

Distribución Espacio Temporal de la Marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e Identificación del Agente Causal

***Phytophthora capsici* Leo.**

Spatio-Temporal Distribution of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Wilt in Chihuahua and Identification of the Causal Agent *Phytophthora capsici* Leo.

Hilda Victoria Silva-Rojas, Colegio de Postgraduados, Producción de Semillas, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo de México CP 56230; **Sylvia Patricia Fernández-Pavía**, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH, km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, México CP 58880; **Carlos Góngora-Canul**, Iowa State University, Department of Plant Pathology, 325 Bessey Hall, Ames, IA 50011; **Bertha Catalina Macías-López**, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Km 2.5 Carr. Delicias-Rosales, Delicias, Chihuahua, México CP 33000 y **Graciela Dolores Ávila-Quezada**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Av. 4 Sur No. 3820, Fracc. Vencedores del desierto, Delicias, Chihuahua, México CP 33089. Correspondencia: gavilaq@ciad.mx

(Recibido: Septiembre 10, 2009 Aceptado: Noviembre 10, 2009)

Silva-Rojas, H.V., Fernández-Pavía, S.P., Góngora-Canul, C., Macías-López, B.C. y Ávila-Quezada, G.D. 2009. Distribución Espacio Temporal de la Marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 27:134-147.

Resumen. *Phytophthora capsici* es el oomyceto que causa pudrición de raíz y marchitez del chile jalapeño en la región Centro Sur del estado de Chihuahua. En el sistema de riego rodado que se emplea en esta área, los zoosporangios liberan zoosporas que pueden diseminarse por el movimiento superficial del agua ocasionando la diseminación del patógeno en lugares donde no había estado presente. Por esta razón, durante los años 2002 y 2003 se estudió la distribución espacio-temporal de la marchitez del chile jalapeño, en los municipios de Camargo y Delicias, Chih. y se identificó al agente causal. La distribución espacio-temporal se determinó mediante la distribución de Poisson y la autocorrelación espacial. Estos estudios mostraron que el patógeno se dispersó del primer foco de infección hasta diez plantas (4.5m) de manera continua con la misma trayectoria del riego rodado y hasta cuatro plantas contiguas (2m) a través del surco (agregados) en dirección del encharcamiento por falta de nivelación del terreno. El patógeno se dispersó de las plantas enfermas a las sanas por medio del agua. Gompertz fue el modelo que mejor describió el progreso de la enfermedad obteniendo tasas de intensidad aparente de 0,008 a 0,016 gompitz dia⁻¹ ($R^2 = 0,75$ a 0,95). Para identificar el agente causal de la marchitez del chile jalapeño, se aisló el

Abstract. *Phytophthora capsici* is the oomycete that causes root rot and wilting of jalapeño pepper in the South Central region of Chihuahua State. The zoosporangia release zoospores which can spread by water surface movement, resulting in pathogen dispersion in places where it was not present yet. Therefore, the spatio-temporal distribution of wilting on jalapeño pepper was studied in 2002 and 2003 in the municipalities of Camargo and Delicias, Chih. The spatio-temporal distribution was determined by the Poisson distribution and the spatial autocorrelation analysis. These studies revealed that the disease continuously spreads from a single infected plant up to ten nearest neighboring plants within the row (4.5m), and up to four continuous neighboring plants across the row (2m), this may indicate that the pathogen's dispersal followed the furrow irrigation path and aggregates mainly in the waterlogged spots due to a lack of land leveling in the field. Gompertz was the model that best described the progress of the disease, reaching apparent intensity rates from 0,008 to 0,016 gompitz day⁻¹ ($R^2 = 0,75$ to 0,95). In order to determine the causal agent of the jalapeño pepper wilt the pathogen was isolated from diseased plants and by pathogenicity test. The isolates were identified as *P. capsici* throughout morphological characteristics, and sequencing of 796 bp of the internal transcribed spacers (ITS) of the rDNA. The representative isolate sequence was deposited in GenBank with the accession number EF660564. Compatibility types A1 and A2 were detected among the isolates, and they were sensitive to mefenoxam.

patógeno de plantas enfermas y se probó su patogenicidad. Los aislamientos se identificaron como *P. capsici* mediante morfología y secuenciación de 796 bp de los espaciadores internos transcritos (ITS) del rDNA. La secuencia del aislamiento representativo se depositó en el GenBank con el número de acceso EF660564. En los aislamientos de *P. capsici* obtenidos se detectaron los tipos de compatibilidad A1 y A2 los cuales fueron sensibles a mefenoxam.

Palabras clave adicionales: Oomyceto, *Capsicum annum*, distribución de Poisson, autocorrelación espacial.

INTRODUCCIÓN

Chihuahua es el segundo estado productor de chile jalapeño (*Capsicum annum* L.) en el país, el cultivo representa un valor comercial de 1779'593,000 pesos anuales (SIAP, 2007) y contribuye a la generación de empleos rurales y de otros sectores con más de 4'690,000 jornales (Orozco, Gamaliel. Comunicación personal). Estas cifras demuestran el impacto social y económico del cultivo en el estado. Una de las enfermedades más importantes del cultivo es la marchitez causada por el patógeno *Phytophthora capsici* Leon, el cual causa pudrición de la raíz. La enfermedad puede presentar incidencias altas cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo del oomyceto. En Chihuahua se considera a la marchitez como uno de los principales problemas fitosanitarios del chile jalapeño, debido a que ocasiona graves pérdidas en el rendimiento por el rápido progreso de la enfermedad (Gevens *et al.*, 2007; Guigón y González, 2001).

Las oosporas invernan en el suelo e inician la primera infección en primavera (Erwin y Ribeiro, 1996; Hwang y Kim, 1995; Lamour y Hausbeck, 2001; Lamour y Hausbeck, 2003), estas se producen cuando el micelio de los tipos de compatibilidad A1 y A2 entran en contacto. El micelio y los zoosporangios se desarrollan en tejido enfermo a temperatura de 25 a 28 °C, en condiciones de humedad superior a 80% (Erwin y Ribeiro, 1996; Hausbeck y Lamour, 2004; Schlub, 1983). Los zoosporangios y las zoosporas son inóculo asexual secundario producido durante el ciclo agrícola, el cual ocasiona un progreso rápido de la enfermedad (Erwin y Ribeiro, 1996), además en agua libre los esporangios liberan de 20 a 40 zoosporas móviles, cada una capaz de causar infección (Bernhardt y Grogan, 1982; Erwin y Ribeiro, 1996). La marchitez es considerada como una enfermedad policíclica debido a que completa más de un ciclo de enfermedad durante el ciclo del cultivo, en la cual, las plantas enfermas sirven de fuente de inóculo para causar infecciones secundarias en plantas vecinas por medio de esporangios y zoosporas (Bowers *et al.*, 1990; Campbell y Madden, 1990; Larkin *et al.*, 1995; Ristaino, 1991). Cuando se combinan herramientas estadísticas y biológicas es posible caracterizar el proceso policíclico de la enfermedad en una región, así como el proceso de diseminación espacial de ésta determinado por la capacidad del patógeno para dispersarse hacia las plantas vecinas en condiciones de campo. También, la asociación espacial de plantas enfermas permite localizar los focos de infección y determinar el área afectada para dirigir el manejo a

Additional key words: Oomycete, *Capsicum annum*, Poisson distribution, spatial autocorrelation.

INTRODUCTION

Chihuahua is the second producer state of jalapeño pepper (*Capsicum annum* L.) country wide, having a commercial value of 1779'593,000 Mexican pesos on a yearly basis (SIAP, 2007), contributing to the generation of rural employment and some other sectors with over 4'690,000 wages (Orozco, Gamaliel. Personal communication). These have the social and economical impact derived from the exploitation of this crop in the state. One of the most important diseases for this crop is pepper wilt caused by the root pathogen *Phytophthora capsici* Leon, which causes root rot. The disease incidence can be high when environmental conditions favor the oomycete development. This disease is considered in Chihuahua as one of the main problems for jalapeño pepper production because it causes a severe yield loss due to its rapid progression (Gevens *et al.*, 2007; Guigón and González, 2001).

