



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL EN *Capsicum pubescens* R. y P., MEDIANTE RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA PARA EL MANEJO DE *Phytophthora capsici* Leo.



TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

EFREN CÍNTORA PORTUGUEZ

Bajo la dirección del Dr. Mario Pérez Grajales.



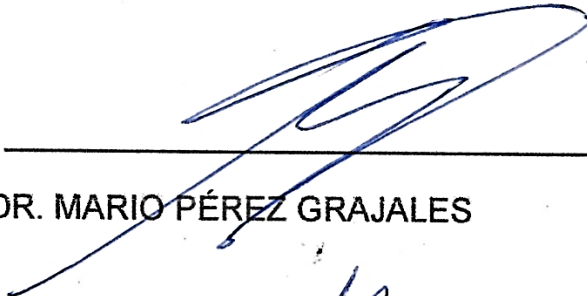
Chapingo, Estado de México, mayo de 2024

PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL EN *Capsicum pubescens* R.y P., MEDIANTE RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA PARA EL MANEJO DE *Phytophthora capsici* Leo.

Tesis realizada por **EFREN CÍNTORA PORTUGUEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESIDENTE:



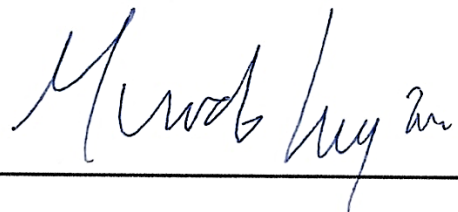
DR. MARIO PÉREZ GRAJALES

ASESOR:



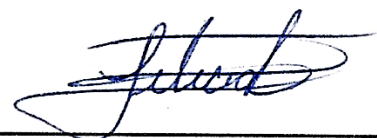
DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

LECTOR EXTERNO:



DRA. LETICIA ROBLES YERENA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
RESUMEN GENERAL.....	12
GENERAL ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
1.1 Literatura citada.....	16
CAPITULO II. ACTIVACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE <i>Capsicum pubescens</i> ANTE <i>Phytophthora capsici</i> DE BAJA VIRULENCIA.....	18
RESUMEN.....	18
CHAPTER II. DEFENSE ACTIVATION IN <i>Capsicum pubescens</i> against LOW- VIRULENCE <i>Phytophthora capsici</i>	19
ABSTRACT.....	19
2.1 INTRODUCCIÓN	20
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.2.1 LUGAR DE ESTUDIO.....	21
2.2.2 MATERIAL VEGETAL	21
2.2.3 FUENTE DE INOCULO	22
2.2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y EVALUACIÓN	22
2.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23

2.4 CONCLUSIÓN	30
2.5 LITERATURA CITADA.....	31
CAPÍTULO III. EFECTO DE ELICITORES EN LA PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL DE DOS GENOTIPOS DE <i>Capsicum pubescens</i> Y EN EL CHILE SERRANO CRIOLLO MORELOS 334 (<i>Capsicum annuum</i>) PARA LA RESISTENCIA A <i>Phytophthora capsici</i>	34
RESUMEN.....	34
CHAPTER III- EFFECT OF ELICITORS ON CAPSIDIOL PRODUCTION IN TWO <i>Capsicum pubescens</i> GENOTYPES AND THE SERRANO LANDRACE CRIOLLO MORELOS 334 (<i>Capsicum annuum</i>) FOR <i>Phytophthora capsici</i> RESISTANCE.....	35
ABSTRACT.....	35
3.1 INTRODUCCIÓN	36
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	38
3.2.2 ELICITORES Y DOSIS	38
3.2.3 EXPERIMENTO 1: EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAPSIDIOL	38
3.2.4 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (RSA)	39
3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.3.1 PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL EN RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE ELICITORES	41
3.3.2 PRODUCCION DE CAPSIDIOL EN LA INTERACCION GENOTIPO POR ELICITOR	42
3.3.3 SEVERIDAD DE LA MARCHITEZ	45

