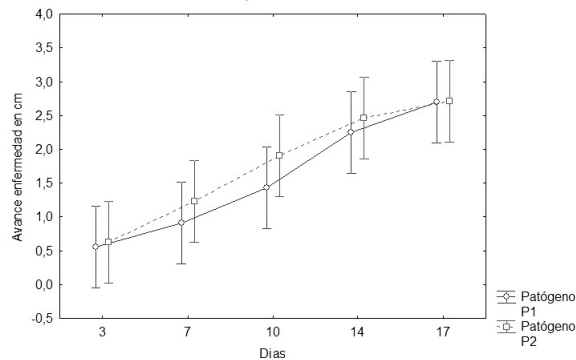


Figura 6. Análisis de varianza del Avance de la Enfermedad para P1 y P2. Intervalo de confianza del 95 %.

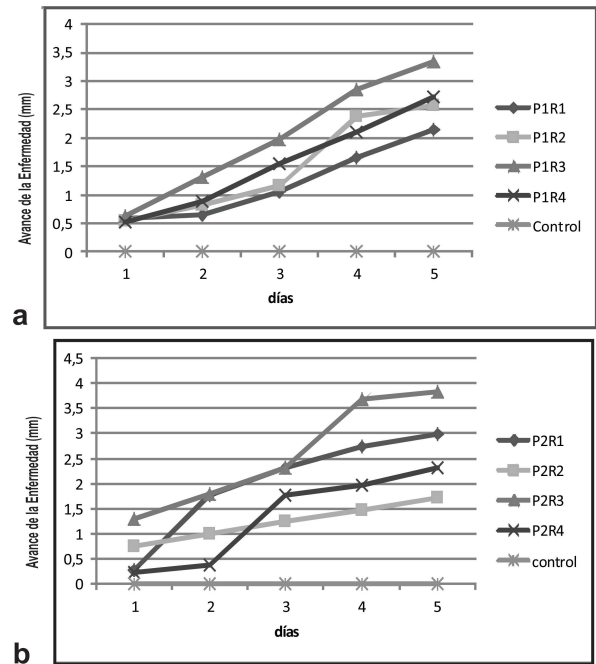


Figura 7. Gráfica del Avance de la enfermedad para A) P1 y B) P2, durante los cinco días de evaluación. Cada hongo con cuatro repeticiones (R1 – R4).

Identificación Molecular

El ADN amplificado con los cebadores ITS1 e ITS4, se visualizó en geles de agarosa al 1%, los fragmentos amplificados mostraron diferentes tamaños: una de 530pb para P1 y 642pb para P2 (Fig. 8a). Una vez determinadas, comparadas y alineadas las secuencias, se comprobó la relación de los hongos aislados con los datos de los representantes del género *Phytophthora* almacenados en GenBank. Se construyó un árbol de máxima verosimilitud tomando secuencias pertenecientes a diferentes especies del género *Phytophthora* las cuales estaban representadas en los diferentes clados reportados para esta especie; el modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue GTR+G con 0.3370 como parámetro alfa de la distribución gamma, las frecuencias nucleotídica fueron T=0.2942, C=0.2189, A=0.2225 y G=0.2645.



DISCUSIÓN

y mediciones de las colonias (Waterhouse 1963, Stamps *et al.* 1990) y de los esporangios (Ribeiro 1978, Erwin & Ribeiro 1996) son regularmente usadas para hacer la identificación de las especies de *Phytophthora*. Sin embargo se encontraron varias discordancias entre la identificación dada únicamente con las características morfológicas

y la identificación usando las claves con las características microscópicas (Ho 1992). Estos resultados demostraron la necesidad de hacer un acople de estas dos referencias junto con el análisis molecular. Aunque se han publicado varias claves sinópticas para identificar las especies de *Phytophthora* (Erwin & Ribeiro 1996, Ho 1981), como la de la de Gallegly & Hong (2008), que compila 60 especies conocidas de *Phytophthora* junto con sus fotografías y pruebas de ADN, la identificación por morfología se considera difícil debido a las características variables que a menudo se superponen dentro y entre las especies (Widmer 2010); adicional a esto, hay que tener en cuenta que en el análisis de muestras vegetales y de suelo, algunas especies de *Phytophthora* pueden no crecer en medios de cultivo pero ser positivas en PCR y viceversa, como lo reportaron Blomquist *et al.* (2005) y Donahoo *et al.* (2006), atribuyéndole este suceso a que la PCR también podría detectar esporas que no son viables o que están en algún estado de dormancia.