The oospores overwinter in soil and initiate the first infection over the spring (Erwin and Ribeiro, 1996; Hwang and Kim, 1995; Lamour and Hausbeck, 2001; Lamour and Hausbeck, 2003), and they are produced when the mycelium of compatibility types A1 and A2 get in contact. Both mycelium and zoosporangia develop from diseased tissue at temperature ranging from 25 to 28 °C, and humidity over 80% (Erwin and Ribeiro, 1996; Hausbeck and Lamour, 2004; Schlub, 1983). The zoosporangia and zoospores are secondary asexual inoculum produced during the growing season, causing a rapid progress of the disease (Erwin and Ribeiro, 1996); furthermore, the sporangia release 20 to 40 motile zoospores in free water, each capable of causing infection (Bernhardt and Grogan, 1982; Erwin and Ribeiro, 1996). Pepper wilt is considered as a polycyclic disease that completes more than one disease cycle within the crop cycle, in which, diseased plants serve as inoculum source to cause secondary infections in neighboring plants by means of sporangia and zoospores (Bowers *et al.*, 1990; Campbell and Madden, 1990; Larkin *et al.*, 1995; Ristaino 1991). When statistical and biological tools are used, the polycyclic disease process can be characterized in a region, as well as the process of the disease spatial spread determined by the ability of the pathogen to disperse towards the neighboring plants under field conditions. Also, the spatial association of diseased plants allows to identify the infection outbreaks and to determinate the infected area in order to focus on proper management towards the outbreaks of diseased plants (Avila-Quezada *et al.*, 2002; 2003). Likewise, the spatial patterns of plants with symptoms help to understand the pathosystem and allow making a better selection of control strategies or crop integrated management. The present study is aimed to characterize the disease temporal progress and the pepper wilt distribution in the jalapeño pepper producing region, specifically from the state of Chihuahua, i) to determine the spatial patterns, aggregation intensity and spatial lag dependence between diseased plants, and directionality of dispersal ii) to characterize the disease spatio-temporal development and iii)

los focos de plantas enfermas (Ávila-Quezada *et al.*, 2002; 2003). Asimismo, la distribución de los patrones espaciales de plantas con síntomas, ayuda a entender el patosistema y permite elegir mejores estrategias de control o manejo integrado del cultivo.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de caracterizar el progreso temporal de la enfermedad y la distribución de la marchitez del chile en la región productora de chile jalapeño en el estado de Chihuahua, específicamente i) determinar los patrones espaciales, intensidad de agregación o dependencia espacial entre plantas enfermas, y direccionalidad de la dispersión ii) caracterizar el desarrollo espacio-temporal de la enfermedad, iii) Identificar el patógeno causante de la marchitez mediante pruebas morfológicas y secuenciación del espacio transcrito interno del rDNA así como, determinar el tipo de compatibilidad y la reacción al mfenoxam y iv) asociar las herramientas epidemiológicas con posibles medidas de manejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio. Durante los ciclos agrícolas 2002 y 2003 se muestrearon cuatro parcelas cultivadas con chile jalapeño en la región del centro-sur del estado de Chihuahua, en las localidades de Camargo en el 2002, rancho Cuatro vientos en Delicias en el 2002, rancho El Rosal en Camargo en el 2003 y Km 73 carretera Camargo-Conchos en el 2002.

Estudio temporal. En cada parcela se muestrearon 625 plantas, cada una considerada como una unidad experimental en un cuadrante de 25 x 25 plantas, donde la variable epidemiológica evaluada fue la incidencia de la marchitez. Esta se determinó visualmente cada ocho días, evaluando los síntomas típicos de marchitez en la planta completa durante todo el ciclo del cultivo. Consecuentemente, a las plantas con síntomas de marchitez se les asignó el valor 1, y 0 a las plantas asintomáticas. La incidencia total de la parcela se determinó obteniendo la proporción de plantas enfermas con respecto al total de las plantas de cada parcela/100. Los datos de incidencia/100 de cada parcela se graficaron con respecto al tiempo para obtener curvas de progreso de la enfermedad y se ajustaron a cuatro modelos linealizados; monomolecular ($\ln[1/(1-y)] = \ln[1/(1-y_0)] + rMt$), logístico ($\ln[y/(1-y)] = \ln[y/(1-y_0)] + rLt$), Gompertz ($-\ln[-\ln y] = -\ln[-\ln(y_0)] + rGt$) y exponencial ($\ln[y] = \ln(y_0) + rEt$) para propósitos de predicción de futuros datos teóricos. Los criterios para determinar que modelo ajustó los datos del progreso de la enfermedad fueron el coeficiente de determinación (R^2), significancia estadística ($Pr > F$), cuadrado medio del error (CME) y la prueba Shipiro-Wilk para evaluar normalidad de los residuales. El modelo que mejor ajustó los datos de progreso temporal de la enfermedad, permitió conocer la tasa de progreso de enfermedad o la velocidad del progreso temporal de la enfermedad (Campbell y Madden, 1990). El análisis temporal de los datos se realizó con el programa SAS para windows ver. 6.11.

El Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE= $\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (y_i + y_{i+1}) (t_{i+1} - t_i)$ se determinó para las cuatro epidemias de las cuatro parcelas utilizando el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990).

that cause wilt according to morphological characteristics and sequence of the internal transcribed spacer rDNA and to determine the compatibility type and reaction to mfenoxam iv) to associate epidemiological tools with possible management strategies.

MATERIALS AND METHODS

Areas of study. Four fields cultivated with jalapeño pepper were sampled during 2002 and 2003 growing season in the south central region of the state of Chihuahua, in the Camargo location in 2002, Km 73 Camargo-Conchos road in 2002, El Rosal ranch in Camargo in 2003 and Cuatro Vientos ranch in Delicias, Chihuahua in 2002.

Temporal study. In each field 625 plants were sampled, each plant was considered as an experimental unit within an experimental quadrant of 25 X 25 plants, where the estimate variable was incidence. It was visually determined every eight days during the whole growing cycle by plants that showed the typical wilt symptoms. Consequently, the value of 1 was assigned to plants with wilting symptoms and 0 value assigned to asymptomatic plants. Total incidence of the field was determined by obtaining the proportion of diseased plants respect to total plants within each field/100. The incidence data/100 from each field versus time was plotted to obtain the disease progress curves and were adjusted to four linearized population growth curve models, monomolecular ($\ln[1/(1-y)] = \ln[1/(1-y_0)] + rMt$), logistic ($\ln[y/(1-y)] = \ln[y/(1-y_0)] + rLt$), Gompertz ($-\ln[-\ln y] = -\ln[-\ln(y_0)] + rGt$) and exponential ($\ln[y] = \ln(y_0) + rEt$) for the prediction of future theoretical data. The criteria for determining model adjustment to the disease incidence data were the coefficient of determination (R^2), statistical significance ($Pr > F$), mean square error (MSE) and the Shipiro-Wilk test to evaluate residuals normality. The model that best adjusted to disease temporal progress allows to determine the disease progress rate or the velocity of the disease temporal progress (Campbell and Madden, 1990). Data were analyzed using the SAS program for windows ver.6.11. The area under the disease progress curve AUDPC= $\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (y_i + y_{i+1}) (t_{i+1} - t_i)$ was determined for the four epidemics for the four fields using trapezoidal integration method (Campbell and Madden, 1990).

Spatio-temporal analysis. The spatial pattern, aggregation intensity and directionality were determined by spatial autocorrelation using the Modjeska and Rawlings model (1983), throughout the LCOR2 program (Gottwald *et al.*, 1992); thus, the Poisson discrete probability distribution was utilized to confirm a none-aggregated spatial pattern and also because all data for the disease were binary (0 and 1). The square *Chi-square* (χ^2) distribution was used as a goodness of fit determine if the Poisson distribution properly adjusted the data, if $P < 0.05$, then null hypothesis is rejected that states that the spatial pattern is random. The Poisson distribution required an optimal quadrant size to get frequencies of diseased plants. The optimum quadrant size (OQS) utilized to determine the distribution was obtained by the Greig-Smith method (1957) in block sizes of 4, 8, 16, 32, 64 and 128 plants. The OQS was identified as the highest variance corresponded to a particular

Estudio espacio-temporal. El tipo de patrón espacial, la intensidad de agregación y la direccionalidad se determinó por medio de autocorrelación espacial usando el modelo de Modjeska y Rawlings (1983) a través del programa LCOR2 (Gottwald *et al.*, 1992), asimismo, se utilizó la distribución de probabilidad discreta Poisson para corroborar el tipo de patrón espacial no agregado y dado que los datos de la enfermedad fueron binarios (0 y 1). Para determinar si la distribución Poisson ajustó a los datos se utilizó la distribución *Ji-cuadrada* (χ^2) como prueba de bondad de ajuste, si $P < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula que establece que la distribución tiene una distribución aleatoria. La distribución Poisson, requirió un tamaño óptimo de cuadrante que incluyera frecuencias de plantas enfermas. El tamaño óptimo de cuadrante (TOC) utilizado para determinar la distribución, se obtuvo mediante el método Greig-Smith (1957) en tamaños de bloques de 4, 8, 16, 32, 64 y 128 plantas. El TOC se identificó con la varianza más alta que corresponde también al cuadrado medio más alto (Campbell y Madden, 1990).

Aislamiento del patógeno. Los patógenos involucrados en la marchitez del chile se aislaron de plantas de cuatro meses de las parcelas comprendidas en este estudio, con síntomas de decaimiento del área foliar y pudrición en el sistema radical. El tejido enfermo se lavó con agua de la llave, se cortó en pequeñas secciones de 0.3 cm^2 en el límite del área sana y del área necrótica, se enjuagaron con agua destilada estéril y se desinfectaron con una solución de 1% de cloro comercial (hipoclorito de sodio) por 30 s, enjuagándose nuevamente con agua destilada estéril. Las porciones de tejido se secaron con papel estéril y se colocaron en cajas de Petri conteniendo medio selectivo PVPP (Papavizas *et al.*, 1981). Posteriormente se transfirieron de forma aséptica a Papa Dextrosa Agar (PDA) y medio jugo de verduras (V-8). Se seleccionó un aislamiento de cada parcela.