3.3.4 RESISTENCIA SITEMICA ADQUIRIDA	48
3.4 CONCLUSIONES.....	49
3.4 LITERATURA CITADA.....	50
CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA DEL CHILE SERRANO CRIOLLO MORELOS CM-344, RESISTENTE A <i>Phytophthora capsici</i> (2do ciclo).	57
RESUMEN.....	57
CHAPTER IV. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CRIOLLO MORELOS 344 SERRANO PEPPER, <i>Phytophthora capsici</i> RESISTANT (2ND CYCLE).....	58
ABSTRACT.....	58
4.1 INTRODUCCIÓN	59
4.2 MATERIALES Y METODOS	60
4.2.1 SITIO EXPERIMENTAL.....	60
4.2.2 MATERIAL VEGETAL	60
4.2.3 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA.....	61
4.2.4 PRUEBA DE RESISTENCIA A <i>Phytophthora capsici</i>	61
4.3 RESULTADOS	61
4.3.1 Descripción morfológica.....	61
4.3.2 Resistencia a <i>Phytophthora capsici</i>	63
4.4 CONCLUSION	64
4.5 LITERATURA CITADA.....	65
CONCLUSIONES GENERALES	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de medias del volumen de raíz y masa seca de raíz, tallo y hoja, muestreados a 28 y 35 días después de la inoculación (ddi), en plántulas de chile manzano inoculadas con la cepa 6143 atenuada de <i>Phytophthora capsici</i> , a tres concentraciones.	25
Cuadro 2. Comparación de las tasas de crecimiento (β_1), de los modelos de regresión exponencial, a través de los intervalos de confiabilidad de la prueba de verosimilitud, inoculadas con la cepa 6143 atenuada de <i>Phytophthora capsici</i> , a tres concentraciones de zoosporas·mL ⁻¹	29
Cuadro 3. Comparación de medias de la concentración de capsidiol, sin aplicación y a los 7 y 14 días después de la aplicación de los elicitores (DDA), en dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y en el chile serrano Criollo Morelos 334 (CM334).	41
Cuadro 4. Modelos ajustados de regresión no lineal ($Y_p = \beta_0 \cdot e^{\beta_1 \cdot x}$ y $Y_p = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$) para la concentración de capsidiol, medida a los cero, 7 y 14 días después de la aplicación de elicitores (DDA), de la interacción (Genotipo x Inductor), en plántulas de dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y el chile serrano Criollo Morelos 334 (CM334).	44
Cuadro 5. Comparación de medias de mínimos cuadrados Tukey-Kramer, de la interacción Genotipo x Inductor, en la severidad visual de raíz (%) y longitud de necrosis en tallo (mm), a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación en tallo (DDIT), en dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y el chile serrano Criollo Morelos 334 (CM334).	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plántulas de chile manzano inoculadas con la cepa 6143 atenuada de <i>Phytophthora capsici</i> , con tres concentraciones de zoosporas (cero, 2×10^3 y 1×10^6), muestreadas en 3, 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (ddi).	24
Figura 2. Porcentaje de prevalencia de la cepa de <i>Phytophthora capsici</i> 6143 atenuada en el estrato superior, medio e inferior de raíces de plántulas de chile manzano, con tres concentraciones de zoosporas (cero, 2×10^3 y 1×10^6), muestreadas en 3, 7, 14, 21 y 28 días después	27
Figura 3. Regresores estimados correspondientes a una regresión no lineal con modelo exponencial ($Y_p = \beta_0 \cdot e^{\beta_1 \cdot x}$), para volumen de raíz y masa seca de raíz, tallo y hoja, muestreados a 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días después de la inoculación (ddi), en plántula de chile manzano inoculadas con la cepa 6143 atenuada de <i>Phytophthora capsici</i> , a tres concentraciones de zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$	28
Figura 4. Escala diagramática para la evaluación del daño físico (%) en raíces de chile manzano (<i>Capsicum pubescens</i> R. y P.), atacadas por <i>Phytophthora capsici</i> Leo., propuesta de este trabajo.	40
Figura 5. Comparación de medias de mínimos cuadrados Tukey-Kramer, de la interacción (Genotipo x Inductor), en plántulas de dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y el chile serrano Criollo Morelos-334 (CM334). *Letras minúsculas diferentes en la misma fila muestra diferencia significativa a los 7DDA con $P \leq 0.05$. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila muestra diferencia significativa a los 14DDA con $P \leq 0.05$	43
Figura 6. Representación diagramática de la severidad del daño en raíz, de dos genotipos de chile manzano y el CM334, a los 140 de edad, tratadas con seis elicitors e inoculadas con <i>Phytophthora capsici</i>	47