En cuanto a las características macroscópicas de P1, su forma algodonosa, con crecimiento en aros concéntricos, se asemeja mucho a las características de *P. cinnamomi*, *P. megasperma*, *P. cambivora* y *P. nicotianae*, pero sus características microscópicas se acercan más a las tres primeras. Aunque se describe como no papilado, en el registro fotográfico de las observaciones al microscopio se puede diferenciar un engrosamiento apical que puede dar una apariencia de esporangios semi papilado, lo cual es aceptado para la clasificación. También puede verse una estructura que, aunque en un principio se consideró como una papila, en el movimiento de enfoque se precisó como una posible germinación o la liberación de una zoospora (Fig. 5). Con el uso de las herramientas moleculares se logró relacionar a P1 con *P. cinnamomi*, consiguiendo separar P1 de *P. cambivora* con quien comparte muchas características y que de hecho se encuentra en el mismo clado que *P. cinnamomi* (Robin *et al.* 2012, Blair *et al.* 2008, *Phytophthora* Data Base).

Aunque la especie más reportada que afecta el Ají es *P. capsici* (Candole *et al.* 2012, Bosland *et al.* 1991), no se debe olvidar que *P. cinnamomi* tiene el rango de huéspedes más amplio de cualquier especie de *Phytophthora* (Robin *et al.* 2012). Ésta es especialmente asociada con enfermedades de las raíces de eucaliptos, robles y castaños, pinos, y los miembros de la *Ericaceae*, así como diversos cultivos agrícolas. La severidad causada por *P. cinnamomi* no solo se limita a la agricultura

y horticultura, también se han visto afectados ecosistemas naturales de países como Australia, donde no se ha podido controlar desde que fue reportada por Zentmyer (1983). Los síntomas van desde la mortalidad de raíces finas que conduce a la disminución gradual del árbol, a la ampliación de chancros basales, a menudo con “*bleeding cankers*” y muerte de los árboles. Sumando esto a la cualidad heterotática de *P. cinnamomi*, no se puede pasar por alto la probabilidad de llegar a tener una implicancia en las enfermedades que se puedan dar en el cultivo de Ají.

Para el caso del aislamiento P2, el registro fotográfico de las estructuras observadas al microscopio evidenció una condición de alta producción de estructuras de reproducción y de resistencia, que le aporta un carácter de alta patogenicidad. Las clamidosporas actúan como semillas de propagación y son resistentes a condiciones adversas del ambiente como sequías, temperaturas bajas, falta de alimento, etc. Esto concuerda con la características fitopatológicas de las tres especies de *Phytophthora* a las que está emparentado en el árbol generado por el análisis molecular.

Aunque se procuró hacer un análisis más detallado de los resultados microscópicos y moleculares, no se pudo establecer una especie definitiva para P2, ya que la secuenciación no siempre resulta en distinciones claras cuando se analizan especies que están relacionadas estrechamente y otras pruebas moleculares podrían no ser específicas para una especie (Cooke *et al.* 2007). *Phytophthora* es un fitopatógeno muy importante que ataca una gran variedad de cultivos, árboles maderables y arbustos en el mundo entero (Zentmyer 1983). La condición heterotática de muchas especies es el mayor problema al que se enfrenta un investigador que pretende hacer un reconocimiento taxonómico de este grupo fitopatógeno. El cruce intra e inter específico genera diferentes aislamientos y variedades, a la vez que reafirma la resistencia a los diferentes métodos de control.

P2 se relaciona cercanamente a *P. infestans*, a quien se le atribuye dos grandes desastres a nivel agrícola: la devastación de la papa (Cox & Large 1960, Fry *et al.* 1993) y el tizón tardío en cultivos de tomate, y aunque generalmente se considera que tienen una gama de hospedadores limitada y que es un patógeno casi biotrófico, se ha reportado *P. infestans* que causa la infección en un gran número de especies. Erwin y Ribeiro (1996) enlistaron 89 especies hospederas, pero más del 25 % de éstas

se incluyeron porque las inoculaciones artificiales resultaron en lesiones. En la agricultura, los dos hospederos más importantes son las papas y los tomates, pertenecientes a la misma familia del Ají (*Solanaceae*), lo que abre la duda de su posible susceptibilidad a *P. Infestans*. Aislamientos de *Phytophthora* relacionados cercanamente con *P. infestans* también se han encontrado en Sur américa en otras solanáceas, como el Tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y especies silvestres (Ordoñez *et al.* 2000). Estos aislamientos son morfológicamente idénticos a *P. infestans* pero representan genotipos nuevos basados en análisis de marcadores genéticos neutrales; por esta razón la taxonomía de estos aislamientos es indefinida, como podría ser el caso de P2.