Pruebas de patogenicidad. Los aislamientos obtenidos de *Fusarium* sp. y de *Phytophthora* sp. se inocularon utilizando dos métodos. Se enfrentaron a plantas de chile jalapeño var. Mitla, de 20 días, las cuales se mantuvieron en bolsas de plástico, con capacidad de 5 kg, con suelo estéril. Cuando el micelio de cada aislamiento cubrió la caja de Petri, se cortaron con un sacabocado 5 discos de 1 cm de diámetro y se colocaron en el sustrato a una distancia de 0.3 cm de la raíz y 1 cm de profundidad de cinco plantas. Asimismo se preparó una suspensión de conidios de *Fusarium* que se colocaron en el suelo a la misma distancia de la raíz y profundidad en otras cinco plantas. El suelo se regó a capacidad de campo. Adicionalmente para probar la patogenicidad de *Phytophthora* se utilizó la variedad susceptible de chile Sonora, inoculando plántulas de 28 días, con una suspensión de 10,000 zoosporas mL^{-1} de acuerdo con el protocolo descrito por Fernández-Pavía *et al.* (2004).

Extracción del DNA genómico. Los aislamientos de *Phytophthora* sp. se cultivaron en medio sólido PDA y V-8, las cajas de Petri se colocaron a una temperatura de 20 a 25°C con luz blanca continua. Después de cuatro días, cuando se desarrolló el micelio, se tomó una porción de aproximadamente 5 mm de micelio y se colocó en un tubo Eppendorf de 200 μL conteniendo 30 μL de la solución de lisis,

OQS (Campbell and Madden, 1990).

Pathogen Isolation. Pathogens associated with pepper wilt were isolated from plants after four months, from the plots included in the study hereby, with symptoms of leaf area decay and rot root. The diseased tissues were washed with tap water, cut in small sections of 0.3 cm^2 by the limit of healthy and necrotic areas; they were washed off afterwards with sterile distilled water and desinfested with 1% commercial chlorine (sodium hypochlorite) solution for 30 s. and rinsed again with sterile distilled water. The tissue sections were dried off with sterile paper and placed in Petri plates containing PVPP selective media (Papavizas *et al.*, 1981). Subsequently, they were aseptically transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) and V8 vegetable juice (V-8) media. An isolate from each field was randomly selected.

Pathogenicity tests. The *Fusarium* sp. and *Phytophthora* sp. isolates obtained were inoculated on host plants using two methods. They were confronted to jalapeño pepper plants var. Mitla of 20-days old, that were kept in plastic bags, of 5 Kg capacity. Mycelium from each isolate onto Petri plates, was used to cut 5 discs with a diameter of 1 cm with a punch and placed in the substrate 0.3 cm apart from the root and at a depth 1 cm, in five plants. A *Fusarium* conidial suspension was also prepared to inoculate five plants at the same distance and depth as previously described. The soil was irrigated at field capacity. Additionally pathogenicity of *Phytophthora* was tested by inoculating 28-days old plants of the susceptible cultivar Sonora with a zoospore suspension of 10,000 zoosporas mL^{-1} according to the protocol described by Fernández-Pavía *et al.*, (2004).

Genomic DNA extraction. The *Phytophthora* sp. isolate was cultivated in PDA and V-8 solid media, the Petri plates were placed at a temperature ranging from 20 to 25°C, with continuous white light. After four days, once the mycelium had developed, a mycelium portion of approximately 5 mm was taken and placed in a 200 μL Eppendorf tube containing 30 μL of lyses solution, Lyse N Go (Pierce, USA). Afterwards, the tubes were exposed at 95°C for 5 min; subsequently and they were centrifuged for 10 min at 5,000 $\times g$. After that, 5 μL of the supernatant was taken out for the amplification of the ribosomal genes through PCR.

Ribosomal DNA amplification by PCR. To amplify the ITS region the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) which amplify a fragment of 580 base pairs (bp) were utilized. Another pair of primers used were ITS5 and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), to amplify a 1,100 bp fragment that included the ITS region and ~600 bp of the 28S rDNA gen. The reaction mixture for the PCR was prepared in a final volume of 25 μL containing 1 \times *Taq* DNA enzyme buffer polymerase, 0.8 mM deoxynucleoside triphosphate (0.2 mM each), 100 ng DNA, 20 pmol from each initiator and 2 U *GoTaq* Flexi DNA (Promega, USA) units. The amplifications were performed with an initial denaturation cycle at 95°C for 2 min; 35 denaturation cycles at 95°C for 1 min, the annealing at 55°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 2 min; finally, an

Lyse N Go (Pierce, USA). Posteriormente, se colocaron los tubos a 95°C durante 5 min, después se centrifugaron por 10 min a 5,000 xg. Posteriormente se tomó 5 µL del sobrenadante para las amplificaciones de los genes ribosomales mediante la PCR.

Amplificación por PCR del DNA ribosomal. Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC) (White *et al.*, 1990), que amplifica un fragmento de 580 pares de bases aproximadamente (bp). Otro par de iniciadores utilizados fueron ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), para amplificar un fragmento de 1,100 bp, que incluyó la región del ITS y ~600 bp del gen 28S rRNA. La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo la enzima 1 x *Taq* DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, el alineamiento a 57°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 2 min; finalmente un ciclo de amplificación a 72°C por 10 min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con 1x TAE búfer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 87 V cm⁻³ durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹), y las bandas se visualizaron en un transiluminador Gel Doc 2000 UV (BIORAD, USA). Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de DNA de Applied Biosystems modelo 3730XL (Applied BioSystems, USA); para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas.

Análisis filogenético de la región del ITS y de nLSU rDNA. Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Para el análisis filogenético, la secuencia consenso se compiló en un archivo fasta y se alineó con el profile mode del Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) y analizada con el método de Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1), con Initial tree por adición al azar (10 reps), y los gap/missing se consideraron como completas deleciones.

Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, un análisis de bootstrap se estimó con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Secuencias de *Phytophthora tropicalis*, la especie filogenética más cercana y otras especies de *Phytophthora*

amplification cycle was performed at 72°C for 10 min. All of the PCR reactions were performed in a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México); the amplifications were verified by electrophoresis in an agarose gel at 1.2% prepared with 1x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) and run at 87 V cm⁻³ for 1 h. The gel was stained with ethidium bromide (3mg L⁻¹), and the bands were visualized through a transilluminator Gel Doc 2000 UV (BIORAD, USA). The amplified products were cleaned with the QIAquick PCR (Qiagen, USA) purification kit, following the instructions provided by the manufacturer. They were sequenced in both directions with an Applied Biosystems model 3730XL (Applied BioSystems, USA) automated DNA sequencing system to make sure that there will not be any incorrect nucleotide readings.

Phylogenetic analysis of the ITS region and nLSU rDNA. The sequences of both regions were assembled and edited using BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), which created a consensus sequence. This sequence was compared with the sequences deposited in GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), by means of the BLASTN 2.2.19 option (Zhang *et al.*, 2000). The consensus sequence was compiled in a FASTA file for the phylogenetic analysis and aligned with the Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994) profile mode included in the Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) software, and analyzed with the Maximum Parsimony method using the option of Close Neighbor Interchange (CNI) search (level=1), with an Initial tree per addition at random (10 reps), considering the gaps/missing as complete deletions.

A bootstrap analysis was estimated with 1000 repetitions (Felsenstein, 1985) in order to determine the groupings confidence values within the resultant tree. Sequences of *Phytophthora tropicalis*, the closest phylogenetic species and some other *Phytophthora* species were obtained from the GenBank (NCBI) and they were included as reference species in the study hereby. A *Pythium aphanidermatum* accession number EF211227 was assigned as out group for the construction of the phylogenetic tree (Fig. 3).

Compatibility type and mefenoxam sensitivity. The compatibility type for each isolate was determined by performing crosses with *P. capsici* strains with known mating types (A1 and A2). A mycelium disc of the known compatibility type was placed in a V-8 clarified media (CV-8) plate and approximately 2 cm apart one of the unknown type. The cultures were incubated in the dark at 25±1 C for 15-21 days; afterwards, oospore formation was observed under an optical microscope placing the lower part of the Petri plate upwards. The isolate was designated as A1 if it formed oospores in crosses with A2, and A2 if they were produced with A1. To determine fungicide sensitivity, mefenoxam was selected because is the active ingredient more frequently recommended in this Region to control *Phytophthora* sp. For this analysis the protocol described by Fernández-Pavía *et al.* (2004) was followed with modifications. Corn meal agar (CMA) media amended with 0, and 100 µg mL⁻¹ of mefenoxam (Ridomil Gold- 4E, 46.2 a. i.) was prepared adding the fungicide after sterilization. From 5 to 7 days old

se obtuvieron del GenBank (NCBI), y se incluyeron como especies de referencia en el presente estudio. *Pythium aphanidermatum* número de acceso EF211227 se asignó como fuera de grupo para la construcción del árbol filogenético (Fig. 3).

