



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL

PROTECCIÓN VEGETAL

**PATÓGENOS ASOCIADOS, FRECUENCIA DE AISLAMIENTO, Y
EFECTO DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL EN LA EXPRESIÓN
DE SÍNTOMAS DE MARCHITEZ DE CHILE**

**PRESENTA:
NELSON LAVILLE**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**



REGISTRADO EN LA ACADÉMIA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

CHAPINGO, TEXCOCO DE MORA, MÉXICO
FEBRERO 2015

La presente tesis titulada "PATÓGENOS ASOCIADOS, FRECUENCIA DE AISLAMIENTO, Y EFECTO DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL EN LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS DE MARCHITEZ DE CHILE," realizada por el alumno "Nelson Laville" bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:

Dr. Ángel Rebollar- Alviter

CO-DIRECTORA:

Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

ASESOR:

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

Chapingo, Texcoco, Edo. de México, Febrero del 2015.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** y al Instituto Interamericano para Cooperación en Agricultura (IICA) por el apoyo económico otorgado a los estudiantes con deseos de superación.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **personal académico** de la Maestría en Protección Vegetal por la oportunidad y el aprendizaje invaluable que me otorgaron.

Al **Ángel Rebollar-Alviter Ph.D**, por su acertada dirección, disponibilidad, colaboración, experiencia y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su gran apoyo y amistad.

A la **Dra. Hilda Victoria Silva-Rojas** por su valioso apoyo, disponibilidad y orientación durante el transcurso de este trabajo.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir** por sus aportaciones y observaciones realizadas a la presente investigación.

A **Guadalupe López Buenabad** su presencia en mi vida, la motivación, el consejo y amor ha hecho que cada momento sea mucho más fácil.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas, en especial a la **Ing. Teresa Berenice Uribe** y al **Ing. José Manuel Aguirre Rayo** por su apoyo, paciencia y amistad durante el presente trabajo.

A **Abraham y Anita** por su amistad y ayuda en los momentos difíciles.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nelson Laville (1980)

Nació el día 20 de Noviembre del 1980 en el pueblo de Penville que pertenece al municipio de St. Andrew en la isla Mancomunidad de Dominica. Realizó estudios básicos en la escuela primaria de Penville (1985- 1992), luego de haber aprobado el examen entrante a la secundaria realizó su estudio en PSS (escuela secundaria de Portsmouth) – 1992 a 1998. En el 1998 ingresó al colegio comunitario de Clifton Dupigny donde hizo un Diploma en Agricultura y egresó en el 2000, ocupó el tercer lugar en su generación de 32. En este mismo año recibió una beca para estudiar en la Universidad de Ciego de Ávila en Cuba, egresó en el 2006 como Ingeniero Agrónomo. Desde entonces ha trabajado con el Ministerio de Agricultura como oficial en departamento de protección vegetal y cuarentena. Durante el periodo de 2008 a 2012 dirigió varias campañas de manejo de plagas y enfermedades como la Sigatoka Negra, Huanglonbing, Ácaro rojo de la palma, el Caracol gigante y otros. También fue integrante de varios equipos de trabajo y proyectos en la región del caribe. En el 2013 inició sus estudios de Maestría en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, siendo miembro de la 52 generación, como alumno del programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, finalizando en 2014 con la presentación de este trabajo de investigación.

Email: Nelson.laville@gmail.com

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Origen y distribución del chile	5
4.2 La producción de chile en México	5
4.3 Descripción botánica	6
4.4 Taxonomía	7
4.5 <i>Capsicum annuum</i>	8
4.5.1 Chile Jalapeño	8
4.5.2 Chile Anaheim	8
4.6 Usos	9
4.7 Problemas fitosanitarios	9
4.8 Marchitez del chile	10
4.8.1 Antecedentes e importancia	10
4.8.2 Hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile	11
4.8.2.1 Descripción del oomiceto: <i>Phytophthora capsici</i>	12
4.8.2.2 Descripción del hongo: <i>Fusarium oxysporum</i>	13
4.8.2.3 Descripción de hongo: <i>Rhizoctonia solani</i>	14
4.9 Interacción planta- patógeno	16

4.10	Técnicas moleculares utilizada para la identificación de hongos y oomicetos	18
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1	Zona de muestreo	20
5.2	Aislamiento y purificación de hongos	26
5.3	Identificación molecular y análisis filogenético	26
5.3.1	Extracción de DNA	26
5.3.2	Amplificación de genes ribosomales	29
5.3.3	Amplificación parcial del gen factor de elongación de transcripción (TEF)	29
5.3.4	Secuenciación de productos de PCR	30
5.3.5	Análisis filogenético	30
5.4	Identificación morfológica	31
5.5	Patogenicidad de aislados de hongos y oomicetos	31
5.5.1	Producción de plantas de chile	32
5.5.2	Incremento de inóculo	32
5.5.3	Producción de zoosporas	32
5.5.4	Producción de conidios	33
5.5.5	Inoculación	33
5.5.6	Efecto de la inoculación secuencial de aislamientos de hongos y oomicetos en el desarrollo de síntomas de marchitez.	34
5.6	Tratamientos y diseño experimental	35
5.7	Análisis de datos	36
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1	Hongos y oomicetos asociados a la marchitez de chile en el Bajío Michoacano	37
6.2	Filogenia de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en el bajío Michoacano	41

6.3	Diagnóstico de hongos y oomicetos de mayor frecuencia asociados a la marchitez del chile en el Bajío Michoacano-Ciénega de Chapala	44
6.3.1	<i>Phytophthora capsici</i>	44
6.3.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	45
6.3.3	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (<i>Plectosporium tabacinum</i>)	46
6.4	Patogenicidad de hongos/oomicetos asociados a la marchitez del chile	48
6.5	Efecto de la inoculación secuencial de patógenos asociados en el desarrollo de síntomas	54
VII.	CONCLUSIONES	57
VIII.	LITERATURA CITADA	59
	ANEXOS	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Localidades, distribución y cantidad de muestras de plantas con síntomas de marchitez del chile colectadas en Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa en el estado de Michoacán durante el periodo del Verano-Otoño 2013 /2014.	21
Cuadro 2.	Componentes y cantidades de la mezcla para la amplificación por PCR de la región ITS del DNA ribosomal.	28
Cuadro 3.	Componentes y cantidades en la mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen del Factor de Elongación de la Transcripción (TEF).	29
Cuadro 4.	Tratamientos utilizados para las pruebas de patogenicidad y la inoculación secuencial de tres especies asociadas a la marchitez del chile durante el periodo Verano-Otoño 2013 y 2014 en los municipios productores de chile en el estado de Michoacán, México.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapas de ubicación del área y puntos de muestreo en el estado de Michoacán generado en Google Earth. 20
- Figura 2.** Síntomas de marchitez del chile en parcelas comerciales muestreadas en los municipios de Tanhuato, Vista Hermosa y Yurécuaro en el estado de Michoacán, México. Durante el ciclo verano-otoño, 2013-2014. Flechas azules en lámina a, b y c indican plantas con síntomas muestreadas en campo. 22
- Figura 3.** Plantas muestreadas con síntomas de marchitez del chile en sus.... tres etapas fenológicas: a) etapa vegetativa, b) etapa de floración y c) etapa de fructificación. 23
- Figura 4.** Plantas muestreadas en campo con síntomas de marchitez del chile. Lámina a y b mostrando la marchitez de la planta conservando su color verde. Lámina c, d, e y f muestran plantas con síntomas de marchitez con un amarillamiento progresivo, reducción de crecimiento y la muerte de la planta. 24
- Figura 5.** Síntomas típicos de marchitez del chile en: a) Chile poblano; b) Pimiento morrón, c) Chile Anaheim tipo caloro, d) Chile jalapeño en los municipios de Vista Hermosa, Yurécuaro y Tanhuato, en Michoacán, México. 2013 y 2014. 25

- Figura 6.** Proceso en la inoculación de las plántulas para las pruebas de patogenicidad; **a)** y **b)** conteo de conidios y zoosporas con un hemocitómetro y microscopio compuesto de luz. **c)** Ajustando la solución de inóculo a 1×10^6 conidios/mL., **d)** y **e)** aplicación de 5-10 mL de la solución de inóculo al cuello de las plántulas. 34
- Figura 7.** Gel de agarosa revelando fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases (pb) del producto de PCR de la región ITS amplificado del DNA de hongos . Marcador de peso molecular de 1 kb. Las muestras 1,3, 6 y 9 son algunos ejemplos de las amplificaciones de *F. oxysporum* (*F.o*), en tanto que la muestra 42 correspondiente a *Plectosphaerella cucumerina* (*Plec*). 37
- Figura 8.** Proporción de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa en el estado de Michoacán, con base en la identificación filogenética. La figura representa una muestra de 200 cepas seleccionadas de un total de más de 492 aislamientos obtenidos de muestreos durante el periodo Verano- Otoño 2013 y 2014. 39
- Figura 9.** Distribución de frecuencia de los hongos y oomicetos encontrados asociados a la marchitez del chile en el raíz y cuello de las plantas muestreadas en Verano-Otoño 2013 y 2014 en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa en el estado de Michoacán, México. 40

- Figura 10** Árbol filogenético construido por el método máxima parsimonia 42
de la región de ITS (Espacio transcrito interno). La
amplificaciones provienen de DNA extraído por el método de
CTAB de hongos aislados de plantas con síntomas de marchitez
colectadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista
hermosa, en Michoacán durante el Verano–Otoño 2013 y 2014.
- Figura 11.** Árbol filogenético construido por el método máxima parsimonia 43
de la región de ITS (Espacio transcrito interno). La
amplificaciones provienen de DNA extraído por el método de
CTAB *Phytophthora capsici* aislados de plantas con síntomas de
marchitez colectadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y
Vista hermosa, en Michoacán durante el Verano–Otoño 2013 y
2014.
- Figura 12.** **a)** Crecimiento de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo V8 , 44
b), c) y d) Preparación microscópica de hifas y esporangios en
ácido láctico observado por microscopía de luz con amplificación
de 40X y tomados con cámara de Samsung HD de 16 mega
píxeles 5X.
- Figura 13.** **a)** Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo 45
PDA. **b), c), d) y e)** preparación de clamidosporas, fialides,
microconidios y macroconidios en ácido láctico observado por
microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con
cámara de Samsung HD de 16 mega píxeles 5X.

- Figura 14.** a) Crecimiento de *Plectosphaerella cucumerina* en medio de cultivo PDA. b), c) y d) observación de micelio, clamidosporas y microconidios inmersos en ácido láctico. Las observaciones se realizaron por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con camera de Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. 46
- Figura 15.** Síntomas observados en las pruebas de patogenicidad para las cepas de *Phytophthora capsici* aisladas de plantas muestreadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa, Michoacán, México. 49
- Figura 16.** Síntomas observados en las pruebas de patogenicidad para las cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de plantas muestreadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa, Michoacán, México. 50
- Figura 17.** Progreso de síntomas en raíz y cuello de la enfermedad de marchitez del chile como se observaron en las pruebas de patogenicidad para *P. cucumerina* (*P. tabacinum*). Flecha mostrando área de daño causado por el patógeno. a) Raíz sana de plantas testigo; lámina b, c, d y e muestran el progreso de síntomas de ahogamiento en cuello y poco desarrollo de raíz hasta la muerte de la planta. 51

PATÓGENOS ASOCIADOS, FRECUENCIA DE AISLAMIENTO, Y EFECTO DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL EN LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS DE MARCHITEZ DE CHILE

ASSOCIATED PATHOGENS, FREQUENCY OF ISOLATES AND EFFECT OF SEQUENTIAL INOCULATION ON SYMPTOM EXPRESSION IN PEPPER WILT

Laville N.¹, Silva-Rojas, H. V., Leyva-Mir, S. G., y Rebollar Alviter A.²

¹ Alumno de la Maestría en Protección Vegetal. UACH. Chapingo, Edo. De Méx., ² Profesor Investigador del CRUCO, UACH. Chapingo, Edo. De Méx.

RESUMEN

La marchitez del chile reduce significativamente el rendimiento, lo que induce a los agricultores a cambiar de cultivo o abandonar las tierras agrícolas que están infestadas con los patógenos asociados. Aunque en general *Phytophthora capsici* se ha asociado a la enfermedad en las regiones del centro de México, más patógenos se han asociado a la enfermedad, pero sus efectos interactivos sobre la gravedad de la enfermedad se desconoce. El objetivo de esta investigación fue evaluar la coexistencia de estos patógenos y el desarrollo de síntomas de la enfermedad en Chile. Con el fin de determinar los hongos y oomicetos asociados a la marchitez de Chile, se realizaron muestreos de julio a noviembre de 2013 y 2014 en Yurécuaro, Vista Hermosa y Tanhuato municipalidades en Michoacán, México. Los aislamientos se realizaron en el laboratorio en un medio V8 y PDA. De 200 muestras procesadas en el laboratorio 45% correspondió a *Fusarium* sp., el 30%, *P. capsici* 10% a *Rhizoctonia solani*, 4% a *Pythium* y el 11% a los patógenos no identificados previamente asociados marchitez. La identificación se realizó a nivel molecular a través de la extracción de DNA total de hongos usando el método de CTAB 2%. Las amplificaciones por PCR de la región correspondiente al ITS se realizaron mediante ITS5 y NL4. Los fragmentos amplificados fueron verificados por electroforesis horizontal y se secuenciaron utilizando la metodología de Sanger. La presencia de *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. y *Plectosphaerella cucumerina*, se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. Esta es la primera vez que *P. cucumerina* se ha identificado y asociado con la marchitez del Chile en Michoacán, México. Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de patogenicidad y ensayos de inoculación secuencial con cepas seleccionadas de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *P. cucumerina* y se confirmó que *P. cucumerina*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* son patógenos del Chile Jalapeño y Anaheim.

Palabra Claves: Marchitez del Chile, PCR, *Plectosphaerella cucumerina*

ABSTRACT

Pepper wilt significantly reduces yields, inducing farmers to change crops or abandon farmlands that are infested with the associated pathogens. Although in general *Phytophthora capsici* has been associated to the disease, in producing regions from central Mexico, more pathogens since have been associated with it, but their interactive effects on the disease severity are unknown. The objective of this research was to evaluate the co-existence of these pathogens and the development of disease symptoms in pepper. In order to determine the fungi and oomycete associated to pepper wilt, a survey from July to November of 2013 and 2014 was conducted in Yurécuaro, Vista Hermosa and Tanhuato municipalities in Michoacán, Mexico. Isolations were done in the lab on V8 and PDA media. From 200 samples processed in the lab, 45% corresponded to *Fusarium* Sp., 30% *P. capsici* 10% to *Rhizoctonia solani*, with 4% to *Pythium* and 11% to an organism not previously identified associated with pepper wilt. Identification at the molecular level through total DNA. extraction using the method of 2% CTAB was performed. Amplifications of the region corresponding to the 16S rDNA were performed using ITS5 and NL4. The amplified fragments were verified by horizontal electrophoresis and sequenced using Sanger methodology. The presence of the *Fusarium* Sp., *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. and *Plectosphaerella cucumerina*, was detected after the sequences deposited in the GenBank database. This is the first time that *Plectosphaerella cucumerina* has been identified associated with pepper wilt in Michoacán, Mexico. Subsequently the pathogenicity tests and sequential inoculation assays with selected isolates of *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *P. cucumerina* were conducted and it was confirmed that *P. cucumerina*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* are pathogenic on Jalapeño and Anaheim peppers.

Key Words: Pepper wilt, PCR, *Plectosphaerella cucumerina*

correspondencia:rebollaralviter@gmail.com

I. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una hortaliza originaria del continente Americano. que se cultiva en todo el mundo. Por la gran diversidad de usos el cultivo de chile se ha extendido a todo el territorio nacional, desde altitudes los 2500 msnm hasta el nivel del mar. En México se siembran aproximadamente 100, 000 hectáreas, prácticamente en todos los estados de la república, con un volumen de producción de 1,400,000 t y un valor de la producción de 9, 200,000 pesos (SIAP, 2014).

En el 2009 las exportaciones mexicanas de chile fueron de 89,110 t (SIAP 2010), y la demanda en el mercado nacional es creciente debido a su alto contenido de vitaminas A y C y de carotenos que son compuestos con propiedades antioxidantes (Nuez et al., 1996).

Los principales estados productores de chile en México son Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Michoacán, Guanajuato, Veracruz, Zacatecas y Oaxaca. En el 2013, la superficie sembrada de chile en Michoacán fue de 2, 203 ha obteniéndose un rendimiento medio de 24 t ha⁻¹ (SIAP 2014).