Figura 7. Caracteres morfológicos evaluado en el CM344; a) Presencia de antocianinas en hipocótilo, b) presencia de antocianinas en entrenudos, c) color y tamaño del limbo de la hoja, d) corte transversal de hoja, e) forma, color y presencia de antocianinas en flor, f) porte de fruto en planta, g) número de lóculos y color de semilla en fruto, h) proceso de maduración de fruto.....	62
Figura 8. Avance de la necrosis de tallo provocado por la inoculación de <i>Phytophthora capsici</i> , a los 21 días después de la inoculación en plantas de chile manzano (izquierda, las primeras cinco plántulas) y plantas CM344 (derecha, ocho ultimas plántulas).	64

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, con cariño, admiración y respeto

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología por el financiamiento proporcionado durante esta investigación, a la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura por la facilidades otorgadas.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme continuar con mi formación académica y profesional.

A los miembros de mi Comité Asesor, por su paciencia y sabios consejos en la realización de esta investigación.

Al Dr. Víctor Arturo González Hernández y al M. C. Iván Ramírez Ramírez, del Laboratorio de Fisiotécnica Vegetal del Colegio de Posgraduados por las facilidades otorgadas en la medición del capsidiol de este proyecto.

A todo el personal de la UACH que me brindaron su valioso apoyo durante este proceso: Jorge Luis Sánchez Galicia, Mariana Romualda Calzada Millán, Juan Feroso Ramírez y Elizabeth Gaytán Campos.

A mis amigos Isma, Placido, Gaby, Gore, Diego, Alma, Ana, Juan, Elín, Ely, Sam y Yola por ayudarme cuando más lo necesitaba y hacer este camino más llevadero.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Efrén Cántora Portuguez
Fecha de nacimiento	mayo 18 1990
Lugar de nacimiento	Texcoco, México.
CURP	CIPE900518HMCNRF05
Cédula profesional	82234975



Desarrollo académico

Maestría	Maestría en Ciencias en Horticultura, UACH.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola, UACH

RESUMEN GENERAL

PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL EN *Capsicum pubescens* R. y P., MEDIANTE RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA PARA EL MANEJO DE *Phytophthora capsici* Leo.