Tipo de compatibilidad y sensibilidad a mefenoxam. El tipo de compatibilidad de cada aislamiento se determinó realizando cruces con cepas de *P. capsici* de tipos de apareamiento (A1 y A2) conocidos. Se colocaron en medio V-8 clarificado (CV-8) un disco de micelio del tipo de compatibilidad conocido y aproximadamente 2 cm aparte uno del tipo desconocido. Los cultivos se incubaron en oscuridad a $25^{\circ}\pm 1$ C durante 15- 21 días, posteriormente se observó la formación de oosporas bajo el microscopio óptico colocando la parte inferior de la caja de Petri hacia arriba. El aislamiento se designó como A1 si éste formó oosporas cuando se cruzó con el tipo A2, y A2 si las produjo con el A1. Para determinar la sensibilidad a fungicidas se eligió mefenoxam por ser el ingrediente activo más recomendado en la región para el control de *Phytophthora* spp. Para este análisis se siguió el protocolo descrito por Fernández-Pavía *et al.* (2004) con modificaciones. Se utilizó medio de agar harina de maíz (CMA) adicionado con 0 y 100 g mL⁻¹ de mefenoxam (Ridomil Gold- 4E, 46.2 i. a.), el cual se agregó al medio después de esterilizado. A partir de aislamientos de 5-7 días, crecidos en CMA se transfirió un disco con micelio de 3 mm de diámetro en el medio con fungicida. Se incubaron a $25^{\circ}\pm 1$ en oscuridad y después de 5 días se midió el crecimiento radial en dos direcciones perpendiculares las cuales se promediaron y compararon con el testigo. El experimento se realizó dos veces con tres repeticiones por tratamiento. Los aislamientos se consideraron como sensitivos (S) si el crecimiento a 100 g mL⁻¹ fue < 40%, como medianamente sensitivo (IS) si fue entre 40-60%, (I) y no sensitivo si fue >60%. Se utilizó un diseño completamente al azar.

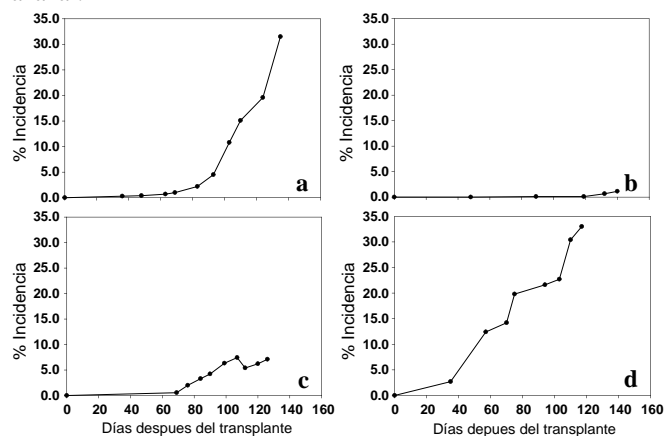


Fig. 1 Incidencia de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici* en cuatro localidades de Delicias y Camargo, Chih. 2002 y 2003. a) Camargo, b) Cuatro vientos, c) El Rosal y d) Camargo-Conchos.

Fig 1. Pepper (*Capsicum annuum*) wilt incidence caused by *Phytophthora capsici* in four fields from Delicias and Camargo, Chihuahua, Mexico, 2002 and 2003. a) Camargo, b) Cuatro Vientos, c) El Rosal and d) Camargo-Conchos.

cultures, grown in CMA a disc with mycelium of 3 mm of diameter was transferred to media with fungicide. They were incubated at $25^{\circ}\pm 1$ and after several days the radial growth was measured in two perpendicular directions that were averaged and compared with the control. The experiment was repeated twice with three replicates per treatment. The isolates were considered as sensitive (S) if growth at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was < 40%; as moderately sensitive (IS) if it was between 40 to 60% (I); not sensitive at >60%. A completely randomized design was utilized.

RESULTS

Temporal study. The disease incidence in the block conformed by 625 plants in the Camargo field increased from 0.33% in May to 31% in August; from 2.73% in May to 33% in July in the Camargo-Conchos field; the highest final incidence of epidemics was reached in these two fields. A relatively low final incidence (Table 1) was observed in the other two fields. The disease temporal progress showed an irregular behavior developing with a higher intensity by the end of the growing cycle (Fig. 1), which agree with the rainfall season and the waterlogged period in certain spots within the field. These results are consistent with results of Bernhardt and Grogan, (1982) and Erwin and Ribeiro, (1996), who mentioned that in free water sporangia release motile zoospores, being each one of them capable to cause infection. The area under the disease progress curve (AUDPC), from

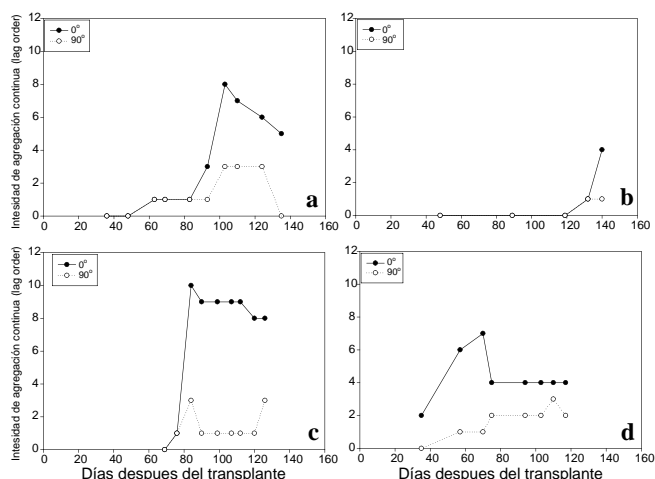


Fig. 2. Autocorrelación espacial continua en dos direcciones (0° dentro del surco y 90° -perpendicular al surco) de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici* en cuatro localidades de Delicias y Camargo, Chih. 2002 y 2003. a) Camargo, b) Cuatro vientos, c) El Rosal, d) Camargo-Conchos.

Fig. 2. Continuous Spatial autocorrelation in two directions (0° within the row and 90° - across the row) of pepper (*Capsicum annuum*) wilt caused by *Phytophthora capsici* in four fields from Delicias and Camargo, Chihuahua, Mexico, 2002 and 2003. a) Camargo, b) Cuatro Vientos, c) El Rosal, d) Camargo-Conchos.

RESULTADOS

Estudio temporal. La incidencia de la enfermedad en el bloque de 625 plantas en la parcela de Camargo incrementó de 0.33% en mayo a 31% en agosto, de 2.73% en mayo a 33% en julio en la parcela Camargo-Conchos, las epidemias en estas dos parcelas fueron las que alcanzaron mayor incidencia final. Las otras dos parcelas tuvieron relativamente baja incidencia final (Fig. 1). El progreso temporal de la enfermedad tuvo un comportamiento irregular, se desarrolló con mayor intensidad al final del ciclo del cultivo (Fig. 1) coincidiendo con la época de lluvias y el periodo de encharcamiento en ciertos puntos de la parcela, estos resultados concuerdan con lo descrito por Bernhardt y Grogan, (1982) y Erwin y Ribeiro, (1996) quienes mencionan que en el agua libre los esporangios liberan zoosporas móviles, cada una capaz de causar infección.

El Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), integrada en dos tiempos (mayo-agosto) fue mayor para la parcela Camargo-Conchos (1471), seguido por la parcela de Camargo (769) y las parcelas del rancho El Rosal y rancho Cuatro Vientos en este estudio presentaron menor área bajo la curva, menor incidencia final y las tasas de infección aparente más bajas (Cuadro 2). Se observó claramente que conforme se incrementa la incidencia en cada parcela, el área bajo la curva de progreso de la enfermedad se incrementó, al igual que las tasas de progreso de la enfermedad (r), el tiempo de inicio de la epidemia (X_0) se acortó, la cantidad inicial de enfermedad (Y_0) fue mayor, la cantidad máxima (Y_{max}) y la cantidad final de enfermedad se incrementaron (Y_f) (Cuadro 2).

La mayor incidencia final produjo una mayor acumulación de ABCPE de mayo a agosto en las cuatro parcelas. En el rancho El Rosal se observó que la epidemia aparentemente se redujo, esto fue debido a que no se pudieron contabilizar las plantas muertas a partir de la séptima evaluación.