Los agricultores enfrentan problemas de tipo fitosanitario que causan mermas económicas a todas las variedades de chiles cultivadas. En orden de importancia destacan las enfermedades causados por virus, hongos, oomicetos, bacterias e insectos (Pozo, 1983). En relación a hongos y oomicetos, la marchitez del chile es una de las más afectan la producción de este cultivo. Esta enfermedad fue originalmente descrita por Galindo en 1960. Redondo (1974) resalta su importancia por ocasionar una muerte

prematura de la planta y ocasionar la pérdida total de la producción cuando no se controla a tiempo. Esta enfermedad causa pérdidas del 40% en la producción, además de ser la responsable de reducir la superficie cultivada de algunas zonas productoras Pernezny (2003).

De acuerdo con Galindo (1960), la enfermedad de la marchitez del chile, en México se asocia a *Phytophthora capsici*. Sin embargo, en México se han encontrado que a dicha enfermedad se asocian otros patógenos, conformando un complejo. Por ejemplo, González et al. (2002) reportan que en el 65% de las muestras colectadas de plantas sintomáticas se aisló a *Fusarium* sp., 33% a *Rhizoctonia solani* y 33% a *Phytophthora capsici*. Posteriormente, González et al. (2004) muestrearon 304 plantas de chile con síntomas de marchitez en la región Centro-Norte de México en donde encontraron a *Fusarium* sp. en un 57% , *Rhizoctonia solani* en un 24% y *Phytophthora capsici* en un 19%.

Aunque en diferentes regiones de México y otros países coinciden en que a dicha enfermedad se asocian diferentes agentes casuales, las pruebas de patogenicidad se han realizado de manera separada o en mezclas de inóculo (Sanogo, 2006), sin que hasta la fecha se haya determinado el efecto de la inoculación secuencial sobre el desarrollo de síntomas de la marchitez del chile. La presente investigación busca dar respuesta a la pregunta, ¿cómo impacta la inoculación secuencial de patógenos asociados a la marchitez del chile sobre el desarrollo de síntomas?, es decir, ¿incrementa o reduce la

expresión de síntomas la infección de un patógeno en relación a otro? Por lo que se plantearon los siguientes:

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Conocer la distribución y frecuencia de aislamientos de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en la región bajío Michoacano-Ciénega y determinar el efecto interactivo de ellos mediante la inoculación secuencial sobre el desarrollo de síntomas.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar los hongos y oomicetos presentes en el sistema vascular de las plantas con síntomas de marchitez del chile.
- Determinar la patogenicidad de los hongos y oomicetos y el efecto interactivo de la inoculación secuencial sobre el desarrollo de síntomas de marchitez del chile.

III. HIPÓTESIS

La marchitez es causada por un complejo de hongos y oomicetos asociados a la raíz del chile, los cuales pueden ser aislados en diferentes frecuencias.

La inoculación secuencial de patógenos asociados a la marchitez del chile acelera el desarrollo de síntomas de marchitez del chile.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Origen y distribución del chile

El género *Capsicum* incluye cerca de 30 especies, la más importante, por su diseminación y aceptación mundial es *C. annuum* a la que pertenecen los chiles de México con excepción del chile habanero (*C. chinense*) y el chile manzano (*C. pubescens*), su origen es Mesoamérica principalmente América del sur, de los Andes y la cuenca alta del Amazonas (Guerrero et al., 1984). Aunque el género *Capsicum* se originó en Mesoamérica fue dispersado ampliamente en todo el continente por migraciones precolombinas, la dispersión mundial inició con Cristóbal Colón (Smith 1987).

4.2 La producción de chile en México

Del total de variedades producidas en México existe una concentración de 22 grupos de chiles verdes en los cuales destacan el jalapeño, el poblano y el serrano; y 12 secos. Los chiles verdes, se producen durante la mayor parte del año realizándose dos cosechas, la siembra del ciclo otoño-invierno que inicia en diciembre y concluye en agosto y la de primavera-verano que abarca de junio a marzo.

Por variedades, la tercera parte de la producción es de chile jalapeño con 31%; y que junto con serrano (10.9%), poblano (9.7%) y morrón (8.1%) aportaron 59.7% del volumen nacional total de chiles verdes en el año 2009 (SIAP, 2011). En el periodo de 2000 a 2009, la superficie cosechada registró una descenso en la tasa media anual de

crecimiento de 0.4%, pues pasó de 145,647 ha en el año 2000 a 140, 424 ha en el 2009, esta disminución se debió a diversos problemas en la producción (SIAP, 2011).

Entre los años 2000 y 2009, el consumo aparente promedio fue solo de 1.6 millones de toneladas: no obstante en 2008 y 2009 fue inferior. Esto no significa que la producción haya disminuido sino que la demanda internacional del cultivo mexicano creció considerablemente (SIAP, 2011).

4.3 Descripción botánica

El chile presenta una raíz pivotante, provista de muchas raíces secundarias largas y fibrosas. Suele profundizar en 30 y 60 cm y la exploración lateral se entiende hasta 50 cm de eje. El sistema radical representa de 7 al 17 % del peso seco total de la planta adulta, dependiendo del genotipo, las condiciones de cultivo y las relaciones fuente-demanda (Wien, 1999; Nuez et al., 2003).

El tallo es erecto, herbáceo, ramificado y circula a la madurez en la sección media. Puede ser glabro o pubescente de crecimiento determinado o indeterminado (Valadez-Moctezuma, 1993; Nuez et al., 2003).

El número de hojas es controlado por la temperatura y el genotipo, pero generalmente se desarrollan entre 8 y 15 hojas antes de la aparición de la primera flor, y la relación entre el número de hojas y flores cercano a uno (Rylski, 1986). Las hojas varían en tamaño, forma y color pero la mayoría son simples, enteras y simétricas; además, suelen ser planas, suaves y pueden tener o no, pubescencia (Bradford y Votava, 2000).

La flor típica es pentámera, hermafrodita e hipógina y se encuentra usualmente solitaria en las axilas. *C. annuum* inicia la floración con una flor en el primer nudo axilar, después una flor se forma en cada nudo adicional, en progresión geométrica (Bosland y Votava, 2000).

El fruto es una baya constituida por un pericarpio grueso, succulento y un tejido placentario al que se unen las semillas. La pungencia se debe a la presencia de capsicinoides, cuyo contenido varía desde trazas hasta 0.7% de la biomasa total del fruto en los tipos más picantes (Nuez et al., 2003). El cambio de coloración se debe a que el contenido de carotenoides aumenta hasta 120% en el momento de la madurez. El contenido de azúcares también sufre incrementos progresivos hasta la maduración total (Salunkhe, 2003).

4.4 Taxonomía

El género *Capsicum* pertenece a la familia solanácea y consiste al menos de 25 especies silvestres y semicultivadas y cinco especies domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*) por culturas establecidas en diferentes regiones de México, centro y sur de América (Hernández- Verdugo et al., 1999).

División: Spematophyta

Línea: Angiospermae

Clase: Dicotyledones

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum annuum* L.

4.5 *Capsicum annuum*

4.5.1 Chile Jalapeño

De género *Capsicum*, es el chile de mejor sabor y el más famoso del mundo, es originario de Jalapa, Veracruz. Este chile se caracteriza por mantener intactas su propiedades picantes, independiente del calor o congelación de los alimentos. El chile fresco es de color verde o verde oscuro, de forma cónica alargada, carnosos con piel brillante. Mide en promedio unos 6 cm de largo y 2.5 cm de ancho. Se considera picoso o muy picoso. Es ampliamente cultivado en diferentes regiones del país por lo que se conoce por varios nombres, regionales o locales. El mesocarpio es grueso, lustroso y aromático.

4.5.2 Chile Anaheim

Del género *Capsicum*, son pimientos ligeramente picantes originarios de Anaheim, California. A estos pimientos también se les llama chiles Magdalena o California. Producir chiles Anaheim es muy parecido a sembrar otros tipos de chiles. Los chiles Anaheim miden 15 a 17 cm de largo y alrededor de 1 a 1.5 cm de diámetro. Su longitud disminuye ligeramente formando una punta en un extremo. La mayoría de los chiles

Anaheim se arrugan o doblan cerca de la punta del tallo. Normalmente, estos chiles se comen verdes, pero se vuelvan marrones cuando se secan.

4.6 Usos

Los frutos de chile se utilizan principalmente para elaborar salsas, encurtidos, colorantes. Entre los tipos más comerciales encontramos al chile jalapeño cuya producción se divide de la siguiente manera: 60% para la industria, 20% para el consumo en fresco y el resto es deshidratado como chipotle. En cuanto a chile ancho la mitad de la producción se comercializa en fresco y el resto a la industria deshidratadora que a su vez destina el 85% y 15% para la obtención de chile en polvo y colorantes. En contraste más del 90% de la producción de chile tipo serrano se consume en fresco y solo 10% es procesado (Laborde y Pozo, 1984).

4.7 Problemas fitosanitarios

La producción de chile se ha afectado por patógenos en sus etapas fenológicas, ocasionando grandes pérdidas en el rendimiento que pueden llegar al 100% si no tienen un buen manejo. Entre los grupos de plagas más importante están las bacterias, hongos, oomicetos, virus, nematodos e insectos.

Las enfermedades bacterianas que se reportan afectando el cultivo de chile son: cancro bacteriano (*Clavibacter michiganesis*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), marchitez (*Ralstonia solanacearum*) y marchitez de plántulas y manchas foliares (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) (Pernezny et al., 2006; CABI, 2010).

Entre los hongos y oomicetos reportados se incluyen los siguientes: antracnosis en tallos y frutos (*Colletotrichum capsici*, *C. gleosporoides*, *C. acutatum*) manchas foliares (*Cercospora capsici*, *C. melongenae*) damping-off (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.) pudrición de frutos (*Alternaria alternata*, *C. capsici*, *C. coccodes*, *C. gleosporoides*, *C. acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*), marchitez (*Phytophthora capsici*, *Fusarium* sp.) (Pernezny et al.,2006; CABI, 2010).

Las enfermedades causadas por virus asociados al cultivo son: Chilli Veinal Mottle (ChiVMV), Cucumber mosaic virus (CVM), Pepper mottle virus (PepMoV), Pepper Yellow Mosaic Virus (PepYMV), Tobacco Mosaic Virus (TMV), Pepper Mild Mottle Virus (PMMV), Tomato Spotted Wilt virus y otros (Pernezny et al., 2006; CABI, 2010).

Los insectos más comunes en el cultivo son los afidos (*Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae*), coleópteros (*Epilachna* sp.) mosquitas blancas (*Trialeuodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *B. argentifolii*), ácaros (*Tetranychus urticae*, *Polyphagotarsonemus latus*) y picudo (*Anthonomus eugenii*) (Pernezny et al.,2006; CABI, 2010).

4.8 Marchitez del chile

4.8.1 Antecedentes e importancia. La marchitez de chile es una enfermedad característica de *C. annuum* producida por hongos del suelo y por condiciones de humedad y asfixia radicular que ocasionan a menudo el marchitamiento de la planta (Ramírez, 2012). Sin embargo por muchos años se le han atribuido la enfermedad a *Phytophthora capsici*.

P. capsici fue descrito por Leonian en 1922 ocasionando la marchitez en chile morrón (*C. annum*) en nuevo México, USA. En México se reportó por primera vez en 1956 por el Dr. Galindo. Varias investigaciones indican que la enfermedad afecta entre 10 a 60% en cultivo (Pérez et al., 1990; Chávez, 1994; Vásquez et al., 2009), pero puede afectar su totalidad en regiones como el Bajío, Puebla y Oaxaca. Pernezny et al. (2003) reportan que este oomiceto causa un 40% en pérdidas en la producción, provocando la reducción de la superficie cosechada. Guijón y González (2001) en su estudio regional de enfermedades del chile en el sur de chihuahua encontraron que las pérdidas oscilan del 5.3 al 32 %. En los años 80's *P. capsici* fue el principal problema fitosanitario, originando desplazamiento del cultivo a zonas libres del patógeno (Pozo, 1983). Más recientemente se ha detectado otros organismos asociados a la enfermedad. Velásquez (2001) detectó en la región centro norte de México los organismos, *Rhizotonia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp., y *Pythium* spp., presentes en plantas sintomáticas de marchitez. González et al. (2002) muestrearon plantas de chile con síntomas de marchitez en siete estados de la república Mexicana y determinaron que el 65% de las muestras se asociaron a *Fusarium* spp., 33% a *Rhizoctonia solani* y 33% a *P. capsici*. El último también se ha reportado afectando a varios otros cultivos como pimienta, tomate, chayote, pepino y calabaza.

4.8.2 Hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile

Dentro de los diversos problemas fitosanitarios que afectan al chile en México destacan las enfermedades fungosas de la raíz que causan el marchitamiento de las plantas. A continuación se describirán los síntomas previamente reportados de manera separada.

4.8.2.1 Descripción del oomiceto: *Phytophthora capsici*. Varias Investigaciones indican que la enfermedad afecta entre el 10 y 60% en el cultivo (Pérez et al., 1990; Chávez, 1994), pero puede afectar su totalidad en regiones como el Bajío y Puebla. Guigón y González (2001) en un estudio regional de enfermedades del chile en el sur de Chihuahua encontraron que las pérdidas oscilan del 5.3 al 32%. Además de afectar a chile puede atacar otros cultivo como frutales, pimienta negra, tomate, chayote, ciruela, algodón, pepino, calabaza etc. Se ha reportado en USA, Taiwán, Italia, Argentina, Venezuela, Brasil, España, China, Francia (Erwin y Ribiero, 1996).

Los síntomas característicos pueden presentarse en cualquier parte de la planta y estado de crecimiento del chile, comienzan con una pudrición del cuello, caracterizada por un necrosamiento muy marcado el cual extiende del suelo hacia arriba debido al bloqueo de las vasos vasculares para posteriormente presentar una marchitez muy leve de la plantas y después de tres a cuatro días se marchita completamente, al hacer un corte de observa una coloración café oscuro. No se observa clorosis en las hojas de plantas infectadas por *P. capsici* (Sanogo, 2006).

Debido al salpique de suelo a la parte aérea de la planta por el efecto de la lluvia o riego en las hojas en las ramas también se presentan lesiones de color café oscuro llegando a ocasionar la muerte de las ramas y en las hojas formar áreas circulares o irregulares de coloraciones verde oscuras, acuosas las cuales al secarse se tornan de color castaño claro (Tlapal, 2000).

En los frutos la infección inicia como puntos acuosos y verde oscuro que al desarrollarse pueden llegar a cubrir en poco tiempo por completo al fruto ocasionando

que estos se vuelvan flácidos y se arrugan. Los frutos afectados permanecen adheridos a la planta. En plántulas, puede causar damping-off, después la pudrición del tallo. El mayor daño lo ocasiona cuando afecta las raíces y tallo, lo cual ocurre en la época de floración, donde la planta rápidamente se marchita y seca, los síntomas en cuello y raíz pueden confundirse con el ataque de *R. solani* (Tlapal, 2000).

4.8.2.2 Descripción del hongo: *Fusarium oxysporum*. Romero (1994) menciona que sin duda alguna, *F. oxysporum* es la especie del género *Fusarium* más ampliamente distribuido y perjudicial a la agricultura, algunos de los hospedantes como la papa, tomate, col, plátano, café, clavel y el chile, mientras que *Fusarium solani* incluye formas parásitas de frijol, papa, calabaza y del chícharo.

La marchitez ocasionada por este patógeno en el cultivo de chile fue registrado inicialmente en Nuevo México en el año 1908. A partir de esa fecha, se ha registrado el ataque de este patógeno en los estados sureste y norte de los Estados Unidos (Sherf y Macnar, 1986). Aun cuando se han registrado daños ocasionados por este patógeno y se ha caracterizado como *F. oxysporum* f.sp. *capsici* no tiene la distribución específica de esta forma especial (Black et al., 1993).

Algunos síntomas iniciales de esta enfermedad son un ligero amarillamiento del follaje y marchitez de las hojas superiores, con el tiempo progresa ocasionando la marchitez total de la planta aunque las hojas permanecen adheridas. En las pudriciones de raíz, las raíces principales de la planta muestran al principio una mancha ligeramente rojiza, que después adquiere una tonalidad que va de rojo oscuro a pardo que se va extendiendo

por la raíz principal y la porción de tallo debajo del suelo, o aparece en forma de rayas que se extienden por arriba de ella. Por lo general, el crecimiento de la planta se retarda y cuando el clima es seco las hojas pueden tornarse amarillas e incluso desprenderse de la planta. En mayoría de los casos, las plantas infectadas decaen y mueren aunque muestren o no síntomas de marchitez (Agrios, 1999).