La marchitez causada por *Phytophthora capsici* limita la producción del chile manzano (*Capsicum pubescens*), no obstante, la implementación de la resistencia sistémica adquirida (RSA) es una estrategia viable para el manejo integrado de este oomiceto. Por ello, se evaluó la activación de la RSA mediante el uso de cepas poco virulentas del fitopatógeno (cero, 2×10^3 y 1×10^6 zoosporas·ml⁻¹) y se midió el volumen y masa seca de raíz en plántulas inoculadas con *P. capsici*. También se aplicaron diferentes elicitores (metalaxil, acibenzolar, quitosano, fosfanato de potasio, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*) en plántulas de 100 días de edad y se determinó la concentración de capsidiol, daño visual de raíz y necrosis en tallo. Además, se caracterizó morfológicamente al chile serrano Criollo Morelos 344 (*Capsicum annuum*) (CM344), resistente universal a *P. capsici*, que fue utilizado, en este estudio, como testigo. Los resultados indicaron que a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación (DDA), la cepa de baja virulencia de *P. capsici* redujo el volumen y masa seca de raíz de 35 a 51 % ($P \leq 0.05$), y a los 35 DDA se recuperaron, lo que demostró la inducción de la RSA. El quitosano aplicado en el CM344 fue el que registró la mayor concentración de capsidiol ($5.38 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}$ de raíz) ($P \leq 0.05$). Por otra parte, *T. harzianum* y *B. subtilis* demostraron la mejor manifestación de la RSA, al presentar menor longitud de necrosis en tallo (14.7 y 18.5 mm, respectivamente) ($P \leq 0.05$) en plantas de chile manzano. Y en la caracterización morfológica del CM344, se comprobó la resistencia a *P. capsici* y se concluyó que la inducción de la RSA es una estrategia viable para el control y manejo de la marchitez causada por *Phytophthora capsici*.

Palabras clave: Criollo Morelos 344, resistencia sistémica adquirida, elicitores.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Efrén Cíntora Portugal

Dirección: Dr. Mario Pérez Grajales

GENERAL ABSTRACT

CAPSIDIOL PRODUCTION IN *Capsicum pubescens* R. Y P., TROUGH ACQUIRED SYSTEMIC RESISTANCE FOR THE *Phytophthora capsici* Leo. MANAGEMENT.

Wilt caused by *Phytophthora capsici* limits the production of the Manzano pepper (*Capsicum pubescens*); however, the implementation of Systemic Acquired Resistance (SAR) is a viable strategy for the integrated management of this oomycete. Therefore, the activation of SAR was evaluated using low-virulence strains of the phytopathogen (zero, 2×10^3 and 1×10^6 zoospores mL^{-1}), root volume and dry mass of seedlings inoculated with *P. capsici* were measured. Different elicitors (metalaxyl, acibenzolar, chitosan, potassium phosphonate, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*) were also applied to 100 days old seedlings; capsidiol concentration, visual root damage and stem necrosis were determined. Additionally, the morphological characterization of Criollo Morelos 344 (CM344) serrano pepper (*Capsicum annuum*), resistant to *P. capsici*, was performed, which was used in this study as control. The results indicated that at 7, 14, and 21 days after inoculation (DAI), the low-virulence strain of *P. capsici* reduced root volume and dry mass by 35 to 51% ($P \leq 0.05$), and at 35 DAI they recovered, demonstrating the induction of SAR. Chitosan applied to CM344 showed the highest concentration of capsidiol ($5.38 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}$ of root) ($P \leq 0.05$). *T. harzianum* and *B. subtilis* showed the best manifestation of SAR, with shorter length of stem necrosis (14.7 and 18.5 mm, respectively) ($P \leq 0.05$) in Manzano pepper plants. In the morphological characterization of CM344, was confirmed the resistance to *P. capsici*. The induction of SAR is a viable strategy for the control and management of wilt caused by *Phytophthora capsici*.

Keywords: *Criollo Morelos 344, systemic acquired resistance, elicitors.*

Tesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Efrén Cíntora Portuguese

Advisor: Dr. Mario Pérez Grajales

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Durante los últimos 10 años el chile manzano ha adquirido importancia económica por su alta rentabilidad y estabilidad de precios en el mercado (Torres & Abarca, 2016). Además, a través del Programa de Mejoramiento genético de Chile Manzano, de la Universidad Autónoma Chapingo ha registrado, cinco son híbridos de alto rendimiento y dos líneas parentales en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales para uso comercial (Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, 2024).