Dado que el progreso temporal de la incidencia de la epidemia varió en cuanto a su forma, más de un modelo ajustó la curva de progreso de la enfermedad en tres parcelas. En la parcela de Cuatro Vientos ninguno de los cuatro modelos ajustaron la curva de progreso de la enfermedad posiblemente dado a la forma bi-modal de la curva y a los valores bajos de incidencia (Fig. 1). En las parcelas de Camargo, El Rosal y Camargo-Conchos los cuatro modelos ajustaron a las curvas de progreso de la enfermedad. Sin embargo, para la parcela Camargo el modelo con más fortaleza estadística fue el Gompertz debido al valor del coeficiente de determinación ($R^2=95$), significancia estadística ($P<0.0001$) y que no hubo violación de la normalidad de los residuales Shapiro-Wilk $P=0.71$ (Cuadro 1). Para la parcela Camargo-Conchos el modelo Monomolecular fue el que ajustó los datos, dado a los valores de los parámetros estadísticos ($R^2=93.7$, $P<0.0001$, $CME=0.001$ y Shapiro-Wilk $P=0.4325$), seguido de modelo Gompertz ($R^2=92.2$, $P=0.0001$, $CME=0.0124$ y Shapiro-Wilk $P=0.7394$). En la epidemia de la parcela de El Rosal, el modelo que mejor se ajustó fue el Gompertz, ($R^2=75.4$, $P=0.0025$, $CME=0.0145$ y Shapiro-Wilk $P=0.5538$), seguido del Monomolecular ($R^2=73.7$, $P=0.0015$, $CME=0.0002$ y

May to August, was higher for the Camargo-Conchos field (1471), followed by the Camargo field (769). In this study, a lower AUDPC, a lower final incidence and apparently the lowest infection rates were detected in the fields located at El Rosal and the Cuatro Vientos field. It was clearly observed, that as disease incidence increased, the AUDPC, disease progress rate (r), the maximum amount of the disease (Y_{max}) and the final amount of the disease increased (Y_f), and the initial time of epidemics (X_0) was shortened, however, the amount of initial disease (Y_0) did not have a clear trend with respect to incidence (Table 2).

The higher final disease incidence produced a higher accumulation of AUDPC from May to August in all four fields. An apparent epidemic reduction at the El Rosal was observed, due to the fact that a improper count of the dead plants, beginning from the seventh evaluation, could not be performed.

Since the temporal progress of incidence differed with regards to its shape, more than one model adjusted to the disease progress curve in three fields. None of the four models adjusted to the disease progress curve in the field from the Cuatro Vientos due to the bi-modal shape of the curve and the low incidence values (Fig. 1). The four models adjusted to the disease progress curves in the fields located in Camargo field, Camargo-Conchos road and El Rosal. Nevertheless, Gompertz was the model with the highest statistical strength for the Camargo field because of its coefficient of determination value ($R^2=95$), statistical significance ($P<0.0001$) plus the fact that there was no violation of normality of the residuals based on Shapiro-Wilk $P=0.87$ test (Table 1). The Monomolecular model for the, Camargo-Conchos field was the one that best adjusted to the data because of the values of the statistical parameters ($R^2=93.7$, $P<0.0001$, $MSE=0.0001$ and Shapiro-Wilk $P=0.4325$), followed by the Gompertz model ($R^2=92.2$, $P=0.0001$, $MSE=0.0124$ and Shapiro-Wilk $P=0.7394$). Gompertz was the model that best adjusted in El Rosal ranch ($R^2=75.4$, $P=0.0025$, $MSE=0.0145$ and Shapiro-Wilk $P=0.5538$), followed by the Monomolecular model ($R^2=73.7$, $P=0.0009$, $MSE=0.0001$ and Shapiro-Wilk $P=0.0886$), in both models there was no violation of the residuals normality. The Gompertz model was in general, the one that better adjusted to the disease progress curves which is consistent with the polycyclic behavior of disease.

The average of apparent infection rates were from 0.008 to 0.016 gompitz day⁻¹ ($R^2 = 0.75$ to 0.95), which increased as incidence increased as well (Table 2).

It has been reported that pepper wilt is a disease of rapid dispersion (Gevens *et al.*, 2007), being consistent with the apparent infection rates observed of 0.016 and 0.012 gompitz day⁻¹ in the Camargo and Camargo-Conchos fields respectively, and the rapid increase in the disease from May (0.33%) to August (31%) in the Camargo field. The progress of the disease in this field had an exponential behavior at the beginning, apparently a Monomolecular form afterwards, and exponential behavior at the end (Fig. 1).

Spatio-temporal study. The optimum quadrat size (OQS) of 16 (4x4) of wilted plants was consistent in the fields located in

Shapiro-Wilk $P=0.899$), en ambos modelos no existió violación de la normalidad de los residuales. En general, el modelo Gompertz ajustó mejor las curvas de progreso de la enfermedad, el cual coincide con el comportamiento policíclico de la enfermedad.

Las tasas promedio de infección aparente fueron de 0.008 a 0.016 gompitz día⁻¹ las cuales se incrementaron conforme incrementó la incidencia (Cuadro 2).

Se ha reportado que la marchitez del chile es una enfermedad de rápida dispersión (Gevens *et al.*, 2007), esto coincide con las tasas de infección aparente observadas de 0.016 y 0.012 gompitz día⁻¹ en las parcelas de Camargo y Camargo-Conchos respectivamente, y el incremento rápido en la incidencia de mayo (0.33%) a agosto (31%) en la parcela de Camargo. En esta parcela el progreso de la enfermedad tuvo un comportamiento exponencial al inicio, después aparentemente una forma monomolecular para terminar al final de manera exponencial (Fig. 1).

Estudio espacio-temporal. El tamaño óptimo de cuadrante (TOC) de 16 (4 x 4) plantas marchitas fue consistente en las parcelas de Camargo y El Rosal en todo el ciclo del cultivo; el TOC de 32 plantas enfermas fue consistente en la parcela Camargo-Conchos en las ocho evaluaciones y el TOC fue

both Camargo and El Rosal during the full growing season; the OQS of 32 diseased plants was consistent in the Camargo-Conchos field in the eight evaluations and the OQS was in general variable for the four fields during the different evaluation dates. The spatial pattern type determined by the Poisson distribution coincided with the spatial pattern determined by the spatial autocorrelation analysis in a sense that the epidemics revealed a random pattern at the beginning of the epidemics and later the epidemics appeared in aggregates (Table 3). A continuous spatial lag autocorrelation was observed in the four fields, meaning that a single diseased plant was actually able to spread the disease over to the next neighbor plant within the row (0°) (Fig. 2) and across the row as well (90°); nevertheless, disease spread within the row was larger ranging from 2 to 8 continuous lag plants than to the dissemination across rows ranging from 1-3 quadrants (Fig. 2).

It was observed at the beginning of the epidemic in Camargo that the first outbreak appeared in the lowest part of the field in accordance to the slope in direction of the furrow irrigation. Furthermore, at the last date of evaluation (August) the highest wilting intensity was observed over the area with the biggest depression; this part of the field corresponded to the flooded area.

This may be related to the furrow irrigation type applied to the crop, which disseminates the pathogen towards the irrigation direction (slope). As the disease incidence increased, the aggregation increased as well, indicating the formation of secondary outbreaks to a certain point in time; however, increase in disease incidence is not always related to a particular type of spatial pattern such as aggregation, due to an specific incidence value or a certain number of diseased plants can concentrate in a specific area of the field (aggregates) or the same number of diseased plants can be distributed all over the field (uniform), this may lead that continuous spatial lag order may reach an stabilization or even a reduced aggregation intensity, as was observed in the four fields within and across the rows; this may indicate that from an aggregated spatial pattern type may turn into a uniform spatial pattern type.

Pathogen isolation and pathogenicity tests. Species of the genus *Phytophthora* spp. and *Fusarium* spp. were isolated from diseased pepper root samples. Wilting symptoms were observed two weeks after inoculation with mycelium of the *Phytophthora* isolate and 7 days after the inoculation with zoospores. The plants inoculated with *Fusarium* spp. did not show symptoms, therefore only *Phytophthora* sp. was considered for the genetic-molecular identification and characterization.

Identification of the wilting causal agent. The strains revealed stellate colonies in V-8, in which papillate zoosporangia of variable shape were formed (round, ellipsoid, ovoid and occasionally bipapillated) deciduous. with long pedicel and heterothallic. These characteristics are consistent with Erwin and Ribeiro description (1996) for *P. capsici*.

Amplifications performed with the set of primers ITS5/ITS4 amplified the 580 bp expected fragment. Likewise, a 1,100 bp fragment was obtained with the primers ITS5/NL4. However, for the construction of the phylogenetic tree, the sequences were cut at a length of 796 bp, due to the different size of the sequences deposited at GenBank.

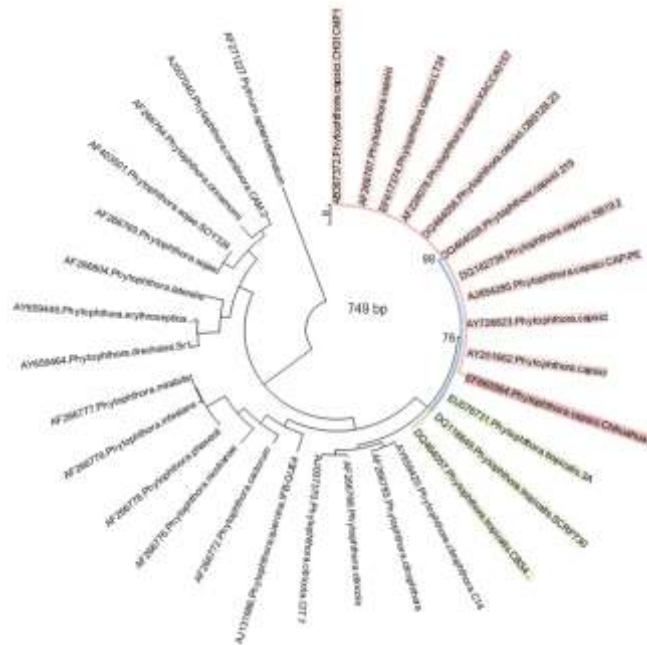


Fig. 3. Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes al Espacio Transcrito Interno del rDNA ribosomal de *Phytophthora capsici* y otras *Phytophthora* spp. usando el método de Máxima Parsimonia. *P. capsici* Chihuahua fue aislada de plantas de chile (*C. annuum*) con síntomas de marchitez en El Rosal en Camargo y en Cuatro vientos en Delicias en el ciclo agrícola 2002.