Los primeros síntomas aparecen cuando las plantas están cerca al estado de floración. Las hojas al principio son de un color verde pálido, seguido de un amarillamiento ligero con lesiones negras en el margen de las hojas, especialmente en las puntas de estas, las hojas del tercio superior de la planta está en una posición erecta, pudiendo llegar a ser más rígidas las normales. Algunas veces la planta llega a ser íntegramente de un color amarillo y las hojas se marchitan progresivamente hacia las venas terminales; las cuales pueden llegar a ser también de color verde amarillento, las mismas que se secan rápidamente; se retuercen tomando una textura parecida al papel, mientras tanto los tallos se tornan negros y marchitos (Yu, 1994).

4.8.2.3 Descripción del hongo: *Rhizoctonia solani*. Este patógeno fue descubierto en el año 1858 por el científico alemán Kuhn, posteriormente se encontró afectando papas en Europa y las Américas (Rich, 1983). Es un hongo del suelo que invade a plantas de diferentes tipos como árboles forestales, ornamentales y cultivo hortícolas. Este mismo puede producir síntomas de ahogamiento, canchros, pudrición de la corona, ataca plántulas y plantas adultas ocasionando pudriciones (Tlapal, 2000). *R. solani*, se encuentra ampliamente dispersado por toda la República Mexicana y se ha reportado

causando grandes pérdidas económicas, especialmente en Aguascalientes, Morelos, México, Guanajuato entre otros (Tlapal, 2000).

En condiciones favorables el ahogamiento por *R. solani* es quizá el síntoma más común que ocasiona atacando a plántulas antes de que emerjan o poco después de la emergencia. Se presenta principalmente en suelos fríos y húmedos. Las lesiones son hundidas de tamaño variable, con coloraciones de café canela a café rojizo. Las áreas oscuras y necróticas son más evidentes cuando los tejidos atacados son grandes, si las condiciones son favorables el largo y ancho de las lesiones aumenta hasta que al final rodean todo el cuello y la planta puede morir. Al dañar plantas adultas puede ocasionar el síntoma típico de “damping off”, ahogamiento y marchitez de la planta debido al daño ocasionado en raíces y tallo de las plantas, los síntomas ocasionados por este patógeno en su inicio puede observarse en las raíces como pequeñas lesiones alargadas café o rojizas hundidas las cuales con el tiempo se extienden hasta convertirse en canchales y posteriormente la muerte de la planta (Hall, 1991).

En plantas de más de 15 cm de altura ocasiona marchitez en las raíces, se puede observar áreas necróticas que varían en tamaño de acuerdo al desarrollo de la enfermedad. Mientras que la parte aérea se observa una clorosis, marchitez y por último la muerte de la planta. Estos síntomas son más visibles después de la floración. Se puede diferenciar la marchitez ocasionada por *P. capsici* de la marchitez causado por *Rhizoctonia* porque esta última provoca una pudrición no compacta y la epidermis se desprende fácilmente (Agrios, 1999).

4.9 Interacción planta-patógeno

Los patógenos de plantas utilizan diversas estrategias de vida. Las bacterias patógenas proliferan en los espacios intercelulares (apoplasto) después de entrar a través de los poros de gas o agua (estomas y hidatodos, respectivamente), o acceder a través de las heridas. Los nematodos y los áfidos se alimentan mediante la inserción de un estilete directamente en una célula vegetal. Los hongos pueden entrar directamente en las células epidérmicas de la planta, y extender las hifas en la parte superior de, entre, o por medio de las células vegetales.

Hongos y oomicetos patógenos y simbióticos pueden invaginar estructuras de alimentación (haustorios), la membrana celular por acción de la célula huésped. Membranas de haustorios, la matriz extracelular y las membranas plasmáticas de acogida forman una interfaz íntima la que determina el resultado de la interacción. Estas clases de patógenos entregan las moléculas efectoras (factores de virulencia) en la célula vegetal para mejorar la capacidad microbiana (Jones et al., 2006).

Los haustorios son hifas especializadas que forman los oomicetos, los cuales penetran las paredes celulares de las plantas y que permiten la asimilación de nutrientes de las células del hospedante por el patógeno. Estas estructuras también secretan un amplio espectro de proteínas efectoras que entran en las células del hospedante y que alteran las respuestas de defensa y metabolismo celular (Dodds, 2010). Al igual que otros fitopatógenos atacan a sus hospedantes secretando un arsenal de proteínas, colectivamente conocidas como efectores, cuyo blanco son las moléculas producidas por

las células vegetales, alterando así sus procesos fisiológicos (Thines y Kamoun, 2010). Los estudios sobre las interacciones planta-patógeno se enfocan en gran parte al estudio de genes de avirulencia (Avr) (Tyler, 2001). Los genes que determinan la resistencia y la susceptibilidad en las plantas son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en los patógenos (Madriz, 2002).

Si los mecanismos de defensa de la planta son incapaces de detectar los productos de los genes Avr, entonces la planta es susceptible a ser infectada. Se ha encontrado que muchos genes de avirulencia de los oomicetos se encuentran agrupados. Este agrupamiento sugiere que los genes involucrados en el proceso de infección puedan estar en lo que se denominarían “islas de patogenicidad” (Rocha, 2012).

Las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa contra este tipo de ataques, incluyendo tanto la elaboración de las barreras estructurales y la inducción activa de respuestas específicas que proporcionan resistencia (Singh et al., 2000). Los mecanismos activos implican el reconocimiento del agente patógeno por la planta hospedante. Una vez que el contacto se ha establecido, defensas activas se activan, y forman barreras morfológicas (engrosamiento de la pared celular), metabolitos secundarios (fitoalexinas), y las proteínas relacionadas con la defensa. Estas defensas pueden incluir la inducción y la activación de genes que codifican enzimas de la ruta de fenilpropanoides o proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), que han sido implicados en la defensa activa y desempeñan un papel en la restricción de desarrollo del patógeno y se propagan dentro de la planta. Enzimas relacionados con la defensa incluyen quitinasa, β -1,3-glucanasa y peroxidasas, estas actividades enzimáticas son

conocidas para inducir en muchas plantas la respuesta a la infección por patógenos fúngicos por ejemplo *Fusarium* spp. y también se correlacionan con la resistencia inducida (Wang, 2013).

Estudios recientes por Fernández-Pavia (1997) y Esra et al. (2011) indicaron que un aumento en la actividad de la peroxidasa se asoció con CM334 resistencia a *P. capsici* en comparación con las plantas susceptibles. El cambio en el metabolismo de la planta es significativamente diferente para las plantas susceptibles y resistentes.

4.10 Técnicas moleculares utilizada para la identificación de hongos y oomicetos

La identificación adecuada de organismos patógenos de las plantas cultivadas es importante en la implementación de estrategias para el manejo y control de enfermedades. Particularmente se requiere la caracterización fenotípica y genética de los patógenos de plantas persistentes en un área determinada. La aplicación de técnicas moleculares, permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de hongos fitopatógenos, principalmente cuando los criterios morfológicos de clasificación son variables. El uso de técnicas moleculares permite la identificación de organismos fitopatógenos de forma certera por estar basado en la composición del DNA (Calle, 2005).

Entre las técnicas disponibles para la identificación de patógenos, las técnicas basadas en los ácidos nucleicos son ampliamente reconocidas por ser las más exactas. Las técnicas de detección basadas en los ácidos nucleicos, particularmente aquellas que se basan en la

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), son rápidas, específicas y altamente sensibles (Vincelli y Tisserat, 2008).

La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos tiene una alta sensibilidad para diferenciar entre aislamientos, por ejemplo, se pueden discriminar con precisión diferentes cepas de *F. oxysporum* o algún otro hongo. El uso de marcadores moleculares permite además procesar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo (Alves *et al.*, 2002).

White *et al.* (1990) describieron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del operón rDNA ribosomal, en la molécula de DNA de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estas regiones. Los análisis moleculares se utilizan en la identificación de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos, especialmente para géneros dentro de los cuales las especies tienen características morfológicas coincidentes entre ellas. La detección o diagnóstico molecular podría ser más útil a partir de tejido vegetal y/o muestras de suelo directamente, además de que su uso en combinación con técnicas serológicas como ELISA, incrementan la sensibilidad y previenen problemas con inhibidores de productos PCR, tan comunes en plantas. Sin embargo, se necesitan de mayores avances, principalmente en el desarrollo de técnicas más confiables y disponibles para la extracción de DNA y/o RNA de tejido vegetal o suelo para emplear en laboratorios de diagnóstico (Martin *et al.*, 2000).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Zona de muestreo

La investigación se enfocó al muestreo de la región Bajío Michoacano, en los municipios de Vista Hermosa, Tanhuato y Yurécuaro en el estado de Michoacán, México (Fig. 1).

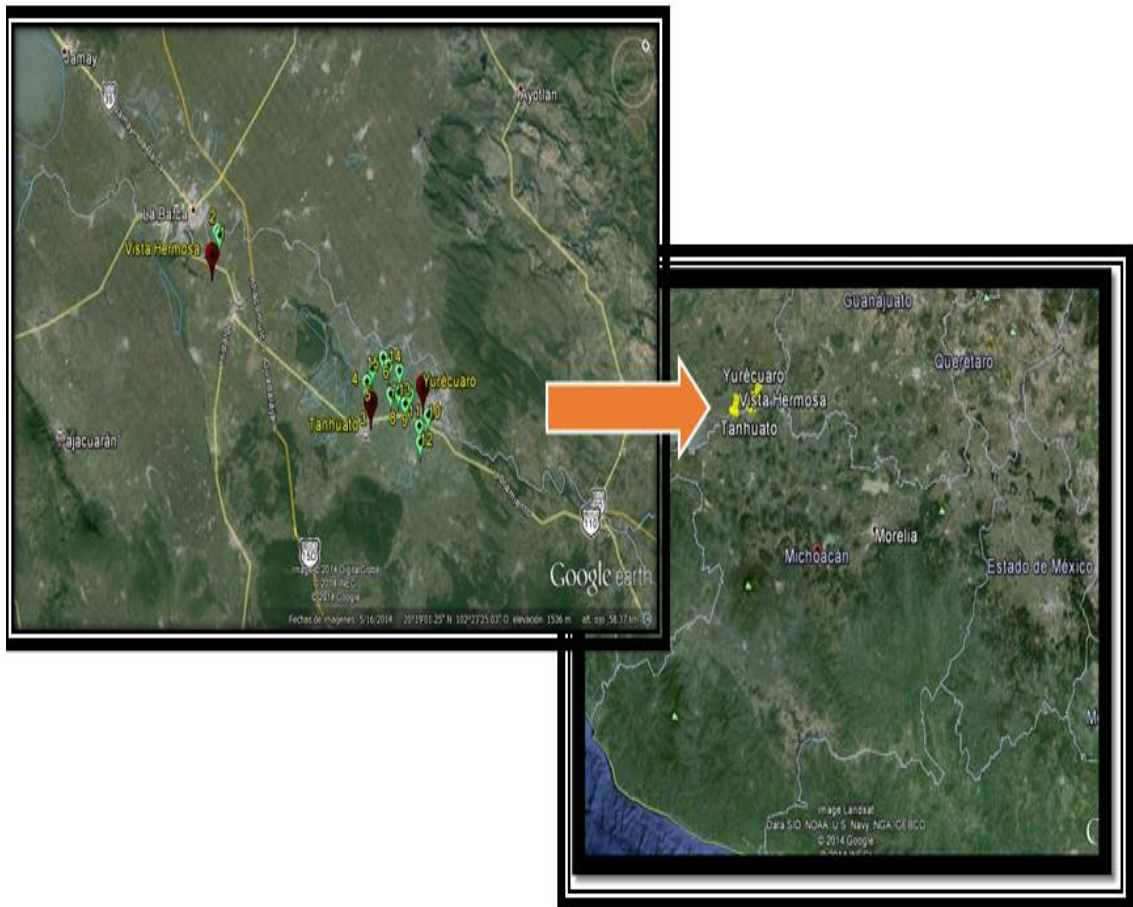


Figura 1. Mapas de ubicación del área y puntos de muestreo con ubicación en el estado de Michoacán generado en Google Earth. 2013-2014.

Cada uno de los sitios muestreados fueron georeferenciados para su mejor ubicación, cuadro 1.

Cuadro 1. Localidades, distribución y cantidad de muestras de plantas con síntomas de marchitez del chile colectadas en Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa en el estado de Michoacán durante el periodo del Verano-Otoño 2013 /2014.

Municipio	Localidad	Coordenadas GPS		No. Muestras	No. Aislamientos
		Latitud	Longitud		
Vista hermosa	Vista Hermosa	20°17'07''	102°30'31''	25	50
Vista hermosa	Vista Hermosa	20°17'10''	102°30'44''	28	56
Vista hermosa	La providencia	20°17'48''	102°20'07''	12	24
Tanhuato	La colmena	20°18'04''	102°20'24''	18	36
Tanhuato	Ejido la tuza	20°18'36''	102°20'25''	10	20
Tanhuato	Rancho el Sifón	20°18'31''	102°19'02''	21	42
Tanhuato	El Calvario	20°18'44''	102°18'24''	20	40
Yurécuaro	El Calvario	20°19'08''	102°18'09''	18	36
Yurécuaro	Yurécuaro	20°1'36''	102°17'02''	16	32
Yurécuaro	El Tequezquite	20°18'12''	102°16'39''	18	36
Yurécuaro	El Potrero	20°18'49''	102°18'42''	12	24
Yurécuaro	El Tequezquite	20°19'26''	102°19'07''	15	30
Yurécuaro	R. de Alberto	20°19'12''	102°18'44''	15	30
Yurécuaro	Potrero del Yaki	20°19'15''	102°20'09''	18	36
Total				246	492

En el ciclo verano-otoño del 2013 y 2014 se colectaron plantas de chile (*C. annuum* L.), sintomáticas con marchitez de parcelas comerciales (Fig. 2). En el 2013, los muestreos iniciaron aproximadamente, 2 meses después del trasplante, se repitieron cada 2 ó 3

semanas para un total de 8 muestreos. En 2014, se realizaron muestreos iguales como se hicieron en el 2013, iniciando 2 meses después del trasplante, y hasta la cosecha. Las muestras se colectaron de los campos en forma Zig- Zag.

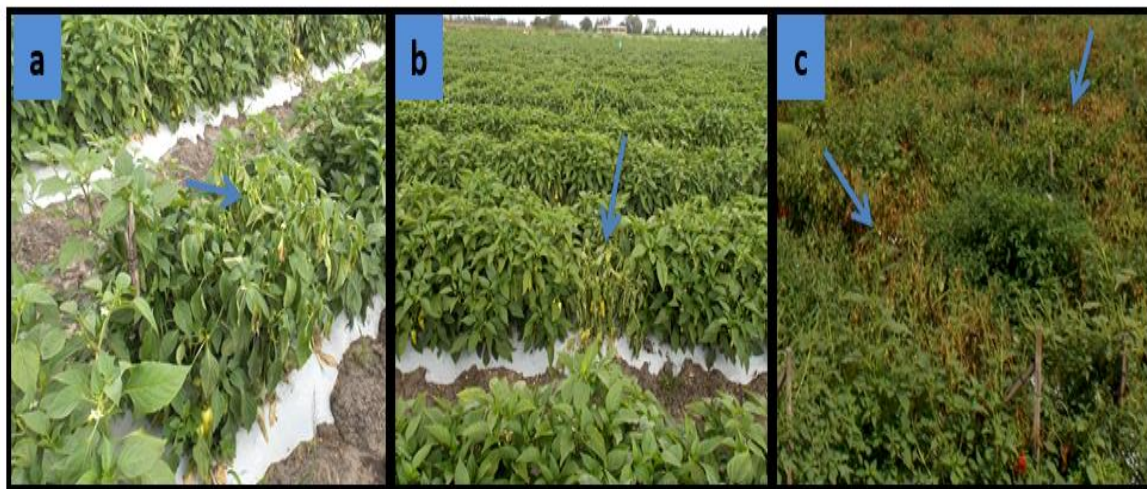


Figura 2. Síntomas de marchitez del chile en parcelas comerciales muestreadas en los municipios de Tanhuato, Vista Hermosa y Yurécuaro en el estado de Michoacán, México. Durante el ciclo verano-otoño, 2013-2014. Flechas azules en lámina a, b y c indican plantas con síntomas muestreadas en campo.