Por otra parte, el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo. es uno de los fitopatógenos más devastadores para el cultivo de chile, con daños en los tejidos de raíz, hoja, tallo y frutos (Biles et al., 1995). Convencionalmente el manejo para este microorganismo implica el uso de fungicidas (Castro et al., 2012). Sin embargo, se han explorado estrategias para reducir el uso de plaguicidas en el combate de enfermedades, como es el uso de injertos (Guan et al., 2012) de variedades de chile susceptibles al oomiceto injertados sobre el chile serrano Criollo Morelos 344 (CM344) (García-Rodríguez et al., 2010; Pérez-Grajales et al., 2021).

Otra estrategia con alto potencial para el control de esta enfermedad es la inducción de la resistencia (Ezziyyani et al., 2005), que implica la utilización de elicitores bióticos o abióticos que promuevan la inducción de la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) (Hernández-Santiago et al., 2020). Se ha identificado que la fitoalexina capsidiol es un factor clave para combatir la infección por *P. capsici* (Arreola-Cortés et al., 2007). Por ello, en el presente estudio se planteó como objetivo activar los mecanismos de defensa del chile manzano ante la infección de *Phytophthora capsici*, con el uso de cepas atenuadas del fitopatógeno y con la aplicación de elicitores exógenos para estimular la producción de capsidiol y con ello reducir los daños causados por el oomiceto. También se llevó a cabo la caracterización morfológica del CM344, resistente universal a *P. capsici*, que fue empleado como testigo.

Lo anterior, con la hipótesis de que la activación de los mecanismos de defensa del chile manzano ante la infección de *P. capsici* está relacionada con diferentes genes asociados a la resistencia y a factores ambientales. Se sugiere que es posible disminuir los efectos causados por el oomiceto mediante el uso de diferentes elicitors al considerar que a mayor concentración de capsidiol, habrá menor daño con una respuesta diferenciada entre genotipos.

1.1 Literatura citada

- Arreola-Cortés A., Castro-Mercado E., Lozoya-Gloria E., & García-Pineda E. (2007). Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1-3), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.07.002>
- Biles, C. L., Bruton, B. D., Wall, M. M. & Rivas, M. (1995). *Phytophthora capsici* zoospore infection of pepper fruit in various physical environments. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 75, 1-5. <https://ojs.library.okstate.edu/osu/index.php/OAS/article/view/5553/5178>
- Castro R., A., Fernández P., S. P., & Osuna Á., P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum*-*Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 49-65. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092012000100005&script=sci_arttext
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2005). Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimienta (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*. 27, 143-153. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/29941/29141>
- García-Rodríguez, M. R., Chiquito-Almanza, E., Loeza-Lara, P. D., Godoy-Hernández, H., Villordo, P., E., Pons-Hernández, J. L., González-Chavira, M. M., & Anaya-López, J. L. (2010). Producción de chile ancho injertado sobre criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia*, 44(6), 701-709. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952010000600009&script=sci_arttext

- Guan, W., Zhao, X., Hassell, R., & Thies, J. (2012). Defense mechanisms involved in disease resistance of grafted vegetables. *HortScience*, 47(2), 164-170. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.2.164>
- Hernández-Santiago, R., Vargas-Hernández, M., & Zamora-Macorra, E. J. (2020). Evaluación de inductores de resistencia al TMV en tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 377-390. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2072>.
- Pérez-Grajales, M., Pérez-Reyes, T. Q., Cruz-Álvarez, O., Castro-Brindis, R., & Martínez-Damián, M. T. (2021). Compatibilidad del portainjerto CM-334 y su respuesta sobre el rendimiento, calidad fisicoquímica y contenido de capsaicinoides en frutos de *Capsicum pubescens*. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 117(4), 332-346. <https://doi.org/10.12706/itea.2021.003>
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2024). *Catalogo Nacional de Variedades Vegetales*. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://lookerstudio.google.com/u/0/reporting/5b7206ba-e190-48fe-9696-73523bfccf58/page/itBWB>
- Torres, L. E. E., & Abarca, O. R. (2016). Rentabilidad de chile manzano ("*Capsicum pubescens*" RYP) producido en invernadero en Texcoco, Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 325-335. <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263145278009.pdf>

- Como se envió a. *Revista Chapingo Serie Horticultura* -

CAPITULO II. ACTIVACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE *Capsicum pubescens* ANTE *Phytophthora capsici* DE BAJA VIRULENCIA.