Fig. 3. Phylogenetic tree built with sequences corresponding to rDNA, to the Internal Transcribed spacers of *Phytophthora capsici* and other *Phytophthora* spp. using the Maximum Parsimony Method. Chihuahua *P. capsici* was isolated from pepper (*C. annuum*) plants with wilting symptoms from El Rosal in Camargo and Cuatro Vientos in Delicias, Chihuahua in the 2002 agricultural cycle.

Cuadro 1. Resumen de los parámetros estadísticos de cuatro modelos de crecimiento poblacional linealizados para describir el progreso temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici* en cuatro parcelas de Chihuahua, México. 2002 y 2003.

Table 1. Summary of the statistical parameters of four population growth linearized models to describe the temporal progress of pepper (*Capsicum annuum*) wilt caused by *Phytophthora capsici* on four fields from Chihuahua, Mexico. 2002 and 2003.

Parcela	Modelo	^a a_0	^b b_1	R^2	$Pr>F$	CME	^c Residuales
Camargo	Exponencial	-7.956	0.0519	97.8	<0.0001	0.071	0.0917
	Gompertz	-2.580	0.0169	95.0	<0.0001	0.017	0.7154
	Logístico	-8.149	0.0550	98.0	<0.0001	0.073	0.0427
	Monomolecular	-0.1024	0.0024	64.5	0.0029	0.005	0.1375
Cuatro vientos	Exponencial	-11.21	0.045	70.1	0.1627	0.6595	0.0227
	Gompertz	-2.699	0.0082	69.9	0.1635	0.0207	0.0690
	Logístico	-11.23	0.045	70.1	0.1627	0.6649	0.0235
	Monomolecular	-0.002	0.00001	52.2	0.1048	0.00001	0.992
El Rosal	Exponencial	-6.749	0.0355	69.0	0.005	0.2430	0.2045
	Gompertz	-2.132	0.0099	75.4	0.0025	0.0145	0.5538
	Logístico	-6.811	0.0366	70.4	0.0047	0.2552	0.2199
	Monomolecular	-0.014	0.0006	73.7	0.0015	0.0002	0.8996
Camargo-Conchos	Exponencial	-3.943	0.025	83.3	0.0015	0.1232	0.6155
	Gompertz	-1.157	0.0126	92.2	0.0001	0.0124	0.7394
	Logístico	-4.062	0.0298	86.5	0.0008	0.1293	0.7264
	Monomolecular	-0.119	0.0041	93.7	<0.0001	0.0010	0.4325

^a Intercepto de los modelos

^b Pendientes de los modelos

^c Significancia estadística del análisis de los residuales basado en el análisis de Shapiro-Wilk.

variable en la cuarta parcela en las diferentes fechas de evaluación. El tipo de patrón espacial determinado con la distribución Poisson coincidió con el tipo de patrón espacial determinado con el análisis de autocorrelación espacial en el sentido de que las epidemias tuvieron un patrón al azar al inicio de las epidemias y conforme pasó el tiempo las epidemias se presentaron en agregados (Cuadro 3). Se presentó autocorrelación espacial de plantas continuas, en las cuatro parcelas, es decir una planta enferma logró enfermar a la planta vecina dentro del surco (0°) (Fig. 2) y a través del surco (90°), sin embargo, la diseminación dentro de los surcos fue mayor con rangos de 2 hasta 8 cuadrantes continuos comparado a la diseminación a través de los surcos con rangos de 1-3 cuadrantes (Fig. 2).

Al inicio de la epidemia en Camargo se observó que el primer brote apareció en la parte más baja de la parcela de acuerdo a la pendiente en dirección del riego. Asimismo en la última fecha de evaluación (agosto) la mayor intensidad de la marchitez se presentó en la parte con mayor depresión, esta parte de la parcela correspondió al área con inundación. Esto puede estar relacionado al tipo de riego rodado aplicado

The result of BLASTN, as well as the phylogenetic tree constructed with the Maximum Parsimony method, confirmed that the isolated strains from El Rosal and Cuatro Vientos corresponded to *P. capsici* with a 98% identity with regards to the isolations from diverse hosts, being pepper among them. The sequence obtained in the study was deposited at the GenBank-NCBI under the accession number EF660564.

Compatibility type and fungicides sensitivity. The compatibility types A1 and A2 were detected. The oospores were plerotic and anphgynous antheridia were observed. Moreover, the isolates were sensitive to mfenoxam (< 40% growth), because the isolates growth range in 100 µg mL⁻¹ with regards to the control were from 6.7% to 14%.

DISCUSSION

The pathogen causing pepper wilt in the South Central area of Chihuahua was identified by morphological and molecular techniques as *P. capsici*. The epidemics caused by *P. capsici* from Camargo and Camargo-Conchos showed the highest rates concerning disease progress based on the Gompertz model, possibly due to the influence of the irregular surface on which it

Cuadro 2. Resumen de los parámetros estadísticos del modelo de crecimiento poblacional linealizado Gompertz para describir el progreso temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici* y otros parámetros de la enfermedad en cuatro parcelas de Chihuahua, México. 2002 y 2003.

Table 2. Statistical Parameters of four linearized population growth models to describe pepper (*Capsicum annuum*) wilt temporal progress caused by *Phytophthora capsici* in four jalapeno pepper fields in Delicias and Camargo, Chihuahua, Mexico. 2002 and 2003.

Parcela	Modelo/(r) ^a	ABCPE	χ_0^b	Y_0/Y_0^c	Y_{max}/max^d	Y_f/Y_f^e
Camargo	Gompertz 0.0169	769.9	36	0.30/2.58	31.5/0.28	31.5/0.28
Cuatro vientos	Gompertz 0.0082	17.70	89	0.11/2.69	1.14/1.57	1.14/1.57
El Rosal	Gompertz / 0.0099	292.7	69	0.55/2.13	7.44/1.07	7.1/1-0.88
CamargoConchos	Gompertz 0.0126	1471.6	35	2.70/1.15	33.0/0.09	33.0/0.09

^aTasa de progreso de la epidemia con base en el modelo Gompertz.

^bTiempo en que se observan los síntomas por primera vez (días).

^cCantidad inicial de la enfermedad real (Y_0) y estimada con base en el modelo Gompertz (χ_0).

^dCantidad máxima de enfermedad real (Y_{max}) y estimada con base en el modelo Gompertz.

^eCantidad final de enfermedad real (Y_f) y estimada con base en el modelo Gompertz.

al cultivo que disemina al patógeno en dirección al riego (pendiente). Conforme la incidencia de la enfermedad incrementó, la agregación incrementó del mismo modo, esto puede indicar la formación de focos secundarios hasta cierto punto en el tiempo; ya que un incremento en la incidencia no siempre está relacionado a un tipo de patrón espacial en agregados, porque un valor específico de incidencia o cierto número de plantas enfermas pueden concentrarse en un área específica en el terreno (agregados) o ese mismo número de plantas en todo el terreno (uniforme). En las cuatro localidades se ve una estabilización o incluso una reducción de la intensidad de agregación o número de cuadrantes contiguos, lo que indicó que el tipo de patrón en agregados puede convertirse en un tipo de patrón uniforme.

Aislamiento del patógeno y pruebas de patogenicidad.

Especies de los géneros *Phytophthora* spp. y *Fusarium* spp., se aislaron de raíces enfermas de chile. Los síntomas de marchitez se observaron dos semanas después de la inoculación con micelio del aislamiento de *Phytophthora* sp., y 7 días después en las inoculadas con zoosporas. No se observaron síntomas en las plantas inoculadas con *Fusarium*, por esta razón se consideró solo a *Phytophthora* sp. para la identificación genético-molecular y caracterización de la especie.

Identificación del agente causal de la marchitez. Las cepas presentaron colonias estrelladas en V-8, en las que se desarrollaron zoosporangios papilados de forma variable (redondos, elipsoides, ovoides, ocasionalmente bipapilados), caducos y con pedicelo largo y heterotálicos. Las características mencionadas concuerdan con la descripción de Erwin y Ribeiro (1996) para *P. capsici*.

the crop was sown, and by the consequent flood that facilitated a rapid mobility of the zoospores and increased the speed of the infection process (Erwin and Ribeiro, 1996). Sigmoid curves were described by the Gompertz model; however, the graphic examination revealed that the last phase of the epidemic in Camargo was exponential (from July 15 to August 9), showing that the epidemic revealed a progress with a higher intensity at the end, similar to the beginning, probably due to the fact that the disease is polycyclic and the zoospores found a favorable environment to produce secondary inoculum and disperse when the water was stagnated in some field depressions.