Los muestreos se hicieron con fechas que correspondieron a las diferentes etapas fenológicas de la planta (Fig. 3).

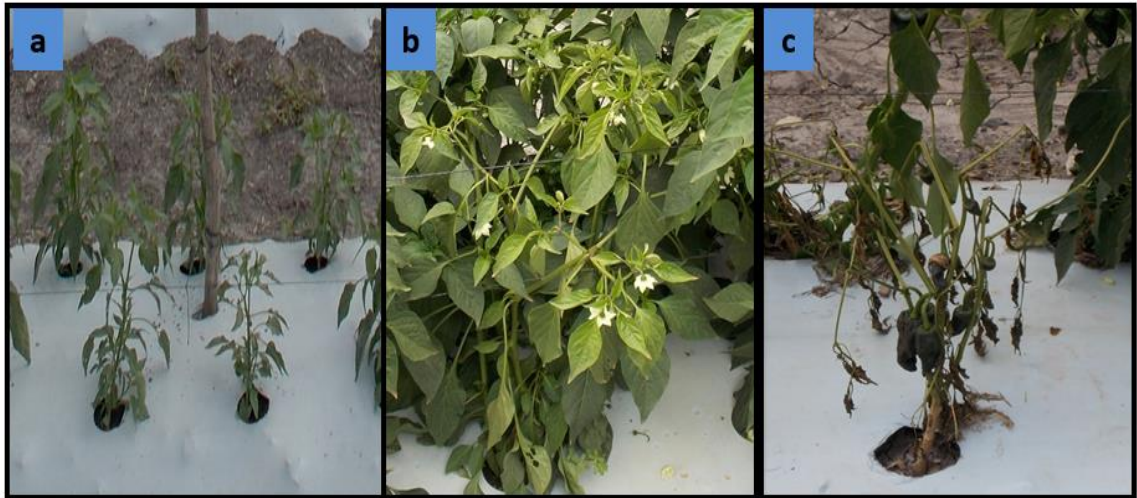


Figura 3. Plantas muestreadas con síntomas de marchitez del chile en sus tres etapas fenológicas: a) etapa vegetativa, b) etapa de floración y c) etapa de fructificación.

Durante el curso del muestreo, se observaron diferentes tipos de síntomas, que culminaban en marchitez; en el primer caso, las plantas se colapsaron manteniendo el follaje verde, y en el otro, las plantas, manifestaron un amarillamiento progresivo, reducción del crecimiento y finalmente la marchitez (Fig. 4).

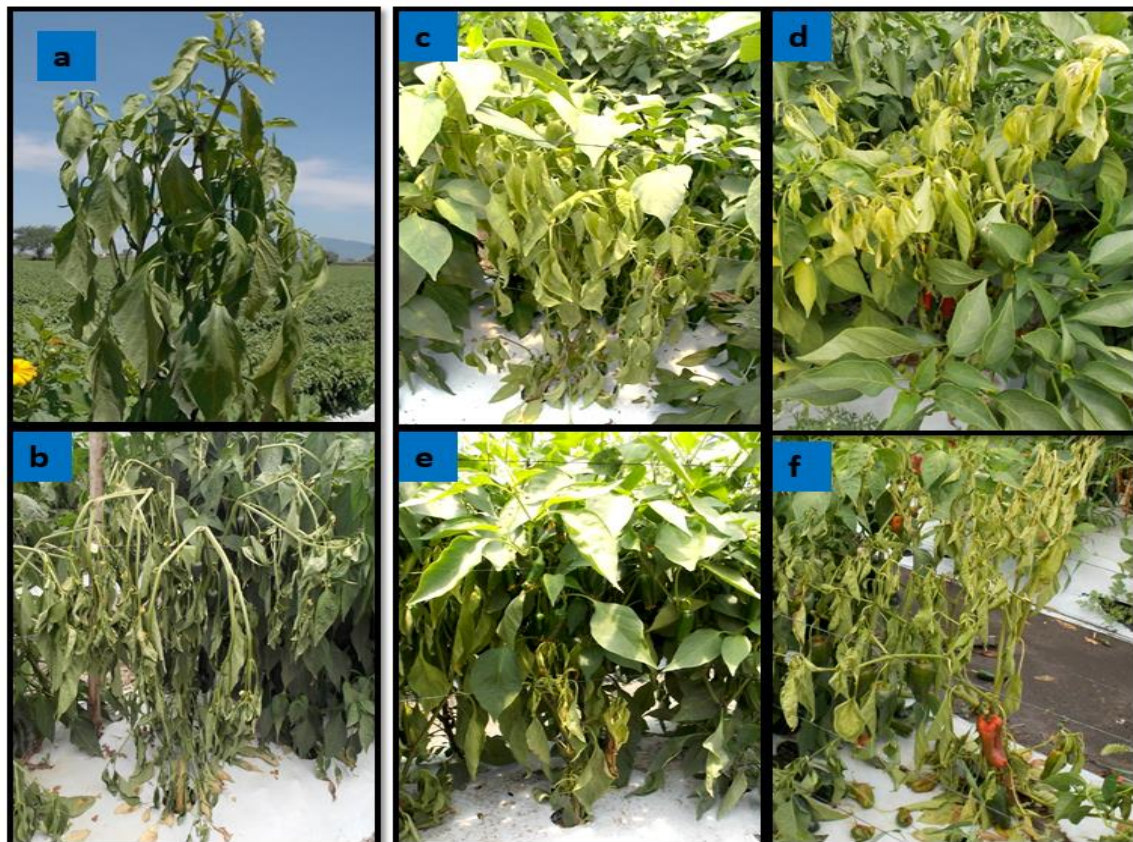


Figura 4. Plantas muestreadas en campo con síntomas de marchitez del chile. Lámina a y b mostrando la marchitez de la planta conservando su color verde. Lámina c, d, e y f muestran plantas con síntomas de marchitez con un amarillamiento progresivo, reducción de crecimiento y la muerte de la planta.

Debido a que los huertos comerciales producen diferentes tipo de chile y dado que todos presentaron síntomas de marchitez, se muestreo chiles de tipo Jalapeño, Morrón, Poblano y Anaheim (Fig. 5).



Figura 5. Síntomas típicos de marchitez del chile en: a) Chile poblano; b) Pimiento morrón, c) Chile Anaheim tipo calor, d) Chile jalapeño en Vista Hermosa, Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán. México. 2013 y 2014.

En todos los casos, las plantas colectadas se colocaron en una hielera, y se llevaron al laboratorio de micología del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo donde fueron procesadas.

5.2 Aislamiento y purificación de hongos

Las muestras de raíz y tallo obtenidas de plantas sintomáticas se lavaron con agua corriente para limpiarlas y se cortaron en porciones de 0.5 cm aproximadamente, obteniendo así cortes de raíz y cuello de aproximadamente 1cm. Los trozos de raíz y cuello se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 3% por 3 min y se enjuagaron durante 3 min. Después las porciones se secaron sobre sanitas estériles y se sembraron en medio PDA (BIOXON®) y V8 en la campana de flujo laminar. Las cajas se sellaron con Parafilm® y se incubaron por 72 horas a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y una vez que se observó crecimiento fungoso, se separaron por tipos de dominio: oomicetos y hongos.

Posteriormente, para obtener los aislados, se preparó medio de Agua Agar en el que se colocaron fracciones de medio con micelio. Una vez que el hongo/oomiceto creció, se obtuvieron puntas de hifa de cada cultivo y se transfirieron a medio PDA ácido (25 a 30 gotas de ácido Láctico mL^{-1}).

5.3 Identificación molecular y análisis filogenético

5.3.1 Extracción de DNA. Se realizó de acuerdo al protocolo de CTAB al 2% (Tris-HCl 100mM pH 8.0; EDTA 2H₂O mM; CTAB 2%; NaCl 1.4 M) (Doyle and Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. Se colocó en un tubo 1 mL del buffer previamente

calentado a 60 °C. Del crecimiento micelial en las cajas de Petri con medio PDA, se raspó el micelio con una espátula y se agregó a tubos de 2 mL de marca eppendorf, se mezcló vigorosamente y se incubó a 80 °C durante 60 minutos, mezclando en un vortex cada 10 min. Después se centrifugó por 5 min a 11,500 rpm, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de 2 mL, al que se le agregó 500 µL de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1 v/v), y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 11,500 rpm durante 10 min para formar la fase acuosa y la fase orgánica; se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de 2 mL, posteriormente se agregó 700 µL de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1 v/v) y se agitó por inversión durante 10 min, se centrifugó durante 10 min a 11,500 rpm, se recuperó nuevamente el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo con 600 µL de etanol al 100% previamente enfriado a -20 °C. Se mezcló suavemente 7 veces. Para precipitar el DNA, los tubos se mantuvieron a -20 °C por lo menos 2 h. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 11,500 rpm, después se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 400 µL de agua libre de nucleasas y se incubó en el baño maría a 50 °C durante 15 min para diluir por completo la pastilla de DNA. Para eliminar residuos de compuestos que puedan afectar el proceso de secuenciación, se realizó un lavado adicional con 34 µL de acetato de sodio, 1 mL de etanol al 95% y se mantuvo a -20 °C durante 45 min, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 11,500 rpm, se eliminó el sobrenadante, se le agregó 1 mL de isopropanol al 70 % y se centrifugó durante 5 min a 11,500 rpm. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó hasta que quedó completamente deshidratada; posteriormente se hidrató con 100 mL de

agua libre de nucleasas. La calidad y la concentración del DNA se verificaron en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). El equipo se calibró con 1 µL de agua HPLC, posteriormente se colocó 1 µL de las muestras de extracción. Una vez obtenidas las concentraciones y las calidades se realizó una dilución a 20 ng/µL, la integridad del DNA se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con Gel Red™ (Biotium, USA).

5.3.2 Amplificación de genes ribosomales. Se amplificó la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno (ITS) y parte de la región 28 s de rDNA correspondiente al extremo 5' de la región con los iniciadores ITS5 y NL4 White (1990) y O'Donnell (1998). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25µL (Cuadro 2).

Cuadro 2. Componentes y cantidades de la mezcla para la amplificación por PCR de la región ITS del DNA ribosomal.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	5x	5.0 µL
dNTP's	2.5 Mm	1.0 µL
Primer ITS5	10 pM	0.3 µL
Primer ITS NL4	10 pM	0.3 µL
Taq DNA Polimerasa	5U	0.3 µL
DNA	60-100 ng	5.0 µL
H ₂ O (HPLC)	-----	13.1 µL

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIORAD, USA), con las siguientes condiciones de termociclaje: Un ciclo a 95 °C por 4 min, 35 ciclos a 95 °C, 58 °C y 72 °C por 1 min secuencialmente y luego un ciclo de 72 °C por 4 minutos. Los productos de PCR-ITS se visualizaron en un gel un gel de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red™ (Biotium, USA) para observar la calidad y tamaño del fragmento amplificado.

5.3.3 Amplificación parcial del gen factor de elongación de transcripción (TEF)

Para la amplificación de este gen nuclear se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL (Cuadro 3), con los iniciadores EF1 (5'GACGGATGAGAGAGCAAC 3') Y EF2 (5' GACGGATGAGAGAGCAAC 3') O'Donnell (1998).

Cuadro 3. Componentes y cantidades en la mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen del Factor de Elongación de la Transcripción (TEF)

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	5x	5.0 µL
dNTP's	2.5 mM	1.0 µL
Primer EF1	10 pM	0.3 µL
Primer EF2	10 pM	0.3 µL
<i>Taq</i> DNA Polimerasa	5U	0.3 µL
DNA	60-100 ng	5.0 µL
H ₂ O (HPLC)	-----	13.1 µL

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch, (BIO-RAD, USA). Las condiciones de termociclaje son las siguientes: Un ciclo a 97 °C por 4 min, 35 ciclos a 96 °C, 61 °C y 72 °C por 1 min secuencialmente y luego un ciclo de 72 °C por 7 minutos. El producto final de los fragmentos amplificados se verificaron en geles de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red™ (Biotium, USA) para observar la calidad y tamaño del fragmento amplificado.

5.3.4 Secuenciación de productos de PCR. El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción de secuenciación se realizó con el BigDye Terminator v 3.0 (Applied Biosystems, USA), en un volumen total de 20 µL conteniendo 4.0 µL (2.5 X) de Ready Reaction Premix, 2.0 µL (5X) de BigDye Sequencing Buffer, 4 pM de cada iniciador y 2.0 µL de DNA templado, en ambas direcciones. Para ello se usó un secuenciador Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial de 95 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s y 60 °C por 4 min.

5.3.5 Análisis filogenético. Las secuencias consenso se compilaron en un archivo (formato fasta) y se alinearon con el programa Clustal W, incluido en el software MEGA6 edición 2010. El análisis filogenético se realizó con el método Máxima Parsimonia utilizando las secuencias correspondientes a los genes amplificados con la opción Close Neighbor Interchange (CNI). Con un árbol inicial por adición aleatoria, los espacios y los datos perdidos se consideraron completamente eliminados. Para

determinar los valores de confiabilidad para cada agrupamiento dentro del árbol consenso se realizó un análisis bootstrap con 1000 repeticiones.

5.4 Identificación morfológica

De cada aislado obtenido, se realizaron preparaciones temporales de las estructuras producidas en cada cultivo y se observaron al microscopio compuesto. En el caso de *Fusarium* sp. se usó medio CLA (Carnation Leaf Agar) para producir los conidios. Para los oomicetos como *Phytophthora* se usó medio V8-agar. Se prepararon portaobjetos con raspado de las cepas para la observación de las estructuras de los aislamientos y se procede a la identificación a nivel de género, se basó en el atlas de hongos de semillas y suelo Watanabe (2002) y el manual de laboratorio de *Fusarium* de Summerell y Leslie (2006). Para la identificación de *Phytophthora* se basó en Erwin y Ribeiro (1996).

5.5 Patogenicidad de aislados de hongos y oomicetos

En la exploración regional, a las plantas sintomáticas, se encontraron asociados diferentes hongos y oomicetos; la mayoría de ellos previamente reportados en otros estudios. Sin embargo, el análisis de frecuencias indicó nuevas especies, por lo anterior, las pruebas de patogenicidad se enfocaron a los más frecuentes, y/o no previamente reportados. Para ello, se seleccionó un aislado de cada uno de las especies más frecuentes para realizar los estudios de patogenicidad en plantas de dos tipos de chile en condiciones de invernadero.

5.5.1 Producción de plantas de chile. Se sembraron semillas certificadas de dos tipos de chile, el Jalapeño de variedad, Jalapeño M y Anaheim caloro Joe Parker, en charolas de unicel con sustrato de Peatmoss (Pro-Mix flex) Una vez germinadas, las semillas se fertilizaron cada 2 días con solución nutritiva NPK (solución de N 20%, P₂ O₅ 20% y 20% de K₂O) más Micro elementos. En la etapa de dos hojas verdaderas, las plántulas se trasplantaron en Peatmoss (Pro-mix Flex) estéril en vasos de poliestireno de 1 L en forma individual. A fin de contar con material vegetal en diferentes etapas fenológicas las siembras de la semilla se desfasaron aproximadamente un mes.

5.5.2 Incremento de inóculo. Para la obtención de inóculo, los aislamientos seleccionados se sembraron en caja de Petri con medio czapeck –Dox (BIOXON, USA), para hongos, y medio V8 para oomicetos. Las cajas con los cultivos se incubaron a 23±2 °C por 5 a 10 días en una incubadora.

5.5.3 Producción de zoosporas. De las cepas obtenidas de *P. capsici* se cultivó en jugo V8-agar a 25 °C. Después de cinco días de crecimiento, se obtuvieron 6 discos con un sacabocados de 5 mm y se colocaron en 20 mL de agua destilada estéril en una caja de Petri y se incubaron a 23±2 °C durante 3 días en oscuridad. Para promover la formación y liberación de zoosporas, las cajas se transfirieron a 10 ° C durante 60 min y posteriormente se regresaron a 25 °C durante 90 min. La concentración de zoosporas se determinó con un hemocitómetro y se ajustó a 2000 zoosporas / mL (Sanogo., 2007).