RESUMEN

El uso de cepas no patogénicas activa los mecanismos de defensa de las plantas, previo a la infección de cepas altamente patogénicas, motivo por el cual se le considera una estrategia alternativa al uso de fungicidas para el control de enfermedades. El objetivo de la presente investigación fue activar los mecanismos de defensa de plántulas de chile manzano a través de la inoculación de una cepa de *Phytophthora capsici* de baja virulencia. Para ello, plántulas de 90 días de edad fueron inoculadas con tres concentraciones de zoosporas de *P. capsici* (cero, 2×10^3 y 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹). Se realizaron cinco muestreos destructivos, cada siete días, para medir el volumen de raíz, masa seca de raíz, hoja, tallo; y prevalencia del oomiceto en raíces. Las raíces de las plantas inoculadas mostraron coloración café a los siete días después de la inoculación (ddi), sin detectar necrosis en tallo o marchitez. La masa seca de raíz de las plántulas inoculadas con concentraciones de 2×10^3 y 1×10^6 fue menor en 51 y 49 % respectivamente, a los 21 ddi respecto de las plantas sin zoosporas ($P \leq 0.05$). La producción de masa seca y de volumen de raíz de *P. capsici* en las tres concentraciones fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$) a los 35 ddi. Los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos de defensa de las plántulas de chile manzano fueron activados, mediante la inoculación de una cepa atenuada de *Phytophthora capsici*.

Palabras clave: *Marchitez del chile, control de enfermedades, cepa atenuada, elicitores, mecanismos de defensa.*

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Efrén Cíntora Portugal

Dirección: Dr. Mario Pérez Grajales

CHAPTER II. DEFENSE ACTIVATION IN *Capsicum pubescens* against LOW-VIRULENCE *Phytophthora capsici*.

ABSTRACT

The use of non-pathogenic strains activates plant defense mechanisms prior to infection by highly pathogenic strains, which is why it is considered an alternative strategy to the use of fungicides for disease control. The objective of this research was to activate defense mechanisms in seedlings of manzano pepper through inoculation with a strain of low virulence *Phytophthora capsici*. To achieve this, 90 day old seedlings were inoculated with three concentrations of *P. capsici* zoospores (zero, 2×10^3 , and 1×10^6 zoospores·mL⁻¹). Five destructive samplings were conducted every seven days to measure root volume, root dry mass, leaf and stem mass, and oomycete prevalence in roots. The roots of inoculated plants showed brown discoloration seven days after inoculation (dai), without detecting stem necrosis or wilting. The root dry mass of seedlings inoculated with concentrations of 2×10^3 and 1×10^6 was 51 and 49 % lower, respectively, at 21 dai compared to plants without zoospores ($P \leq 0.05$). The production of dry mass and root volume of *P. capsici* in the three concentrations was statistically equal ($P \leq 0.05$) at 35 dai. The results obtained suggest that defense mechanisms of manzano pepper seedlings were activated by inoculation with an attenuated strain of *Phytophthora capsici*.

Keywords: *Pepper wilt, disease control, attenuated strain, elicitors, defense mechanisms.*

Tesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Efrén Cíntora Portuguese

Advisor: Dr. Mario Pérez Grajales

2.1 INTRODUCCIÓN

El patosistema de *P. capsici-Capsicum annum* ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, el entendimiento de la resistencia hacia este patógeno no se ha definido en su totalidad, lo anterior se debe en gran medida a alta variabilidad del patógeno la cual confiere diferentes grados de virulencia dependiendo del aislado y la zona geográfica de origen; así mismo, aunque se han identificado seis regiones génicas relacionadas a la resistencia de esta enfermedad, no se ha logrado generar variedades comerciales de chile que sean resistentes a este oomiceto, debido a la baja heredabilidad de estos caracteres y a la relación espistática doble recesiva de los genes estudiados (Castro et al., 2012; Moreno et al., 2003; Reeves et al., 2013).