The apparent infection rates from the Camargo and Camargo-Conchos fields characterized explosive epidemics prompted by factors such as the susceptible host (var. Miltla), enhanced inoculum dispersion and its high level of infection efficiency, sufficient humidity by rainfall and optimal temperature. In addition, the frequency and irrigation intensity are among the factors that depend on the producer. Water (either irrigation or rain) was identified as an important potential source for *P. capsici* dispersion, being consistent with previous reports (Avila-Quezada *et al.*, 2005; Bernhardt and Grogan, 1982; Erwin and Ribeiro, 1996). Due to the lack of land leveling the water accumulated in the fields. A few questions arise, such as: if the inoculum is present in the water from the irrigation channel, can it get into the pepper field and infect the plants, even when no pepper crop have been sown previously for years? It is likely that in the past the inoculum could have been washed by the water and remained dormant in the ground until the pepper crop was sown in the farm.

The rain or furrow irrigation led to flooding in the Camargo field, associated to a higher focus of infection detected by spatial autocorrelation and graphic examination. The contaminated water may lead the pathogen to the lower slope (Jung and Blaschke, 2004), which is consistent with the results obtained in this study. A random distribution was revealed in the beginning of the epidemic in this study, probably because of the initial amount of inoculum was low in the soil or in the water, insufficient to cause a high incidence; nevertheless, the disease dispersed as aggregates over the farm due to the dissemination derived from rainfall and irrigation water and the production of secondary inoculum. It is proved by the results of the study hereby that the disease initiates at random, and thus the producer may assume that the inoculum is present in the soil or in the water and he may need to carry on the necessary measures before establishing the crop like leveling the ground.

A solution within the management program of this disease could be the implementation of drainage to remove water excess and prevent flooding in the field. Preventing floods is a priority due to the motility of the pathogen through zoospores (Bernhardt and Grogan, 1982).

Previous studies have showed that *P. capsici* oospores can survive in the soil for three years (Lamour and Hausbeck, 2003) and can persist regardless the lack of host tissue (French-Monar *et al.*, 2006; Lamour and Hausbeck, 2003). Results obtained in this study suggest that sexual reproduction is occurring in the analyzed fields, contributing to the yearly presence of the pathogen due to oospore formation as primary inoculum. The presence of these mating types has been reported in some other

Cuadro 3. Patrón espacio-temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici* mediante la distribución Poisson y Autocorrelación espacial en cuatro parcelas de chile jalapeño en Delicias y Camargo, Chihuahua, México. 2002 y 2003.

Table 3. Spatio-temporal pattern of pepper (*Capsicum annuum*) wilt caused by *Phytophthora capsici* throughout the Poisson distribution and spatial autocorrelation in four jalapeno pepper fields in Delicias and Camargo, Chihuahua, Mexico. 2002 and 2003.

Lugar	¹ DDAS	² TOC	Poisson		Autocorr. espacial	
			²	³ SP		
Camargo	36	16	0.061	10.9	Al azar	NAg ⁴
	48	16	0.08	5.6	Al azar	NAg
	63	16	0.14	7.3	No Azar	Ag ⁵
	69	16	0.18	10.6	No Azar	Ag
	83	32	0.089	40.18	No Azar	Ag
	93	16	0.836	103.92	No Azar	Ag
	103	16	1.95	925.13	No Azar	Ag
	110	16	2.735	277.24	No Azar	Ag
	124	16	3.571	84.26	No Azar	Ag
	135	16	5.30	47.15	No Azar	Ag
Cuatro Vientos	48	0	-	-	-	-
	89	8	0.0009	0.005	Al azar	NAg
	119	8	0.0009	0.005	Al azar	NAg
	132	32	0.057	23.27	Al azar	Ag
	140	16	0.245	189.66	Al azar	Ag
El Rosal	48	16	0.102	127	Al azar	NAg
	76	16	0.367	44.2	No Azar	Ag
	84	16	0.612	540.3	No Azar	Ag
	90	16	0.776	1335.29	No Azar	Ag
	99	16	1.163	133.69	No Azar	Ag
	107	16	1.367	226.29	No Azar	Ag
	112	16	1.081	116.73	No Azar	Ag
	120	16	1.142	154.15	No Azar	Ag
Camargo-Conchos	35	32	1.14	3.40	Al azar	Nag
	57	32	4.5	35.70	No Azar	Ag
	70	32	5.0	23.93	No Azar	Ag
	75	32	6.9	19.01	No Azar	Ag
	94	32	7.5	27.19	No Azar	Ag
	103	32	7.9	34.94	No Azar	Ag
	110	32	10.57	44.30	No Azar	Ag
	117	32	11.62	27.01	No Azar	Ag

¹DDAS= días después de la aparición de los síntomas.

²TOC = tamaño óptimo de cuadrante

³Ps= patrón espacial

⁴NAg=no agregado

⁵Ag= agregado

Las amplificaciones realizadas con los iniciadores ITS5/ITS4 amplificaron el fragmento esperado de 580 bp. Asimismo, se obtuvo un fragmento de 1,100 bp con los iniciadores ITS5/NL4. Sin embargo, para la construcción de árbol filogenético las secuencias se cortaron a una longitud de 796 bp, debido al diferente tamaño que tenía las secuencias depositadas en el GenBank.

El resultado de BLASTN, así como el árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia, confirmó que la cepa representativa, aislada de la parcela de Chile del Rancho El Rosal en Chihuahua correspondía a *P. capsici* con una identidad del 98% con respecto a los aislamientos de diversos hospedantes, Chile entre ellos. La secuencia obtenida en este estudio se depositó en el GenBank-NCBI bajo el número de acceso EF660564.

Tipo de compatibilidad y sensibilidad a fungicidas. Se detectaron los dos tipos de compatibilidad A1 y A2. Las oosporas fueron pleróticas y se observaron anteridios anfiginos. Asimismo los aislamientos fueron sensibles al mfenoxam (crecimiento < 40%), ya que el rango de crecimiento de los aislamientos en 100 g mL⁻¹ con respecto al testigo varió del 6.7% al 14%.

DISCUSIÓN

El patógeno causante de la marchitez del Chile en la zona centro-sur de Chihuahua se identificó por análisis morfológico y molecular como *P. capsici*. Las epidemias causadas por *P. capsici* en Camargo y Camargo-Conchos presentaron las tasas más altas de progreso de la enfermedad con base al modelo Gompertz, esto posiblemente influenciado por la superficie irregular en la que estaba sembrado el cultivo y por los consecuentes encharcamientos que facilitaron la rapidez de la movilidad de las zoosporas y acelerar las infecciones (Erwin y Ribeiro, 1996). El modelo de Gompertz describió curvas sigmoidales, sin embargo, la exploración gráfica mostró que la última fase de la epidemia en Camargo fue exponencial (del 15 de julio al 9 de agosto) esto demuestra que la epidemia progresó con mayor intensidad al final del ciclo de cultivo, similar al inicio, probablemente porque la enfermedad es policíclica y las zoosporas encontraron un ambiente favorable para dispersarse cuando el agua se estancó en algunas depresiones dentro de la parcela.

Las tasas de infección aparente de las parcelas de Camargo y Camargo-Conchos caracterizaron epidemias explosivas propiciadas por factores como el hospedante susceptible, la facilidad de dispersión del inóculo y su alta eficiencia, suficiente humedad por precipitación pluvial y temperatura óptima. Además entre los factores que dependen del productor se encuentran la frecuencia e intensidad del riego. El agua (de riego o lluvia) se identificó como una importante fuente potencial para la diseminación de *P. capsici* coincidiendo este resultado con reportes previos (Ávila-Quezada *et al.*, 2005; Bernhardt y Grogan, 1982; Erwin y Ribeiro, 1996). Debido a la falta de nivelación del terreno se observaron encharcamientos dentro de la parcela. Sin embargo, surgen algunas interrogantes como; si el inóculo está presente en el agua del canal éste puede introducirse en la parcela de Chile e infectar las plantas, aún cuando en la parcela no se haya plantado Chile

states along the country where Chile pepper is cultivated, such as: Aguascalientes and Guanajuato (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2004), being this the first report for Chihuahua. As a consequence crop rotation could have its limitations, if jalapeño pepper is grown less than four years within the same field. The rotation may be an option if a none host crop for *P. capsici* is properly established for a period of at least five years.

There are no pepper varieties resistant to *P. capsici*, becoming essential to carry out an integrated disease management program to reduce losses derived by this pathogen, besides setting the pepper crops in well drained and leveled soil field. It is also recommendable to limit the irrigation near the harvest (Hausbeck and Lamour, 2004). The constant use of fungicides derives in resistance however, mfenoxam resistance has not been detected in the *P. capsici* isolates from the sampled fields, as it has been reported in other countries (Fernández-Pavía *et al.*, 2004; Parra and Ristaino, 2001), turning most likely suitable to be included in the control considering that their effectiveness in the field is low and therefore it is recommended that an integrated management system of the disease is implemented.