5.5.4 Producción de conidios. La producción de conidios de *Fusarium* sp. y *Plectosphaerella*, se realizó en medios Czapek-Dox contenidos en cajas de petri y se incubaron a 28 °C durante 7 a 10 días. Posteriormente se le agregó agua destilada estéril para colectar el micelio, macro y microconidios. Los conidios, se filtraron en manta cielo y la concentración de conidios se determinó con un hemocitómetro, ajustándose a 1×10^6 conidios / mL (Sanogo, 2007; Leslie et al., 2006).

5.5.5 Inoculación. Para completar dichas pruebas, se usaron plántulas en el estado fenológico de 6 a 8 hojas verdaderas, y una segunda prueba en plantas en la fase de floración, con 1 a 3 botones florales, aproximadamente de 2 meses de edad. Las plantas se inocularon agregando 5 ó 10 ml de suspensión de inóculo previamente ajustado a una concentración de 1×10^6 conidios / mL. Dicha concentración se colocó en la parte superior del sustrato en cada maceta alrededor de la base de cada planta. Previamente de agregar la suspensión se realizó una ligera herida de aproximadamente 0.25 cm en el cuello (base del tallo) de la plántula usando un escalpelo estéril (Fig. 6). Se aplicó riego a cada plántula antes de la inoculación.



Figura 6. Proceso en la inoculación de las plántulas para las pruebas de patogenicidad; **a) y b)** conteo de conidios y zoosporas con un hemocitómetro y microscopio compuesto de luz. **c)** Ajustando la solución de inóculo a 1×10^6 conidios/mL., **d) y e)** aplicación de 5-10 mL de la solución de inóculo al cuello de las plántulas.

5.5.6 Efecto de la inoculación secuencial de aislamientos de hongos y oomicetos en el desarrollo de síntomas de marchitez del chile

Con el fin de conocer el efecto de la inoculación secuencial de *P. capsici*, *F. oxysporum*, y *Plectosphaerella cucumerina*, aislados de la corona y del sistema vascular de chile, en la severidad de la enfermedad y el tiempo a la muerte de la plántula, los tres patógenos se inocularon en diferente orden en la misma planta como se indica en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos utilizados para las pruebas de patogenicidad y la inoculación secuencial de tres especies asociadas a la marchitez del chile durante el periodo Verano-Otoño 2013 y 2014 en los municipios productores del chile en el estado de Michoacán, México.

Variedades *	Intervalo de Inoculación	
	0 días	4 días
<i>Fo</i>	-	-
<i>Phc</i>	-	-
<i>Plc</i>	-	-
<i>Plc</i>	<i>Fo</i>	<i>Phc</i>
<i>Plc</i>	<i>Fo</i>	<i>Phc</i>
<i>Fo</i>	<i>Phc</i>	<i>Plc</i>
<i>Phc</i>	<i>Plc</i>	<i>Fo</i>
<i>Fo</i>	<i>Plc</i>	<i>Phc</i>
<i>Phc</i>	<i>Fo</i>	<i>Plc</i>
<i>Plc</i>	<i>Phc</i>	<i>Fo</i>

Fo= *Fusarium oxysporum*; **Phc**= *Phytophthora capsici*; **Plc**= *Plectosphaerella cucumerina*. *Las inoculaciones se realizaron en chile Jalapeño y tipo Anaheim de 30 días de edad.

5.6 Tratamientos y diseño experimental. Las inoculaciones de los hongos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo de tratamientos en un factorial, y como factores a los tipos de chile (Anaheim y Jalapeño) y los inóculos (*P. capsici*, *P. cucumerina*, *F. oxysporum* y agua), con mediciones repetidas de la severidad cada 4 días hasta el día 24 después de la inoculación. Se usaron 10 plantas por combinación y cada planta representó una repetición. En el experimento de la inoculación secuencial se

evaluaron 7 secuencias de inóculo a intervalos de 4 días, en los dos tipos de chile, y se tomaron datos de severidad cada 4 días hasta el día 28 después de la inoculación. En ambos experimentos se evaluó la severidad de la enfermedad cada 4 días con base en la escala propuesta por Sanogo (2006) en la siguiente manera: **0** = no hay síntomas visuales de la enfermedad, **1** = necrosis en la base del tallo, **2** = marchitez y **3** = planta muerta. Asimismo se tomó en cuenta el día a la muerte de la planta considerada esta como marchites irreversible.

5.7 Análisis de datos. Considerando que se tuvo se uso un arreglo de tratamientos en factorial, con mediciones repetidas de severidad en una escala ordinal, se realizó un análisis no paramétrico de un diseño factorial con mediciones repetidas. Para el análisis estadístico primeramente se calcularon las medianas por cada tratamiento, así como el rango medio (Mean Rank) de los tratamientos. Con base en estos datos se realizó un Análisis tipo Anova (Anova Type Statistic) y posteriormente se estimó el Efecto Relativo del Tratamiento (RTE), y su intervalo de confianza (95%), tanto de los efectos principales y de sus interacciones usando para ello los macros F2_LD y LD_CI para SAS, reportados por Brunner et al. (2002). Todos los análisis se realizaron en SAS (SAS Institute, Cary, NC. ver 9.3, Cary).

VI.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en el Bajío Michoacano

De las 246 Plantas procesadas en las 2 temporadas de producción, los datos indicaron que el 33% correspondieron a oomicetos y 67% a hongos. La identificación filogenética indicó que los hongos correspondieron a los géneros *Fusarium* spp., *Phytophthora* sp., *Plectosphaerella* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Pythium* sp. La figura 7 muestra la amplificación de la región ITS del rDNA de 500 pb aproximadamente.

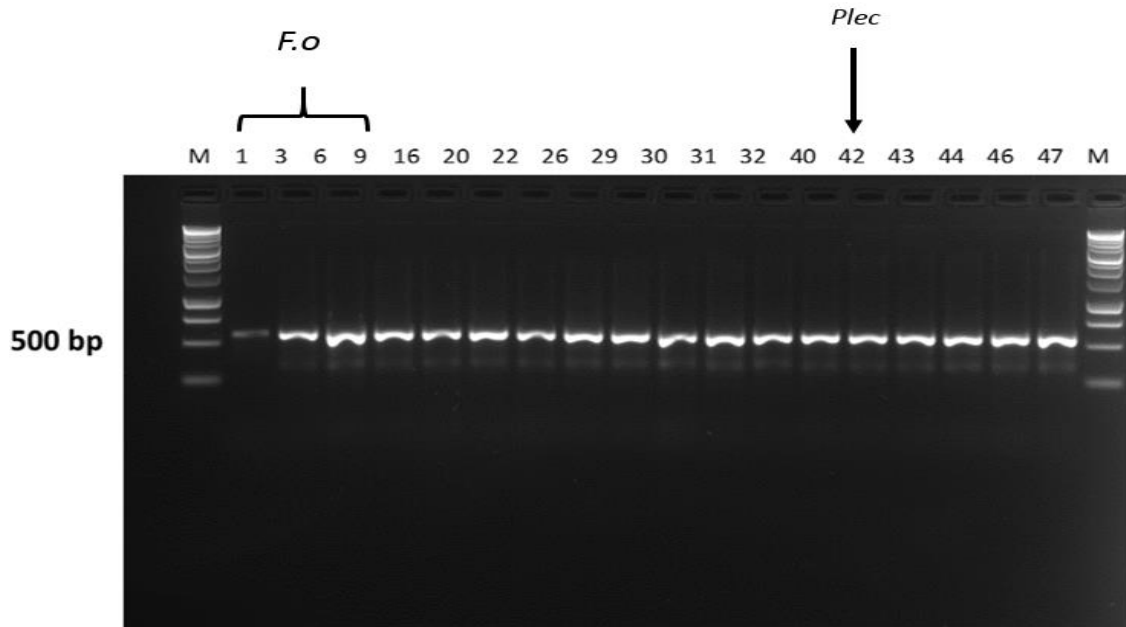


Figura 7. Gel de agarosa revelando fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases (pb) del producto de PCR de la región ITS amplificado del DNA de hongos . Marcador de peso molecular de 1 kb. Las muestras 1,3, 6 y 9 son algunos ejemplos de las

amplificaciones de *F. oxysporum* (*F.o*), en tanto que la muestra 42 correspondiente a *Plectosphaerella cucumerina* (*Plec*).

La comparación de las secuencias con las depositadas en el GenBank indicó que los aislamientos obtenidos pertenecieron a las especies *P. capsici*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equisetii*, *Pythium* spp., y *Rhizoctonia solani* con 99% a un 100% de máxima identidad. Estas especies ya habían sido previamente reportadas por Velásquez et al., (2000), Velásquez (2001) en la región Norte-Centro de México, Vásquez (2009) en el estado de Oaxaca y Pavia et al., (2010) en Chihuahua, pero no en la región de estudio. Asimismo Babay-Ahari (2009) en Irán, las reporta asociados al mismo síntoma en el cultivo del chile. Además de los organismos anteriormente mencionados, también se identificó a *Plectosphaerella cucumerina* con 99% y 100% de máxima identidad. Este es el primer reporte de esta especie en México, asociada a la marchitez del chile en un 3% de las muestras. Carlucci (2012) en Italia y Xu (2014) en China lo han identificado asociado a la pudrición del cuello de cultivos de la familia solanácea y cucurbitácea como es el caso de tomate, melón, y pepino, pero no se había reportado en Chile.

Las especies identificadas y su frecuencia de aislamiento se indican en la figura 8.

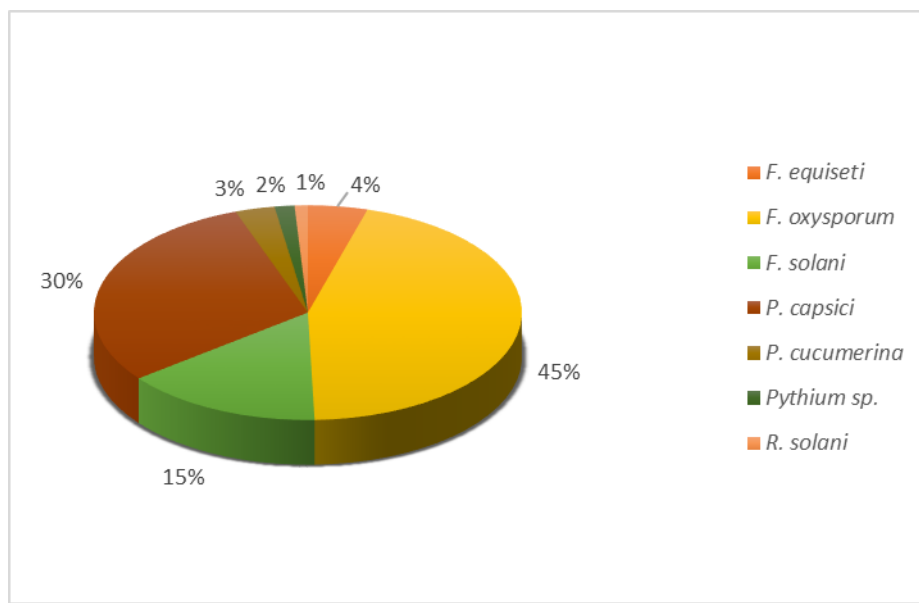


Figura 8. Proporción de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del Chile en Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa en el estado de Michoacán, con base en la identificación filogenética. La figura representa una muestra de 200 cepas seleccionadas de un total de 492 aislamientos obtenidos de muestreos durante el periodo Verano-Otoño 2013 y 2014.

Como se observa en la figura anterior la mayor proporción de aislamientos correspondieron a *F. oxysporum* y *P. capsici* con frecuencias de 45% y 30 % respectivamente, mientras que *Pythium spp.* y *Rhizoctonia solani* solo alcanzaron frecuencias de 2% y 1% respectivamente. Es probable que la baja frecuencia de *Pythium spp.* se deba a que en su mayor parte, las muestras se obtuvieron de plantas de más de un

mes después del trasplante, hasta aquellas que ya estaban en producción. De acuerdo con Hussain (2011), *Pythium* es un oomiceto que ataca principalmente a plántulas ocasionando ahogamiento. En tanto a *R. solani*, el 1% de frecuencia es probable que se deba a que los aislamientos para esta investigación se obtuvieron del sistema vascular de la planta, removiendo la corteza, previo al procesamiento de la muestra. Se ha observado que este hongo normalmente afecta a la corteza de la raíz y cuello por lo tanto, dado el bajo porcentaje de aparición, y debido a que previamente había sido reportado en múltiples ocasiones, no se consideró para las pruebas de patogenicidad (Hall, 1991)

Como se indica en la figura 9 a la marchitez del chile se asoció con mayor frecuencia a *F. oxysporum* y *P. capsici*. En el primer caso, *F. oxysporum* se concentró principalmente en las raíces y en menor proporción en el cuello de la planta, mientras que *P. capsici*, se aisló principalmente del cuello de la planta, a nivel del suelo.

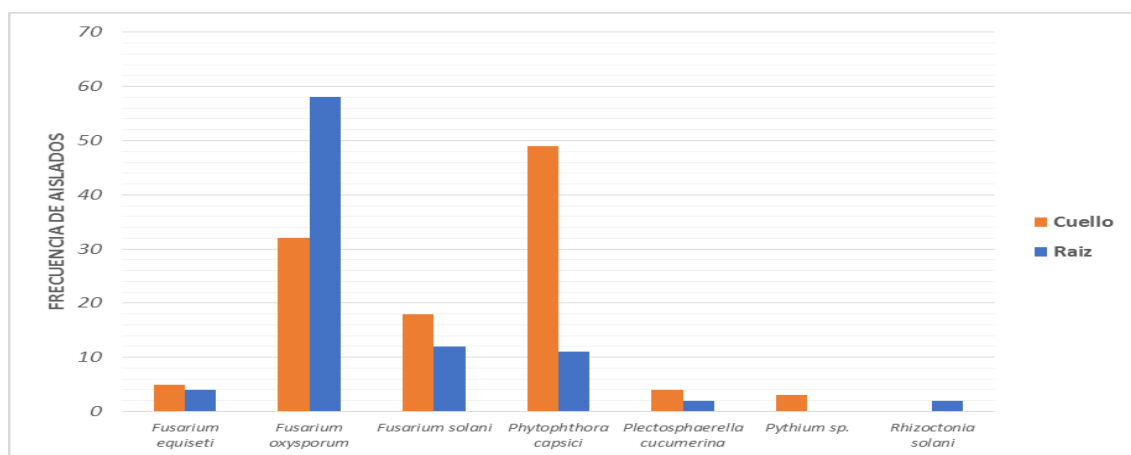


Figura 9. Distribución de frecuencia de los hongos y oomicetos encontrados asociados a la marchitez del chile en el raíz y cuello de las plantas muestreadas en Verano-Otoño

2013 y 2014 en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa del estado de Michoacán, México.

Todos los hongos y oomicetos se presentaron en ambas secciones de la planta (raíz y cuello) con excepción de *Pythium* sp. en cuello y *R. solani* en raíz. *F. oxysporum* se presentó con más frecuencia en raíz que en cuello; en cambio se observó una diferencia de comportamiento con *F. solani* y *F. equiseti*, los cuales se aislaron con más frecuencia en el cuello de la planta. *P. capsici* y *P. cucumerina* se presentaron con más frecuencia en el cuello de las plantas sintomáticas. Esta distribución coincide con Velásquez (2001) para las especies de *P. capsici*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equisetii*, *Pythium* spp., y *R. solani*, y es similar a lo previamente reportado por y Abad (1999), Carlucci (2012) y Xu (2014), para *P. cucumerina* en el cultivo de tomate y melón.

6.2 Filogenia de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en el bajío Michoacano

Los resultados indicaron que los aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos de las plantas sintomáticas, formaron un solo clado, separando claramente a las demás especies de *Fusarium* spp. (Fig. 10). El hongo *P. cucumerina*, claramente se separó de las diferentes especies de *Fusarium* spp. encontradas. Esta especie ha sido recientemente reportada causando marchitez en cultivos como tomate y melón Carlucci (2012) y Xu (2014).