Las plantas cuentan con diversos mecanismos que les permiten defenderse ante cualquier proceso de infección provocado por los organismos fitopatógenos, estos mecanismos pueden ser preformados, metabólicos o una combinación de ambos (Castro et al., 2012). En el caso de los mecanismos de defensa metabólicos ocurre una comunicación bioquímica entre patógeno y el hospedero, donde el primero produce una serie de compuestos conocidos como efectores, que al ser reconocidos por la planta se activan los mecanismos de defensa, que incluyen: muerte celular programada (reacción de hipersensibilidad), producción y acumulación de fitoalexinas; síntesis de compuestos supresores al patógeno (glicoproteínas, glucopéptidos, calosa, etc.) (Chávez & Zabaleta, 2019). La mayoría de los compuestos supresores sintetizados por la planta son específicos a ciertos patógenos, debido al proceso de coevolución de ambos organismos, además en dicha coevolución se incluye a la activación de los genes de resistencia (R) y síntesis de las proteínas relacionadas a los genes R (El-Hadrami et al, 2009).

Los oomycetos, como los del género *Phytophthora*, producen efectores que permiten el establecimiento del patógeno durante la patogénesis y son secretados de manera apoplástica y citoplasmática en los tejidos del hospedero, ejemplo de estos son glucanos solubles en agua, los cuales se pueden exportar

a células vegetales donde aún no invade el patógeno, la exportación de los efectores favorece que la planta tenga la capacidad de confinar al patógeno en ciertas zonas del tejido vegetal, a través de la reacción de hipersensibilidad (El-Hadrami et al, 2009; Kim & Kim, 2009, Li et al. 2020).

El uso de organismos no patogénicos como es el caso de *Pythium oligandrum*, funciona como un elicitor, que activan los mecanismos de defensa, estos elicitors al ser parecidos a los efectores producidos por la variante patogénica de *P. oligandrum* incluso de otras especies de *Pythium* sp. y de *Phytophthora* sp. confiere una protección ante el proceso de enfermedad de estos organismos (Trillas & Segara, 2009).

El objetivo del presente trabajo fue estimular la activación de los mecanismos de defensa de plántulas de chile manzano a través de la inoculación de una cepa de *Phytophthora capsici* de baja virulencia a tres concentraciones de zoosporas, lo anterior bajo el supuesto de que los mecanismos de defensa producidos evitarán la reinoculación del oomiceto y las plántulas mostrarán características similares a un testigo sin inocular.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 LUGAR DE ESTUDIO

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada en Chapingo, México, en un invernadero con cubierta de vidrio con temperatura media de 15.9 C; humedad relativa media de 61.5 % y radiación media de 470.73 lum·sqf⁻¹·día.

2.2.2 MATERIAL VEGETAL

Se utilizó la variedad de chile manzano ‘Reynolito’, con ocho generaciones de autofecundación, generada en el programa de mejoramiento de chile manzano de la Universidad Autónoma Chapingo, con registro SNICS 3291. La siembra se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades, se utilizó como sustrato turba húmeda, las semillas se colocaron a una profundidad de dos centímetros y

se cubrieron con vermiculita. Se trasplantaron a los 70 días después de la emergencia a macetas de poliestireno con capacidad de 1.7 L con turba como sustrato. Las plantas fueron regadas con solución nutritiva Steiner al 50 % con 490 ml·día⁻¹ fraccionado en 10 eventos.