CONCLUSIONS

In the present study it was determined that *P. capsici* is the causal agent of pepper wilt in the Camargo and Delicias municipalities in the state of Chihuahua. The pathogen has two mating types A1 and A2 and it is sensible to mfenoxam. The spatial patterns of the disease revealed, on a general basis, an aggregation by the end of the crop cycle, may be because the dispersion of the pathogen was favored by rolling irrigation, therefore, growing pepper in leveled and well drained soils is recommended. The application of an integrated management program of the disease shall be the only form to achieve a reduction of losses caused by this pathology.

LITERATURA CITADA

- Ávila-Quezada, G.D., Téliz-Ortiz, D., González-Hernández, H., Vaquera-Huerta, H., Tijerina-Chávez, L., Johansen-Naime, R., y Mojica-Guzmán, A. 2002. Dinámica espacio-temporal de la roña (*Elsinoe perseae*), el daño asociado a trips y antracnosis (*Glomerella cingulata*) del aguacate en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:77-87.
- Ávila-Quezada, G.D., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, G., Vaquera-Huerta, H., y Tijerina-Chávez, L. 2003. Spatial and temporal dynamic of scab (*Sphaceloma perseae* Jenk.) on avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:152-160.
- Ávila-Quezada, G.D., Gardea, A., Pedroza-Sandoval, A., Silva-Rojas, H.V., and Fernández-Pavía, S. 2005. Spatial dynamic of pepper wilt. *Phytopathology* 95:149 (Abstract).
- Bernhardt, E.A., and Grogan, R.G. 1982. Effect of soil matric potential on the formation and indirect germination of sporangia of *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, and *Phytophthora capsici cryptogea* rots of tomatoes, *Lycopersicon esculentum*. *Phytopathology* 72:507-511.
- Bowers, H.H., Sonoda, R.M., and Mitchell, D.J. 1990. Path

en años anteriores. Es probable que en años anteriores el inóculo haya sido arrastrado por el agua y haya permanecido latente en el suelo hasta que el cultivo de chile fue establecido en el predio.

La lluvia o riego rodado produjo inundaciones en la parcela de Camargo, asociado al mayor foco de infección detectado por autocorrelación espacial y exploración gráfica. El agua contaminada acarrearía al patógeno hacia la pendiente más baja (Jung y Blaschke, 2004), concordando esto con los resultados obtenidos en este trabajo. En este estudio, se observó que al inicio de la epidemia se presentó una distribución al azar, posiblemente por la presencia del patógeno en el suelo o en el agua como inóculo inicial local con bajas densidades insuficientes para causar una alta incidencia, sin embargo, la enfermedad se dispersó en forma de agregados sobre el predio debido a la diseminación por el riego y la producción de inóculo secundario. Con los resultados de este trabajo se muestra que la enfermedad inicia al azar, y que el productor puede asumir que el inóculo está presente en el suelo o en el agua por lo que deberá tomar medidas antes de establecer el cultivo en lo que concierne a la nivelación del terreno.

Una solución dentro del programa de manejo de esta enfermedad podría ser la implementación de drenes para eliminar el exceso de agua y evitar inundaciones en la parcela. Evitar inundaciones es prioridad debido a la motilidad de este patógeno por medio de las zoosporas (Bernhardt y Grogan, 1982).

En estudios previos se ha encontrado que las oosporas de *P. capsici* pueden sobrevivir en el suelo durante tres años (Lamour y Hausbeck, 2003) y pueden persistir a pesar de no tener el tejido hospedante (French-Monar *et al.*, 2006; Lamour y Hausbeck, 2003). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la reproducción sexual se está presentando en los campos analizados la cual contribuye a que la enfermedad se presente año con año ya que se podrán formar oosporas que servirán como inóculo primario. La presencia de estos tipos de apareamiento se ha reportado en otros estados del país donde se cultiva chile como son: Aguascalientes y Guanajuato (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2004), siendo este el primer reporte para Chihuahua. Por lo que la rotación de cultivos podría tener sus limitantes, si se pretende sembrar nuevamente chile jalapeño en menos de cuatro años en la misma parcela. La rotación podría funcionar si después de detectarse *P. capsici* se establece algún cultivo no hospedante de este patógeno por un periodo de al menos cinco años.

No existen variedades de chile resistentes a *P. capsici* por lo que es indispensable que se lleve a cabo un manejo integrado de la enfermedad para reducir las pérdidas ocasionadas por este patógeno, además de establecer el cultivo del chile en suelos bien drenados y bien nivelados. Es recomendable limitar el riego cerca de la cosecha (Hausbeck y Lamour, 2004). El uso constante de fungicidas trae como consecuencia la resistencia a estos, sin embargo, aun no se detectó en los aislamientos de *P. capsici* de las localidades muestreadas resistencia a mefenoxam como se ha reportado en otros países (Fernández-Pavía *et al.*, 2004; Parra y

coefficient analysis of the effect of rainfall variables on the epidemiology of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 80:1439-1446.

Campbell, C.L., and Madden, L.V. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 532 p.

Erwin, D.C., and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Disease Worldwide*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., USA. 562 p.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fernández-Pavía, S.P., Biles, C.L., Waugh, M.E., Onsurez-Waugh, K., Rodríguez-Alvarado, G., and Liddell, C.M. 2004. Characterization of southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leon isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:82-89.

Fernández-Pavía, S.P., Rodríguez-Alvarado, G., and Sánchez-Yáñez, J.M. 2003. Buckeye rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* in Michoacán, México. *Plant Disease* 87:872 (Abstract).

French-Monar, R.D., Jones, J.B., and Roberts, P.D. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetables farms. *Plant Disease* 90:345-350.

Gevens, A.J., Donahoo, R.S., Lamour, K.H., and Hausbeck, M.K. 2007. Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. *Phytopathology* 97:421-428.

González, M., Rodríguez, R., Zavala, M.E., and Jacobo, J.L. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers *Phytopathology* 88:292-299.

Guigón-López, C., y González-González, P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.

Gottwald, T.R., Richie, S.M., and Campbell, C.L. 1992. LCOR2 Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Disease* 76:213-215.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Hausbeck, M.K., and Lamour, K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetables crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88:1292-1303.

Hwang, B.K., and Kim, C.H. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease* 79:221-227.

Jung, T., and Blaschke, M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53:197-208.

Lamour, K.H., and Hausbeck, M.K. 2001. Investigating the spatio temporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Phytopathology* 91:973-980.

Lamour, K.H., and Hausbeck, M.K. 2003. Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* in

Ristaino, 2001) por lo que podría incluirse en el control tomando en cuenta que su efectividad en campo es baja por lo que se recomienda implementar un sistema de manejo integrado de la enfermedad.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se determinó que *Phytophthora capsici* es el agente causal de la marchitez del chile en los municipios de Camargo y Delicias del estado de Chihuahua. Este oomiceto presenta los tipos de compatibilidad A1 y A2, además de mostrar sensibilidad a mefenoxam.

Los patrones de distribución espacial de la enfermedad revelaron de manera general una agregación al final del ciclo de cultivo debido que la diseminación del patógeno se vió favorecida por el riego rodado, por lo que con estos resultados se recomendaría establecer el cultivo de chile en suelos bien drenados y nivelados.

La aplicación de un manejo integrado de la enfermedad donde se considere una rotación con cultivos no hospedantes por un periodo de cinco años o más, será la única forma en que se lograrán reducir las pérdidas ocasionadas por este patógeno.

- Michigan. Plant Disease 87:841-845.
- Larkin, R.P., Gumpertz, M.L., and Ristaino, J.B. 1995. Geostatistical analysis of *Phytophthora* epidemic development in commercial bell pepper fields. *Phytopathology* 85:191-203.
- Modjeska, J.S., and Rawlings, J.O. 1983. Spatial correlation analysis of uniformity data. *Biometrics* 39:373-384.
- O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaries*). *Current Genetics* 22:213-220.
- Papavizas, G.C., Bowers, J.H., and Johnston, S.A., 1981. Selective medium for *Phytophthora capsici* from soils. *Phytopathology* 71:129-33.
- Parra, G., and Ristaino, J.B. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of bell pepper. *Plant Disease* 85:1069-1075.
- Pérez-Moreno, L., Duran-Ortiz, L.J., Ramírez, R., Sánchez-Pale, R. Olalde-Portugal, V. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:19-25.
- Ristaino, J.B. 1991. Influence of rainfall, drip irrigation and inoculum density on the development of *Phytophthora* root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. *Phytopathology* 81:922-929.
- Rodríguez, V.M., Luna-Ruiz, J.J., Valle-García, P., Tiscareño-López, M., y Ruiz-Corral, J.A. 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el Centro-Norte de México mediante un sistema de información geográfica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:72-81.
- Schlub, R.L. 1983. Epidemiology of *Phytophthora capsici* on bell pepper. *Journal of Agricultural Science* 100:7-11.
- SIAP, 2007. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA. Acceso en julio 2009.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software ver. 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- White, T.J., Bruns, T.J., Lee, S., and Taylor, J (eds.). 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J.
- Sninsky and T.J. White (eds.). PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplifications. Academic Press. San Diego, California, USA. 355 p.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.