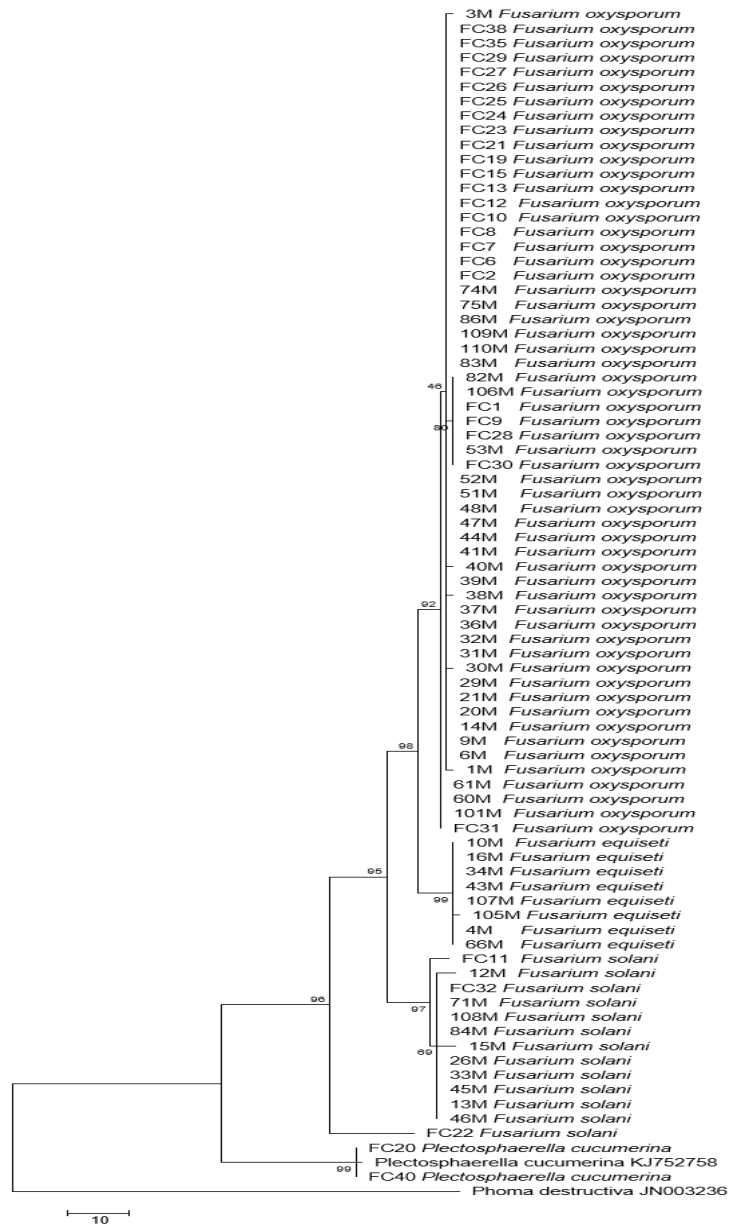


Figura 10. Árbol filogenético construido por el método máxima parsimonia de la región de ITS (Espacio transcrito interno). La amplificaciones provienen de DNA extraído por el método de CTAB de hongos aislados de plantas con síntomas de marchitez

colectadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista hermosa, en Michoacán durante el Verano–Otoño 2013 y 2014.

Por otro lado, como se aprecia en la figura 11, todos los aislamientos de *P. capsici*, se agruparon en un solo clado, excepto por el aislamiento OC19, lo cual podría indicar una posible mutación en la especie considerando que *P. capsici* un complejo de especies.

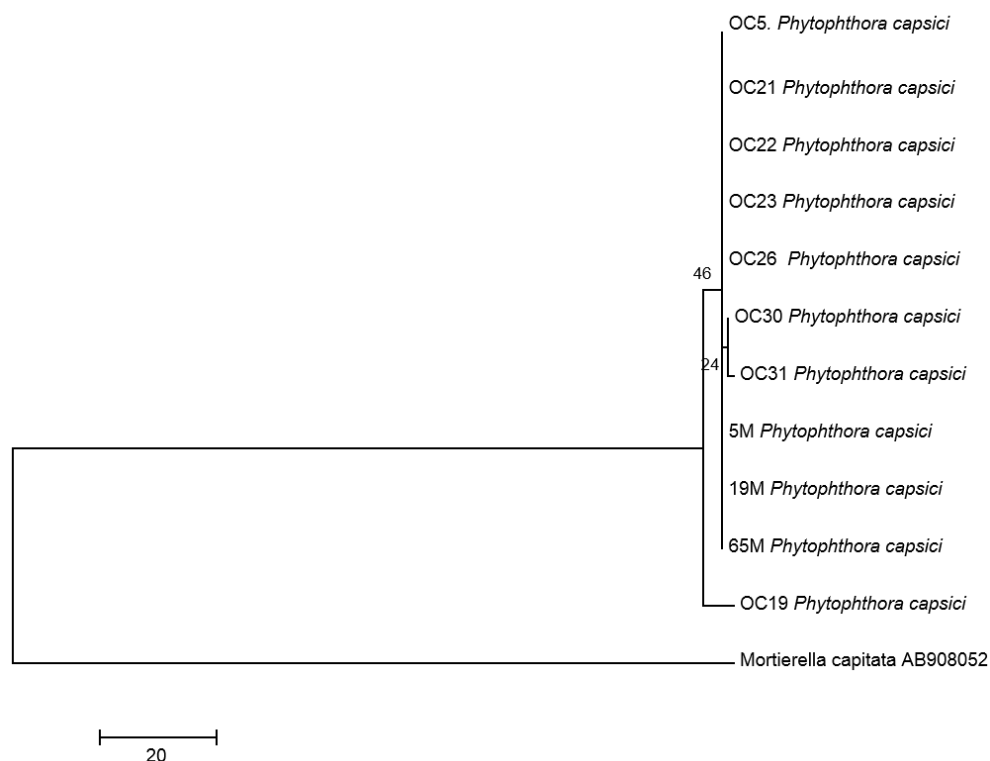


Figura 11. Árbol filogenético construido por el método máxima parsimonia de la región de ITS (Espacio transcrito interno). La amplificaciones provienen de DNA extraído por el método de CTAB *Phytophthora capsici* aislados de plantas con síntomas de marchitez colectadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista hermosa, en Michoacán durante el Verano–Otoño 2013 y 2014.

6.3 Diagnóstico de hongos y oomicetos de mayor frecuencia asociados a la marchitez del chile en el Bajío Michoacano-Ciénega de Chapala

6.3.1 *Phytophthora capsici*. La identificación de *Phytophthora* se basó principalmente en la morfología de los esporangios. La colonia en medio de cultivo V8 exhibió color blanco, micelio algodonoso formando estrellas; hifas cenocítico y torulosas, esporangios piriformes con una o dos papilas, de $35.42\text{-}48.83 \times 25.30 - 33.88\mu\text{m}$; oosporas café, diámetro de $29.16\text{-}33.77\mu\text{m}$ (Fig. 12). Estas características coincidieron con los descritos por Waterhouse (1963) y Erwin y Ribiero (1996). Asimismo el análisis filogenético y la comparación de las secuencias de la región ITS indicó 99% de máxima identidad con la secuencia de *P. capsici* con número de accesoión HQ261517.

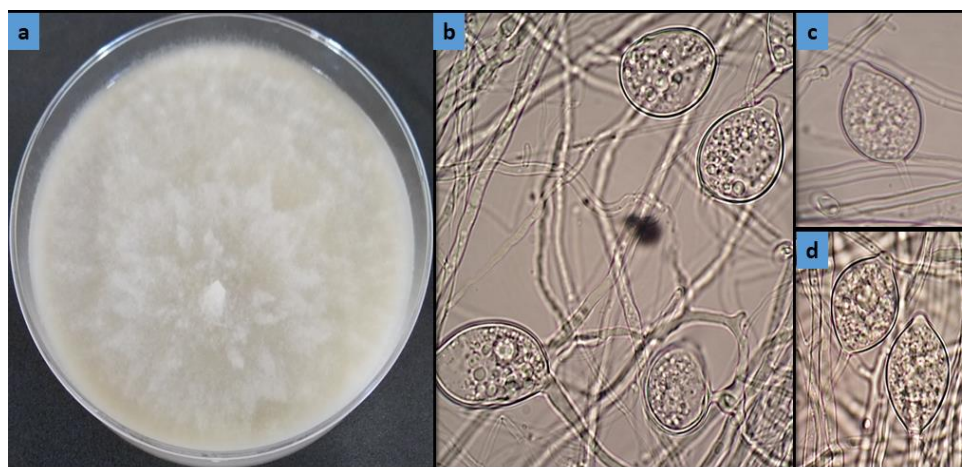


Figura 12. a) Crecimiento de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo V8 , b), c) y d) Preparación microscópica de hifas y esporangios en ácido láctico observado por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con cámara de Samsung HD de 16 mega pixeles 5X.

6.3.2 *Fusarium oxysporum*. La colonia en PDA exhibió pigmentación de color rosada y micelio algodonoso. Microconidios amerosporas hialinos, elipsoides de $4.97 - 8.56 \times 2.8 - 3.2 \mu\text{m}$, no en cadenas, formados en macro fialides en cabezas falsas en fialides laterales, simples y cortos. Macroconidios fragmosporas hialinos, de tres a cinco septas con forma de luna, células apicales ligeramente agudas y célula basal en forma de pie de $30.88-39.56 \times 3.87 - 4.08 \mu\text{m}$; clamidosporas intercalares (Fig. 13). Estas características coincidieron con las descritas por Booth (1971), Nelson et al. (1983) y Burgess et al. (1994). *F. oxysporum*, ha sido previamente reportado asociado a la marchitez del chile en México conjuntamente con *P. capsici* desde 1967 y García (1971), y más recientemente Vásquez (2009) .

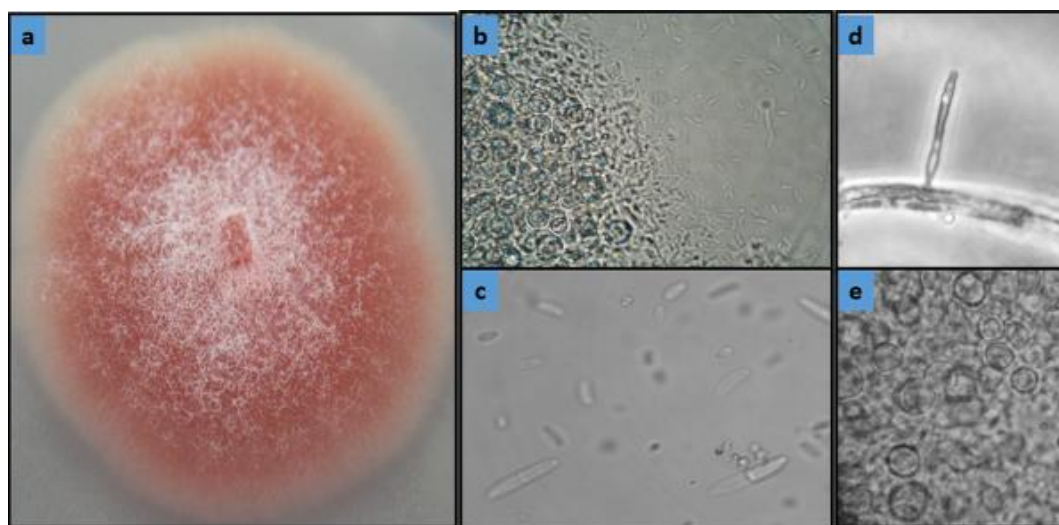


Figura 13. a) Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo PDA. b), c), d) y e) preparación de clamidosporas, fialides, microconidios y macroconidios en ácido láctico observado por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con cámara de Samsung HD de 16 mega pixeles 5X

6.3.3 *Plectosphaerella cucumerina* (*Plectosporium tabacinum*). Las colonias en medio de cultivo PDA son rosa salmón, el micelio mucilaginoso, aéreo escaso o ausente. Las ascosporas hialinas, lisas, de pared delgada, elipsoide, ambos extremos redondeados, una septa, 10.5 a 14 × 2.5-3 µm. Micelio hialino, ramificado, septado, formando bobinas de hifas en PDA, con fiálides producidos a partir de las bobinas. Los conidióforos solitarios, no ramificados o raramente, irregularmente ramificados, hialinos y paredes finas. Células conidiógenas fialídicas, determinada, discreta, hialinas, lisas solitarias, de vez en cuando una septa, cerca de la base, cilíndricas rectas, a veces torcida o sinuoso, en ocasiones formando una rama justo por debajo del ápice, disminuyendo gradualmente hacia la ápice, 10-35 µm (figura 14).

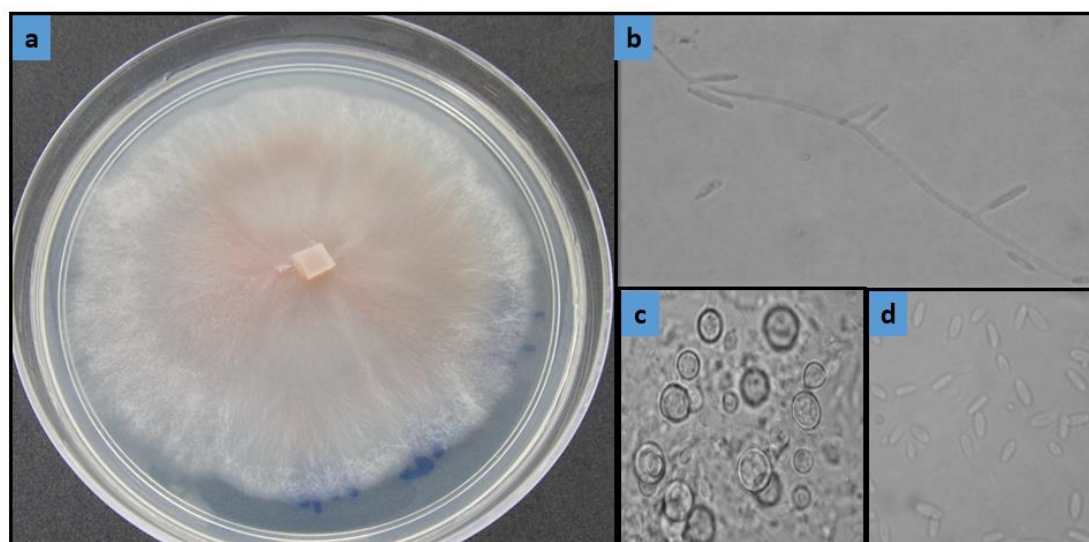


Figura 14. a) Crecimiento de *Plectosphaerella cucumerina* en medio de cultivo PDA. **b), c) y d)** observación de micelio, clamidosporas y microconidios inmersos en ácido

láctico. Las observaciones se realizaron por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con camera de Samsung HD de 16 mega pixeles 5X.

La agregación de los conidios en cabezas viscosas, elipsoidal, disminuyendo gradualmente hacia el ápice redondeado y base, más ancha en el medio, hialina, suave, de paredes delgadas, septadas o aseptados, conidios $6-8 \times 2.03$ a $03.06 \mu\text{m}$ (Palm et al., 1995).

Plectosporium se ha descrito como el nuevo género para *F. tabacinum* (Sinónimo: *Cephalosporium tabacinum*), anamorfo de *Plectosphaerella cucumerina*. El género está caracterizado por una colonia húmeda y conidióforos simples o ramificados.

Plectosporium tabacinum anamorfo del *P. cucumerina* está ampliamente distribuido en varios cultivos de los Países Bajos, entre ellos tomate, melón, esparrago y pimiento. Fue descrito por primera vez por Van Beyma (1933) en aislamientos de pepino y posteriormente en tabaco como *Cephalosporium tabacinum*.

Palm et al. (1995) observaron importantes variaciones morfológicas entre cepas de *Pl. cucumerina*, considerando que esto podría indicar un complejo de especies. Los estados asexuales de *Plectosphaerella* se diferencian en base al proporción de conidios septados, la presencia o ausencia de clamidosporas (Pitt et al. 2004), la forma de conidios (Antignani et al. 2008) y sus dimensiones (Duc et al. 2009), junto con sus datos de secuencia de ITS.

Desde la introducción de *Plectosporium* para anamorfos de *Plectosphaerella*, tres especies adicionales se han descrito en este género. Pitt *et al.* (2004) transfirió *Rhynchosporium alismatis* a *Plectosporium* Antignani *et al.* (2008) *Plectosporium delsorboi* y Duc *et al.* (2009) *Plectosporium oratosquillae* mantis que infectan camarones en Japón. (Xu *et al.* 2013) se reportaron a *P. cucumerina* afectando a tomate en china, este hongo se ha asociado a plantas con achaparramiento, con hojas inferiores cloróticas, raíces necróticas y con una menor producción de raíces secundarias y posteriormente la muerte de la planta. Estos síntomas fueron previamente reportado en Italia y España para otros cultivos como melón, lechuga y tomate por (Abad, 1999, Chilosí 2008 y Carlucci 2012).