Los resultados de este trabajo demostraron que a pesar que la zona era relativamente nueva para el cultivo, en el suelo hay presencia de estas dos especies de *Phytophthora* (P1 y P2) lo que podría considerarse como una gran amenaza a mediano y largo plazo, no solo para el cultivo de Ají ya sembrado, sino para otras especies vegetales reconocidas por su susceptibilidad a éste patógeno. Es importante considerar la posibilidad de contaminación cruzada por el movimiento que se puede dar de las estructuras de dispersión del patógeno (oosporas y zoosporas). Como lo han registrado varios autores (Rytönen 2011, Kanaskie *et al.* 2007, Zentmyer & Mircetich 1966) la mayoría de las especies de *Phytophthora* soportan un estado de quiescencia de hasta 6 años, en forma de micelio en suelos húmedos y como clamidosporas mientras el suelo tenga más de un 3 % de humedad. También pueden sobrevivir como

saprófitos en material vegetal en descomposición (sobrevivencia influenciada por el potencial de la matriz del suelo) y puede sobrevivir en este sustrato por largos periodos (Shea *et al.* 1980). Todo lo anterior hace de estos dos aislamientos de *Phytophthora* una amenaza latente para el cultivo ya presente y los posibles cultivos que le subsigan.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la profesora Celina Torres González, por su constante apoyo, tanto en la realización de esta tesis como en mi proceso en general como estudiante de Biología. Doy gracias a Gustavo Rodríguez por emprender este camino conmigo y ser un apoyo logístico y moral, a Alexander Mora Collazos por su acompañamiento constante en el laboratorio, su ayuda en los análisis moleculares y su apoyo en la redacción del trabajo. Debo agradecer a Jennifer Moreno, Aura Vivas, los integrantes del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) y los estudiantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal del programa de Biología de la Universidad del Valle, por sus significativos aportes y acompañamiento. También doy gracias a la empresa Hugo Restrepo y Cia. S.A., por permitirnos hacer uso de un cultivo para realizar el muestreo y por proporcionar el material vegetal para los ensayos de patogenicidad.

Por último, agradezco a mi familia por su persistente apoyo en esta etapa de mi carrera, por su ayuda financiera y sentimental en todos los altibajos.

LITERATURA CITADA

- Babadoost, M. (2004), "*Phytophthora* blight: A serious threat to cucurbit industries", available at: www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Documents/2004/CucurbitPhytophthora (accessed Abril 2014).
- Bartual, R., Marsal, J. I., Carbonell, E. A., Tello, J. C. & Campos, T. (1991), "Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento", *Boletín de Sanidad Vegetal*, Plagas, Vol.17 No.1, pp. 3-124.
- Biles, C. L., Bruton, B. D., Wall, M. M. and Rivas, M. (1995), "*Phytophthora capsici* zoospore infection of pepper fruit in various physical environments". *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, Vol. 75, pp. 1-5.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park S. Y., Geiser, D. M. and Kang, S. (2008), "A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences", *Fungal Genetics and Biology*, Vol. 45, pp.266-277.
- Blomquist, C., Irving, T., Osterbauer, N., and Reeser, P. (2005), "*Phytophthora hibernalis*: A new pathogen on Rhododendron and evidence of cross amplification with two PCR detection assays for *Phytophthora ramorum*", available at: www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2010/Rhododendron/ (accessed March 2013).