6.4 Patogenicidad de hongos/oomicetos asociados a la marchitez del chile

Inoculaciones simples. Los resultados de las inoculaciones indicaron que los aislados de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *P. cucumerina* (*F. tabacinum*) fueron patogénicos a los dos tipos de chile (Jalapeño y Anaheim). Como se observa en la figura 15 las plántulas inoculadas con *P. capsici* iniciaron con una ligera flacidez de la hoja como si fuera un falta de agua dos días después de la inoculación, la flacidez se intensificó, pero las hojas se mantenían verdes, también se observó ahogamiento progresivo del cuello de la plántula y posteriormente su muerte. Estos síntomas son similares a los descritos por Velásquez (2001).



Figura 15. Síntomas observados en las pruebas de patogenicidad para las cepas de *Phytophthora capsici* aisladas de plantas muestreadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa, Michoacán, México.

Asimismo, los síntomas ocasionados por *F. oxysporum* (Fig. 16), fueron los que iniciaron a los ocho días después de inoculación con un ligero amarillamiento en la hoja, luego una flacidez ligera que intensificó hasta marchitez total. Lo cual coincide con los descritos por Velázquez 2001).



Figura 16. Síntomas observados en las pruebas de patogenicidad para las cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de plantas muestreadas en los municipios de Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa, Michoacán, México.

De manera similar, se observaron los síntomas de las plántulas inoculados con *P. cucumerina*, los síntomas se mostraron como un retraso en crecimiento de las plántulas y hojas cloróticas seguido por pudrición del cuello y posteriormente la muerte de la planta en 20 a 24 días después de inoculación (Fig. 17). Estos síntomas son muy similares a los descritos por Xu (2014) en el cultivo de tomate.

En todos los casos, el re-aislamiento de los patógenos de las plantas sintomáticas, completó las pruebas de patogenicidad.



Figura 17. Progreso de síntomas en raíz y cuello de la enfermedad de marchitez del chile como se observaron en las pruebas de patogenicidad para *P. cucumerina* (*P. tabacinum*). Flecha mostrando área de daño causado por el patógeno. a) Raíz sana de plantas testigo; b, c, d y e muestran el progreso de síntomas de ahogamiento en cuello y poco desarrollo de raíz hasta la muerte de la planta.

Por otro lado, cuando se realizó la inoculación de plantas al inicio de floración, para el caso de *P. capsici*, los síntomas fueron similares, pero se presentaron a partir de ocho días después de inoculación como una flacidez progresiva de la hojas, lesiones cafés en el cuello. Aunque la planta se marchitó no hubo defoliación ni caída de frutos.

En las plantas inoculadas con *F. oxysporum* síntomas que iniciaron con un amarillamiento y flacidez de las hojas, pudrición de raíz y también provocó la caída de

hojas, flores y frutos. Los síntomas de *Pl. cucumerina* se comportó de manera tal de un amarillamiento y flacidez de las hojas y una pudrición progresiva de raíz y cuello hasta la muerte de la planta.

El análisis tipo Anova para comparar el efecto de diferentes inóculos y las respuestas de los tipos de chile en relación a severidad en diferentes tiempos en las inoculaciones de plántulas con los patógenos de forma separada, indicó que la interacción entre el inóculo y el tipo de chile, en los diferentes evaluaciones no fue significativo ($P=0.16$). La interacción entre los tipos de chile e inóculo, de manera similar no fue significativa ($P=0.9$), pero si en el tiempo, producto de la falta de significancia de los tipos de chile (Cuadro 1 del anexo 1), indicando que los dos tipos de chile, respondieron de manera similar a los diferentes tipo de inóculo de manera general. Sin embargo, si hubo diferencias entre inóculos ($P=0.0001$), indicando que dependiendo del tipo de inóculo, será el nivel de severidad. Al respecto, en los cuadros 2 y 3 del anexo 1 se observa que con base en la mediana de severidad, rango medio y efecto relativo de los tratamientos (inóculos) la especie como mayor virulencia (severidad) y agresividad (días a la muerte de las plantas), fue *P. capsici*, pues en el caso del chile tipo Anaheim, al día 16 después de la inoculación, el rango medio fue de 506 y un efecto relativo de 0.90 comparado con los demás especies y el testigo sin inocular. En comparación con *F. oxysporum* y *Pl. cucumerina*, la muerte de las plantas se inició al día 24 y 20, respectivamente, con un menor valor del rango medio, y efecto relativo si se toma en cuenta los mismos días, en comparación con *P. capsici*, es decir, las plantas en estos últimos patógenos murieron de 4 a 8 días después que aquellas inoculadas con *P. capsici*. Aunque la tendencia en la

mediana, rango medio efecto relativo del tratamiento fue similar en ambos tipos de chile, los datos sugieren que el chile Anaheim, tiende a ser más susceptible a *F. oxysporum*, no así a *P. cucumerina*. Al respecto, Silva-Rojas *et al.*, (2009), Pérez-Moreno *et al.* (2003); Rodríguez-Moreno *et al.*, (2004) sugieren que en general, *P. capsici*, tiende a ser más agresiva quizá por la una reproducción sexual que da origen a variación genética. Para el caso de *P. cucumerina*, aunque siendo menos agresiva frente los diferentes tipos de chile, esta especie es patogénica para este cultivo, como lo menciona Carlucci, (2012), Ramos (2013), y Abad (1999)

Por otro lado, cuando se realizó la inoculación de plantas de ambas variedades en inicio de floración, el análisis tipo ANOVA, indicó una interacción significativa entre el inóculo y los tipos de chile ($P=0.00001$), y el factor tiempo. Es decir, la respuesta fue diferente en los diferentes tiempos de evaluación. Los valores de la mediana, rango medio y efecto relativo del tratamiento se muestran en el Anexo 1. De manera similar a lo explicado previamente en la inoculación en plántulas de un mes, nuevamente *P. capsici*, tuvo en general un valor mayor de la mediana, rango de severidad y efecto relativo, en comparación con los demás inóculos y el testigo, pero los valores de severidad fueron ligeramente menores. No así con *F. oxysporum*, el cual al día 24 alcanzó valores máximos. Es probable que la edad de la planta inoculada y la etapa fenológica de floración haya influido en la susceptibilidad a dicho patógeno. Por el contrario, *P. cucumerina*, no alcanzó los valores máximos de severidad es esta etapa, pues en general solo manifestó amarillamientos, y retraso en el crecimiento, al día 24. Es

posible que de haberse dejado más tiempo, las plantas habrían alcanzado los valores máximos de severidad y quizá la muerte.

6.5 Efecto de la inoculación secuencial de patógenos asociados al desarrollo de síntomas

El análisis tipo ANOVA, indicó que la interacción entre secuencias de inoculación de las diferentes especies con el factor tipo de chile, no fue significativa ($P=0.29$), pero si hubo una respuesta diferente en los diferentes tiempos de evaluación de los tratamientos, evidenciado por la significancia del tiempo ($P=0.0000$). El factor secuencias de inóculo fue significativo ($P= 0.0000$) indicando que hubo diferencias significativas entre tipos de secuencias de inóculo.

Como se observa en el cuadro 2 del Anexo 3, las secuencias de patógenos que iniciaron con *P. capsici*, tuvieron un mayor efecto, evidenciado por la mediana de severidad, y el efecto relativo del tratamiento, independientemente de qué patógeno se inoculó después de este, y del cultivar. Asimismo, el mismo cuadro indica que cuando *P. capsici*, se inoculó después de *F. oxysporum* (4 días después), el efecto resultó en muerte de las plantas a día 28. Sin embargo, no sucedió de esta manera cuando, *P. capsici*, se inoculó después de *Pl. cucumerina*. En este caso los valores del efecto relativo del tratamiento, rango y mediana de severidad, fueron en general más bajos con respecto a cuándo se inoculó primero *P. capsici* (cuadro 2 del Anexo 3). De hecho, la severidad de la enfermedad se mantuvo en un nivel bajo, como amarillamiento de las hojas, ligeramente

diferente del testigo. También resultó interesante observar que cuando las plantas se inocularon con *F. oxysporum* seguidas de *P. cucumerina*, estas no murieron hasta el día 28 después de la inoculación. Es probable que en los dos casos, *P. cucumerina* haya disparado mecanismos de resistencia que pudieran haber interferido en la infección de *P. capsici* y *F. oxysporum*, pero estos aspectos y la parte histológica para comprobar la infección de cada patógeno por separado, no se abordó. Estudios realizados por Sanogo (2007) y Bano (2012) sugieren que inoculaciones posteriores a la infección un patógeno previo, podrían activar mecanismos que contribuyan a retrasar el desarrollo de la enfermedad, o disminuir la severidad de la misma.

Comparando los datos del experimento de inoculación simple y en secuencia, es posible notar, que de acuerdo con los datos de los cuadros 1 y Anexo 3 que cuando la inoculación de los patógenos se realiza de manera simple (solos), la severidad de la enfermedad tiende a ser mayor y se acelera la muerte de las plantas. Por ejemplo, cuando *P. capsici* se inoculó solo, las plántulas murieron entre 12 y 16 días después de la inoculación; aquellas inoculadas con *F. oxysporum*, murieron entre 20 y 24 días después de la inoculación, y para el caso de *P. cucumerina*, la muerte de las plántulas ocurrió entre 20 y 24 días después de la inoculación. Por el contrario, cuando la secuencia inició con *P. capsici*, seguida de *F. oxysporum* o *P. cucumerina*, las plantas murieron entre los 24 y 28 días después de la inoculación. En el caso de aquellas que se inocularon con *F. oxysporum* seguidas de *P. cucumerina*, o *P. cucumerina* seguida de *F. oxysporum*, o *P. capsici*, las plantas murieron en el tiempo de evaluación (28 días después de la inoculación).

Lo anterior es un indicativo de que dependiendo de la composición de inóculo en el suelo, y tipo de inóculo que infecta primero, así como las infecciones posteriores, la respuesta en términos de la intensidad de la enfermedad será variable, dando origen a una epidemia que alcance en poco tiempo una severidad máxima o se mantenga en niveles de severidad tolerables, sin alcanzar necesariamente el punto máximo de marchitez. De acuerdo con Whipps (2000) la presencia de diferentes microorganismos en la rizosfera de una planta tiende de influir (disminuir o incrementar) la epidemia de un patógeno, lo cual es atribuida a varios tipos de interacción (activación de mecanismo de defensa, antibiosis, competencia o micoparasitismo). Asimismo, se ha demostrado que las enzimas β -1,3 glucanasa y peroxidasa se producen durante el ataque de *P. capsici* Wang (2013) Sanzón (2012) y *Pl. cucumerina* Ramos (2013), las cuales podrían tener alguna influencia en los resultados en la inoculación secuencial.

Los resultados obtenidos en este experimento abren al puerta a futuros estudios básicos relacionados con las respuestas de la planta de chile a infecciones secuenciales y su efecto en la intensidad de la enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

1. Los hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en el Bajío Michoacano-Ciénega en Michoacán, México fueron en orden de importancia: *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Pythium* sp.
2. Los hongos y oomicetos aislados fueron identificados en la raíz y cuello de la planta con diferentes frecuencias. *Pythium* sp. y *Rhizoctonia solani* se aislaron del cuello y raíz respectivamente. Por el otro lado *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti* y *Plectosphaerella cucumerina* fueron identificados en raíz y cuello.
3. Mediante esta investigación se pudo confirmar con técnicas moleculares y morfológicas la presencia de especies previamente identificadas asociados con la marchitez del chile. Además se pudo identificar a una nueva especie, *Plectosphaerella cucumerina* (*Fusarium tabacinum*), asociado a la marchitez del chile, siendo este el primero reporte en chile en México.
4. En la prueba de patogenicidad, no hubo diferencia significativa entre los tipos de chile empleados en las prueba ($P=0.16$). Sin embargo, si hubo diferencias significativa entre inóculos ($P=0.0001$). Se pudo observar una variación en virulencia y agresividad de los patógenos, ya que plantas inoculadas con *P.*

capsici murieron 16 días después de inoculación mientras que *F. oxysporum* murieron en 24 días y *P. cucumerina* en 20 días.

5. En la inoculación secuencial, plantas inoculadas primero con *P. capsici* murieron en 28 días o menos. Sin embargo cuando las plantas se inocularon con *F. oxysporum* o *P. cucumerina* y después *P. capsici* las plantas no murieron durante en el período de evaluación.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abad, P., Pérez, A. M., Márquez, M. J., Vicente, B. D., Bruton, J., & García, J. (2000). Assessment of vegetable compatibility of *Acremonium cucurbitacearum* and *Plectosphaerella cucumerina* isolates from diseased melon plants. EPPO Bulletin 30, 199-204.
- Berger, S.; Sinha, A. K., & Roitch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. Journal of Experimental Botany. <http://jxb.oxfordjournals.org>
- Bosland, P.W. (1992). Chiles. History, cultivation and uses. En: Species, herbs and edible fungi. Charambous. Elsevier Pub. N.Y., 347-366.
- CABI. (2010). Crop Protection Compendium. Global module. Software. Wallingford, UK.
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J., & Phillips, A. J. L. (2012). *Plectosphaerella* species associated with root and collar root of horticultural crops in southern Italy. Personia 28, 34-48.
- Castro, R. A., Fernández, P. S. P., & Osuna AP. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum*- *Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Fitopatología, 30, 49-65.
- Chilosi, G., Reda, R., Aleandri, M. P., Camele, I., Alteri L., Montuschi, C., Languasco, L., Rossi, V., Agosteo, G. E., Macri, C., Carlucci, A., Lops, F., Mucci,

- M., Raimondo, M. L., & Frisulio, S. (2008). Fungi associated with root rot and collapse of Melon in Italy. *EPPO Bulletin*, 38, 147-154.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue, *Focus*, 12, 13-15.
 - Galindo, A. J. (1962). Marchitez de las plantas de chile causada por *Phytophthora capsici* Leonian. *Revista Mexicana Fitopatología*, 1, 15-17.
 - Gil, O. R., Palazón, E. C., & Cuartero, Z. J. (1992). Genetic relationships among four pepper genotypes resistant to *Phytophthora capsici*. *Plant Breeding*, 108, 118-125.
 - González, P. E, Yáñez, M. J., Santiago, S. V., & Montero, P. A. (2004). Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, en Verde, Puebla. *Agrociencias*, 38, 653-661.
 - Guigón, L. C., & González, G. 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.
 - Hussain, F. A. M. (2011). Pest and Disease of Chilli crop in Pakistan: A review. *International Journal for Biotechnology*, 8(2), 325-332.
 - Jonathan, D. G. J., & Jeffery, L.D. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
 - Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J.C., & Stalpers, J.A. (2001). *Dictionary of the Fungi*. CAB International. UK.

- Laborde, C. A. & Pozo, C. O. (1984). Presente y pasado del Chile en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA), México, 80p.
- Laborde, C. J. A. & Pozo, C. O. (1984). Presente y pasado del chile en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. 80p.
- Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 12, 401-408.
- Mendoza, Z. C. (1996). Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Parasitología Agrícola, México, 85p.
- Mendoza, Z. C. (1999). Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. In: Hortalizas: Plagas y Enfermedades, Ed. Trillas, Mexico, D. F. 25-63p.
- Nelson, E. P., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification, The Pennsylvania State University Press, USA, 193p.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Cook, R. J. (1981). *Fusarium*: disease, biology, and taxonomy, The Pennsylvania State University Press, USA, 457p.
- Nuez, V. F., Gil, O. R., & Costa, G. J. (2003). El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies, Mundi Prensa, Barcelona, Madrid, España. 607pp.
- Palm, M. E., Gams, W., & Nirenberg, H. (1995). *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycology*, 87, 397-406.

- Panja, B. N., Das, A., Mazumdar, P., & Saha, J. (2011). Virulence prediction of *Rhizotonia solani* Kuhn isolates based on pathogenic and cultural variability. *Journal of Mycopathology*, 49, 247-255.
- Pérez, M. L., Duran, O. L.J., Ramírez, R., Sánchez, P. R., & Olalde, P. V. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21,19-25.
- Ramos, B., González, M. P., Sánchez, V. A., Sánchez, R. C., López, G., & Molina, A. (2013). Functional genomics tools to decipher the pathogenicity mechanisms of the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina* in *Arabidopsis Thaliana*. *Molecular Plant Pathology* 14(1), 44-57.
- Redondo, J. E. (1974). Estudio preliminar en la obtencion de posibles plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas del hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Tesis de maestría Escuela nacional de agricultura. Colegio de posgraduados, Chapingo, Mexico. 52p.
- Rodríguez, V. M., Luna, R. J. J., Valle, G. P., Tiscareño, L. M., & Ruiz, C. 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.
- Sanogo, S. (2007). Interactive effect of two soilbourne pathogens, *Phytophthora capsici* and *Verticillium dahlia*, on Chile pepper. *Phytopathology*, 97, 37-43.

- Sanogo, S., & Carpenter, J. (2006). Incidence of Phytophthora blight and Verticillium wilt within Chile pepper field in New Mexico. Plant Disease, 90, 291-296.
- Sanzón, G. D., Valdovinos, P. G., Rojas, M. R. I., Zavaleta, M. E., Mora, A. M. A., & Guevara, O. L. (2012). Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología, 30, 66-71.
- SIAP. (2012). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA. Acceso en Diciembre 2014.
- Silva, R. H. V., Fernández, P. S.P., Góngora, C. C., Macías, L. B. C. & Ávila, Q. 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.
- Smith, P.G., Kimble, K. A., & Millet, A. H. (1967). Inheritance of resistance in peppers to *Phytophthora* root rot. Phytopathology, 57,377-379.
- Susanne, B., Alok, K. S., & Thomas, R. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. Journal of Experimental Botany, 58, 4019–4026.
- Sutton, J. C., Sopher, C. R., Owen, G. T. N.; Liu, W., Grodzinski, B., Hall, J. C., Benchimol, R. L. (2006). Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. Summa Phytopathological, 32, 307-321.

- Velázquez, V. R. & Lara, V. F. (2007). Presencia de patógenos en almácigos y semilla de chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25, 75-79 .
- Votava, E. J., Baral, J. B., & Bosland, P. W. (2005). Genetic diversity of Chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado and Mexico. *Economic botany*, 59, 8-17.
- Wang, J.E., Wei L. D., Ying, L. Z., Qian, Z., Mei H. Y., & Hui, G. Z. (2013). Defence response of pepper (*Capsicum annuum* L.) infected with incompatible and compatible strains of *Phytophthora capsici*. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 625-638.
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 485 p.
- Whipps, J. M. (2000). Microbial interaction and biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52, 487-511.
- Zapata, B. G. F. (2004). *Fundamentos y Casos exitoso de la biotecnología moderna*. El colegio nacional, México, 675p.
- Zapata, V. A., Sánchez, S.A., Del Rio, R. A., Silos, E. H., Perales, S. C., Flores, B. S., González, Ch. M., & Valera, M. L. (2012). *Phytophthora capsici* Epidemic Dispersion on Commercial Pepper Fields in Aguascalientes, Mexico. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-5.

ANEXOS

ANEXO 1

INOCULACIÓN SIMPLE

Cuadro 1. Efectos del inóculo, tiempo y cultivo.

EFEECTO	NUM	DEN	PR>	PR>	
	DF	DF	Valor	(DDF)	F(infty)
Inoc	2.07	1	124.45	0.0635	<.0001
Cult	1	1	3.47	0.3136	0.0625
Inoc*cult	2.07	1	2.28	0.4259	0.1000
Time	3.31	1	506.10	0.0329	<.0001
Inoc*time	6.23	1	59.41	0.0991	<.0001
Cult*time	3.3	1	0.93	0.6309	0.433
Inoc*cult*time	6.23	1	1.53	0.5513	0.1606

Cuadro 2. Mediana, Rango medio y efectos relativos para la marchitez en relación a tres inóculos y dos tipos de chile, en mediciones repetidas, en condiciones de invernadero.

Inoculo	Cultivar	Tiempo	Mediana severidad	Rango medio	TRE	IC 95%
<i>Fusarium oxysporum</i>	Anaheim	1	0.0	136.0	0.24	0.23-0.26
		4	0.0	136.0	0.24	0.23-0.26
		8	1.0	276.8	0.49	0.41-0.48
		12	1.0	321.0	0.57	0.53-0.61
		16	2.0	384.4	0.69	0.64-0.73
		20	2.5	454.5	0.81	0.74-0.86
		24	3.0	485.7	0.87	0.81-0.90
	Jalapeño	1	0	136.0	0.24	0.23-0.26
		4	0	136.0	0.24	0.23-0.26
		8	1	276.8	0.49	0.41-0.57
		12	1.5	357.3	0.64	0.58-0.69
		16	2	393.5	0.70	0.66-0.74
		20	2.5	454.5	0.81	0.75-0.86
		24	2.5	454.5	0.81	0.75-0.86
<i>Phytophthora</i>	Anaheim	1	0	136.0	0.24	0.23-0.26

<i>capsici</i>		4	0	259.2	0.46	0.29-0.42
		8	1.5	357.2	0.64	0.51-0.61
		12	2.5	454.5	0.81	0.64-0.74
		16	3	506.5	0.90	0.75-0.83
		20	3	506.5	0.90	0.84-0.89
		24	3	506.5	0.90	0.85-.90
	Jalapeño	1	0	136	0.24	0.23-0.26
		4	0	188.8	0.34	0.24-0.33
		8	1	276.9	0.49	0.41-0.51
		12	2	349.3	0.62	0.56-0.68
		16	3	450.1	0.80	0.65-0.80
		20	3	459.1	0.82	0.70-0.87
		24	3	476.7	0.85	0.75-0.88
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Anaheim	1	0	136	0.24	0.23-0.26
		4	0	136	0.24	0.23-0.26
		8	1	276.8	0.49	0.42-0.57
		12	1.5	339.6	0.61	0.51-0.69
		16	2	384.4	0.69	0.64-0.73
		20	3	464.9	0.83	0.77-0.88
		24	3	475.3	0.85	0.79-0.89
	Jalapeño	1	0	136	0.24	0.23-0.26
		4	0	136	0.24	0.23-0.26
		8	1	241.6	0.43	0.34-0.53
		12	2	348.7	0.62	0.53-0.70
		16	2	375.9	0.67	0.58-0.75
		20	3	438.3	0.78	0.63-0.88
		24	3	448.7	0.80	0.64-0.90
Testigo (No inoc.)	Anaheim	1	0	136	0.24	0.23-0.26
		4	0	136	0.24	0.23-0.26
		8	0	136	0.24	0.23-0.26
		12	0	136	0.24	0.23-0.26
		16	0	136	0.24	0.23-0.26
		20	0	136	0.24	0.23-0.26
		24	0	136	0.24	0.23-0.26
	Jalapeño	1	0	136	0.24	0.23-0.26
		4	0	136	0.24	0.23-0.26
		8	0	136	0.24	0.23-0.26
		12	0	136	0.24	0.23-0.26
		16	0	136	0.24	0.23-0.26
		20	0	136	0.24	0.23-0.26
		24	0	136	0.24	0.23-0.26

ddi= Días después de la inoculación; Rango medio (Ri), calculado, TRE= Tratamiento

medio relativo; ICR 95%= Intervalo de Confianza

ANEXO 2

INOCULACIÓN DE PLANTAS GRANDES

Cuadro 1. Interacción, entre el inóculo y los tipos de chile y el factor tiempo.

	QF	DF	P-Value
A	71.076	1.9482	.00000
B	16.804	1.0000	.00004
T	306.29	3.5002	.00000
AB	6.8733	1.9482	.00166
AT	38.999	6.5726	.00000
BT	4.9665	3.5002	.00101
ABT	5.3064	6.5726	.00001

	QF	DF1	DF2	P-value
A	71.076	1.9482	32.092	.00000
B	16.804	1.0000	32.092	.00026
AB	6.8733	1.9482	32.092	.00350

Cuadro 2. Mediana, rango medio y efectos relativos para la marchitez en relación a los inóculos y dos tipos de chile.

Inoculo	Cultivar	Tiempo	Mediana severidad	Rango medio	TRE	IC 95%
<i>Fusarium oxysporum</i>	Anaheim	1	0.0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0.0	151.5	0.27	0.25-0.29
		8	1.0	311.5	0.55	0.46-0.66
		12	1.0	361.6	0.64	0.60-0.69
		16	2.0	432.7	0.77	0.72-0.82
		20	2.0	477.0	0.85	0.80-0.89
		24	3.0	509.0	0.91	0.86-0.94
	Jalapeño	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		8	0.5	311.5	0.55	0.46-0.64
		12	1.0	402.4	0.72	0.65-0.77
		16	1.5	442.8	0.79	0.75-0.83
		20	2.5	492.9	0.87	0.83-0.92
		24	2.5	492.9	0.87	0.83-0.92

<i>Phytophthora capsici</i>	Anaheim	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	1	271.5	0.48	0.38-0.59
		8	1	372.1	0.66	0.56-0.75
		12	2	438.8	0.78	0.65-0.87
		16	2	474.8	0.84	0.78-0.89
		20	2.5	482.8	0.86	0.79-0.91
		24	2.3	506.8	0.90	0.82-0.95
	Jalapeño	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0	171.5	0.30	0.24-0.38
		8	0.5	251.5	0.45	0.34-0.56
		12	1	301.9	0.54	0.40-0.67
		16	1	376.1	0.67	0.51-0.80
		20	2.5	426.5	0.76	0.62-0.86
		24	3	472.7	0.84	0.75-0.90
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Anaheim	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		8	1	311.5	0.55	0.46-0.64
		12	1	361.9	0.64	0.54-0.73
		16	2	412.4	0.73	0.67-0.78
		20	2	450.8	0.80	0.75-0.85
		24	2	485.0	0.86	0.82-0.90
	Jalapeño	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		8	0	211.4	0.38	0.28-0.47
		12	0	231.4	0.41	0.31-0.52
		16	0.5	261.5	0.46	0.35-0.58
		20	0.5	281.8	0.50	0.36-0.64
		24	2.5	281.8	0.50	0.36-0.64
Testigo (No inoc.)	Anaheim	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		8	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		12	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		16	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		20	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		24	0	151.5	0.27	0.25-0.29
	Jalapeño	1	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		4	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		8	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		12	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		16	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		20	0	151.5	0.27	0.25-0.29
		24	0	151.5	0.27	0.25-0.29

ANEXO 3

INOCULACIÓN SECUENCIAL

Cuadro 1. Interacción entre secuencias de inoculación con el factor tipo de chile y tiempos de evaluación de los tratamientos.

	QF	DF	P-value
A	90.126	4.3898	.00000
B	.07074	1.0000	.79026
T	667.96	4.8826	.00000
AB	1.2257	4.3898	.26633
AT	25.978	17.650	.00000
BT	.68852	4.8826	.62864
ABT	.90188	17.650	.57464

	QF	DF1	DF2	P-value
A	90.126	4.3898	64.898	.00000
B	.07074	1.0000	64.898	.79110
AB	1.2257	4.3898	64.898	.30830

Cuadro 2. Mediana, rango medio y efectos relativos para la marchitez en relación a los inóculos , tipos de chile, en una inoculación secuencial.

Secuencia de inóculo	Cultivar	Tiempo	Mediana	Rango medio	TRE	IC 95%
<i>Fo-PI-Ph</i>	Anaheim	1	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		4	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		8	1	507.5	0.45	0.34-0.57
		12	1	661.2	0.59	0.50-0.68
		16	1	730.4	0.65	0.59-0.71
		20	2	865.1	0.77	0.69-0.83
		24	2	946.5	0.84	0.77-0.89
		28	2	1001	0.89	0.85-0.93
	Jalapeño	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	296.3	0.26	0.2-0.34
		8	1	591.9	0.53	0.43-0.62
		12	1	634.0	0.56	0.49-0.63
		16	1	660.9	0.59	0.49-0.67
		20	1	730.3	0.65	0.59-0.71
		24	1.5	810.9	0.72	0.64-0.79
		28	2.0	864.8	0.77	0.69-0.83

<i>Fo-Ph-Pl</i>	Anaheim	1	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		4	0	296.2	0.26	0.20-0.34
		8	0.5	465.3	0.41	0.30-0.54
		12	1.0	576.8	0.51	0.39-0.64
		16	1.5	726.8	0.65	0.49-0.78
		20	2	821.4	0.73	0.54-0.86
		24	2	947.1	0.84	0.74-0.91
		28	3	988.4	0.88	0.76-0.95
	Jalapeño	1	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		4	0	296.2	0.26	0.22-0.34
		8	1	592.0	0.53	0.43-0.62
		12	1	676.5	0.60	0.58-0.62
		16	2	838.1	0.75	0.66-0.82
		20	2	946.0	0.84	0.83-0.86
		24	3	1042.2	0.93	0.88-0.96
		28	3	1069.7	0.95	0.92-0.97
Pl-Fo-Ph	Anaheim	1	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		4	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		8	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		12	0	422.8	0.38	0.27-0.50
		16	1	549.4	0.49	0.38-0.60
		20	1	591.7	0.53	0.43-0.62
		24	1	714.6	0.64	0.52-0.74
		28	1	783.8	0.69	0.62-0.77
	Jalapeño	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	254	0.23	0.22-0.24
		8	0	254	0.23	0.22-0.24
		12	0	423.3	0.38	0.27-0.50
		16	1	550.6	0.49	0.38-0.60
		20	1	592.6	0.53	0.43-0.62
		24	1	716.19	0.64	0.52-0.74
		28	1	785.4	0.70	0.62-0.77
Pl-Ph-Fo	Anaheim	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	254	0.23	0.22-0.24
		8	0	254	0.23	0.22-0.24
		12	0	423.1	0.38	0.27-0.50
		16	1	550.0	0.49	0.38-0.60
		20	1	592.2	0.53	0.43-0.62
		24	1	715.44	0.64	0.52-0.74
		28	1	784.63	0.70	0.62-0.77
	Jalapeño	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	254	0.23	0.22-0.24
		8	0	254	0.23	0.22-0.24
		12	1	423.3	0.38	0.27-0.50
		16	1	550.5	0.49	0.38-0.60
		20	1	592.5	0.53	0.43-0.62
		24	1	716.1	0.64	0.52-0.74
		28	1	785.2	0.70	0.62-0.77

Ph-Fo-PI	Anaheim	1	0	254	0.22	0.21-0.24
		4	0	296.3	0.26	0.20-0.34
		8	1	676.5	0.60	0.58-0.62
		12	1	703.5	0.62	0.58-0.67
		16	2	865.2	0.77	0.69-0.83
		20	2	959.8	0.86	0.83-0.88
		24	2	987.3	0.88	0.84-0.91
		28	3	1042.2	0.93	0.88-0.96
	Jalapeño	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	254	0.22	0.22-0.24
		8	1	634.2	0.60	0.49-0.63
		12	1	703.5	0.62	0.58-0.57
		16	1.5	811.3	0.72	0.64-0.79
		20	2	919.0	0.82	0.76-0.86
		24	2	1001.1	0.82	0.85-0.92
		28	3	1042.4	0.93	0.88-0.96
Ph-PI-Fo	Anaheim	1	0	254.0	0.22	0.22-0.24
		4	0	254.0	0.22	0.22-0.24
		8	1	634.1	0.56	0.49-0.64
		12	1	703.5	0.63	0.58-0.67
		16	1	757.6	0.67	0.60-0.74
		20	2	919.3	0.82	0.77-0.86
		24	2	960.7	0.86	0.78-0.91
		28	3	1042.6	0.93	0.88-0.96
	Jalapeño	1	0	254.0	0.23	0.22-0.24
		4	0	339.5	0.30	0.22-0.24
		8	1	676.5	0.60	0.58-0.62
		12	1	703.7	0.62	0.58-0.67
		16	1.5	811.3	0.72	0.64-0.79
		20	2	892.0	0.79	0.73-0.85
		24	2	933.4	0.83	0.73-0.90
		28	2.5	1014.6	0.90	0.86-0.94
Testigo (No inoc.)	Anaheim	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	254	0.23	0.22-0.24
		8	0	254	0.23	0.22-0.24
		12	0	254	0.23	0.22-0.24
		16	0	254	0.23	0.22-0.24
		20	0	254	0.23	0.22-0.24
		24	0	254	0.23	0.22-0.24
		28	0	254	0.23	0.22-0.24
	Jalapeño	1	0	254	0.23	0.22-0.24
		4	0	254	0.23	0.22-0.24
		8	0	254	0.23	0.22-0.24
		12	0	254	0.23	0.22-0.24
		16	0	254	0.23	0.22-0.24
		20	0	254	0.23	0.22-0.24
		24	0	254	0.23	0.22-0.24
		28	0	254	0.23	0.22-0.24