- Bosland, P. W. and Lindsey, D. L. (1991), "A seedling screen for *Phytophthora* Root rot of pepper, *Capsicum annum*", *Plant Disease*, Vol. 75, pp. 1048-1050.
- Candole, B. L., Conner, P. J. and Ji, P. (2012), "Evaluation of *Phytophthora* root rot-resistant *Capsicum annum* accessions for resistance to *Phytophthora* foliar blight and *Phytophthora* stem blight", *Agricultural Sciences*, Vol. 3 No. 5, pp. 732 – 737.
- Corporación Colombia Internacional (CCI) (2007), "Ají Colombiano: Grandes oportunidades de mercado", *Revista Sembremos*, Sección Mercados, Abril 2007, Vol. 1, pp. 7, disponible en: <http://cci.org.co/ccinew/pdf/SEMBREMOS/ABRIL%202007%20REVISTA%201/03%20mercados.pdf>> (acceso Marzo 2013)
- Cooke, D. E. L., Schena, L., and Cacciola, S. O. (2007), "Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems", *Journal of Plant Pathology*, Vol. 89, pp.13-28.
- Cox, A. E. and Large, E. C. (1960), "Potato late blight epidemics throughout the world". U. S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, *Agriculture Handbook*, US Government Printing Office, Washington D.C, USA, No. 174, pp. 230.
- De La Torre-Almaráz, R., Cota-Trujillo, F. M., García-Rojas, J. L., Campos, J. E. & San-Martín, F. (2009), "Etiología de la muerte descendente del Mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México", *Agrociencia*, México. Vol. 43 No. 2, pp. 197-208. Disponible en: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1405-31952009000200010&ng=es&nrm=iso (acceso Julio 2014).
- Donahoo, R., Blomquist, C. L., Thomas, S. L., Moulton, J. K., Cooke, D. E. L., and Lamour, K. H. (2006), "*Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of azalea", *Mycological Research*, Vol. 110, pp. 1309-1322.
- Ezziyyania, M., Requena, M. E., Pérez-Sánchez, C. & Candela, M. E. (2005), "Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.), *Anales de Biología*, Vol. 27, pp. 119-126.
- Engelhard, A. W. and R. C. Ploetz. (1979), "*Phytophthora* crown and stem rot, an important new disease of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*)", *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Vol. 92, pp. 348-350.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. (1996), *Phytophthora Diseases Worldwide*, American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, pp. 562.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B. Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y.J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D.A. and Sandlan, K. P. (1993), "Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications", *Plant Disease*, Vol. 77 No. 7, pp. 653-661.
- Gallegly, M. E., and Hong, C. (2008), *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*, American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Godinez-Regalado, L. & Rosales-Jimenez, V. (2008) Determinación de la Patogenicidad de Cepas de *Phytophthora cinnamomi* en Plántulas de Aguacate Raza Mexicana. Tesis para Ingeniero Agrónomo Especialidad en Parasitología. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hall, T. (1999), BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 41, pp. 95-98.
- Hurtado-Tenorio, I. (2010) *Búsqueda de Resistencia a Phytophthora capsici Leonian en Germoplasma de Capsicum spp.* Tesis Magister en Ciencias con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cali, Palmira.
- Ho, H. H. (1992), "Key to Species of *Phytophthora* in Taiwan", *Plant Pathology Bulletin*, Vol. 1, pp. 104-109.
- Ho, H. H. (1981), "Synoptic keys to the species of *Phytophthora*", *Micología*, Vol. 73, pp.705-714.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2013), *Elaboración y Acompañamiento del Plan de Negocios para el Sector Hortofrutícola en Colombia, Fase IV, Plan de Negocios de Aguacate*, Programa de Transformación Productiva, Fase 3: Diagnóstico del Sector en Colombia, Noviembre, 2013. Disponible en: www.ptp.com.co/documentos/PLAN

- Kanaskie, A., McWilliams, M., Goheen, E., Hansen, E., Sutton, W. and Reeser, P. (2007), "Eradication of *Phytophthora ramorum* from Oregon Forests: Status after six years". Sudden Oak Death Science Symposium III, Santa Rosa, California, March 2007, pp. 5-9
- Ko, W. (1998), "Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*". *Botanical Bulletin Academia Sinica Taipei*, Vol. 39, pp. 81-86.
- Ministerios de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) (2012), *Anuario Estadístico de Frutas y Hortalizas 2007-2011 y Sus Calendarios de Siembras y Cosechas*. Resultados Evaluaciones Agropecuarias Municipales 2011. Dirección de Política Sectorial. Elaborado por Grupo Sistemas de Información. Evaluaciones Agropecuarias Municipales, Noviembre 2012, Bogotá, D.C. Editorial JL Impresores LTDA
- Lefebvre, V. and Palloix, A. (1996), "Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: A case study the interaction pepper – *Phytophthora capsici* Leonian", *Theoretical Applied Genetics*, Vol. 93, pp. 503-511.
- Leonian L.H. (1922). "Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov.", *Phytopathology*, vol. 12, pp. 401-408.
- Longo, L., Galli, M., Haegi, A., Proietti, P. and Belisario, A. (2013), "First Report of *Phytophthora nicotianae* causing wilting and desiccation on *Buxus sempervirens* in Italy", *New Disease Report*, Vol. 28, pp. 5.
- López-Riquelme O.G. (2003), "Chilli: La especie del nuevo mundo", *Ciencias*, Vol. 69, pp. 66-75.
- Lucas, A., Colquhoun, I.J., Mc Comb, J.A. and Hardy, G.E.St.J. (2002), "A New Rapid and Non-invasive technique to inoculate plants with *Phytophthora cinnamomi*", *Australian Plant Pathology*, Vol. 31 No. 1, pp. 27-30.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2006), *Safety assessment of transgenic organisms*. OECD Publishing. Pp. 821.
- Oelke, L., Bosland, P. & Steiner, R. (2003), "Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol. 128, pp 213–218.
- Ordoñez, M.E., Hohl, H.R., Velasco, J.A., Ramon, M.P., Oyarzun, P.J., Smart, C.D., Fry, W.E., Forbes, G.A. and Erselius, L.J. (2000), "A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans*, attacks wild *Solanum* species in Ecuador". *Phytopathology*, Vol. 90 No. 2, pp.197-202.
- Programa de Transformación Productiva (PTP) (2013), *Elaboración y Acompañamiento del Plan de Negocios para el Sector Hortofrutícola en Colombia, Fase IV*, Plan de Negocios del Ají, Noviembre 2013. Disponible en: www.ptp.com.co/documentos/PLAN
- Pochard, E., Clerjeau, M. and Pitrat, M. (1976) La résistance du piment, *Capsicum annuum* L., à *Phytophthora capsici* Leon. I. Mise en évidence d'une induction progressive de la résistance. *Annual of Amélior Plantes*, Vol. 26, pp. 35-50.
- Ribeiro, O.K. (1978), "A source book of the genus *Phytophthora*", in Cramer, J. (Ed.), Cornell University, Germany, Vaduz, Lichtenstein, pp. 417.
- Robin, C., Smith, I., and Hansen, E.M. (2012), *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Phytophthoras*, Vol. 2 No. 1. doi: 10.5399/osu/fp.2.1.3041
- Rossmann, A.Y. and Palm, M.E. (2006), *Why are Phytophthora and other oomycota not true fungi?*, ASDA Agricultural Research Service, ASDA Animal and Plant Health Inspection Service Systematic Botany & Mycology Laboratory, American Phytopathology Society Press, Beltsville, MD.
- Rytkönen, A. (2011), "*Phytophthora* in Finnish nurseries. Dissertationes Forestales 137, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki. pp. 38. Available at <http://www.metla.fi/dissertationes/df137.htm> (acceso Abril 2014)"
- Salazar, F. & Vargas, E. (1977), "Métodos de evaluación y niveles de resistencia en maíz a la pudrición de la mazorca causado por *Fusarium moniliforme*". En: *Agronomía Costarricense*, Vol. 1 No. 2, pp. 93-99.
- Sánchez, M. E., Ruiz, D., Pérez, A., Blanco, M.A. and Trapero, A. (1998). "Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern of Spain", *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 104, pp. 347-357.

- Shea, S.R.; Gillen, K.J. and Leppard, W.I. (1980), "Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm. sites in the northern jarrah forests of south-western Australia", *Protection Ecology*, Vol. 2, pp. 135-156. En: CABI & EPPO. 2004. Data Sheets on Quarantine Pests, *Phytophthora cinnamomi*.
- Small, E. (2009), *Top 100 food plants*. NRC Research Press. 636 pp.
- Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F. and Hall, G.S. (1990), "Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*", *Mycological Papers*, CAB International, Mycological Institute, Wallingford, Oxon, UK, No. 162.
- Tabasco Mc Ilhenny Corporation Web site. <<http://www.tabasco.com/tabasco-products/how-its-made/making-original-tabasco-sauce>>consulta: Febrero 2013.
- Valdez, V. (1994), "Cultivo de ají". Fundación de desarrollo agropecuario. Edición centro de información FDA. Boletín No. 20, pp. 22.
- Waterhouse, G.M. (1963), "Key to the species of *Phytophthora* de Bary", *Mycological Papers*, Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, Vol. 92.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y: Academic Press, Inc., Pp. 315-322.
- Widmer, T. L. (2010), "Differentiating *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* from other species isolated from foliage of rhododendrons", *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2010-0317-01-RS, available at: <http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/40026/1/IND44344691.pdf>.
- Williams, N., Hardy, G.E.St.J. and O'Brien, P.A. (2009), "Analysis of the distribution of *Phytophthora cinnamomi* in soil at a disease site in Western Australia using nested PCR", *Forest Pathology*, Vol. 39 No. 2, pp. 95-109.
- Zentmyer, G.A. (1983), "The world of *Phytophthora*", in: Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P.H. (Eds.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*, The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 392.
- Zentmyer, G.A. and Mircetich, S.M. (1966), "Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*", *Phytopathology*, Vol. 56, pp. 710-712. En: CABI/EPPO, 1998. Distribution maps of quarantine pests for Europe (edited by Smith, I. M. and Charles, L. M. F.). Data Sheets on Quarantine Pests, *Phytophthora cinnamomi* Wallingford, UK: CAB International, xviii + 768 pp.