2.2.3 FUENTE DE INOCULO

Se utilizó la cepa de baja virulencia 6143 del oomiceto *Phytophthora capsici* L. proveniente de la colección resguardada por el laboratorio de Micología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo. El oomiceto se cultivó durante cinco días en medio de cultivo tomate-agar (20 g de agar, 1 000 mL de agua destilada, 200 mL de pure de tomate y 4.5 g de CaCO₃), en cajas Petri de 90x15 mm de diámetro, las cuales se colocaron en incubadora con 24 °C y condiciones de obscuridad. Posteriormente, se agregó 15 mL de agua destilada estéril y se dejó incubar por tres días más, para estimular la formación de esporangios. Finalmente, se realizó un choque térmico de frío (4 °C, por 30 min) y calor (28 °C, por 90 min) para favorecer la liberación de zoosporas. Las zoosporas se recuperaron a través del lavado de la caja Petri con agua destilada estéril y se ajustó a dos concentraciones: 2x10³ y 1x10⁶ zoosporas·mL⁻¹.

2.2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y EVALUACIÓN

El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones, la unidad experimental consto de una planta, las tres concentraciones de zoosporas (cero, 2x10³ y 1x10⁶ zoosporas·mL⁻¹) se aplicaron a grupos de 40 plantas de chile manzano con 90 días de edad. La inoculación consistió en aplicar cinco ml al cuello de la planta con la concentración correspondiente de zoosporas. La concentración de cero zoosporas·mL⁻¹ solo se añadió 5 mL de agua destilada estéril.

Se realizaron muestreos de cinco plantas a los 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días después de la inoculación (ddi), para medir el volumen de raíz (mL) se utilizó la metodología descrita por Córdoba et al. (2011). La planta fue desecada en raíz,

tallo y hojas, mismas que se colocaron en una estufa de calor seco a 60 °C durante 24 horas y se registró su masa en gramos (g).

En cada muestreo se tomó una porción de la parte superior, media e inferior de la raíz de cada planta y se sembró en cajas Petri de 90x15 mm con medio de cultivo PDA, para obtener la prevalencia del oomiceto.

2.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada uno de los muestreos (3, 7, 14, 21, 28 y 35 ddi), se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía y con comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). También se realizaron análisis de regresión no lineal con el modelo exponencial ($Y_p = \beta_0 \cdot e^{\beta_1 \cdot x}$) para cada concentración del inoculo y se compararon de los coeficientes de regresión mediante pruebas basadas en la razón de verosimilitud generalizada ($P \leq 0.05$) (Seber & Wild, 1989).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las raíces de las plantas inoculadas con ambas concentraciones de zoosporas (2×10^3 y 1×10^6) mostraron coloración café a partir de 7 ddi, síntoma indicado por Moreira-Morrillo et al., (2022) y Saltos et al. (2022), lo cual es un efecto característico de *P. capsici* (Figura1).

El volumen de raíz con la concentración de 2×10^3 disminuyó ($P \leq 0.05$) con respecto al testigo en 49, 37, 45 y 51 %, en los muestreos 7, 14, 21 y 28 ddi, respectivamente. La concentración de 1×10^6 disminuyó el volumen de raíces ($P \leq 0.05$), solo en los muestreos 7, 21, y 28 ddi con reducciones del orden de 35, 41 y 34 %, respectivamente (datos no mostrados). Llama la atención que en 35 ddi, el volumen de raíz fue similar ($P \leq 0.05$), en las tres concentraciones de zoosporas inoculadas (Cuadro 1).

En cuanto a la masa seca de raíz, las plantas inoculadas con concentración de 2×10^3 disminuyó ($P \leq 0.05$), respecto al testigo, en 46, 51 y 50 %, en los muestreos 7, 21 y 28 ddi. En tanto que, en la concentración de 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹

disminuyó ($P \leq 0.05$) en el orden de 32, 48 y 36 %, en los muestreos 7, 21 y 28 ddi, respectivamente.

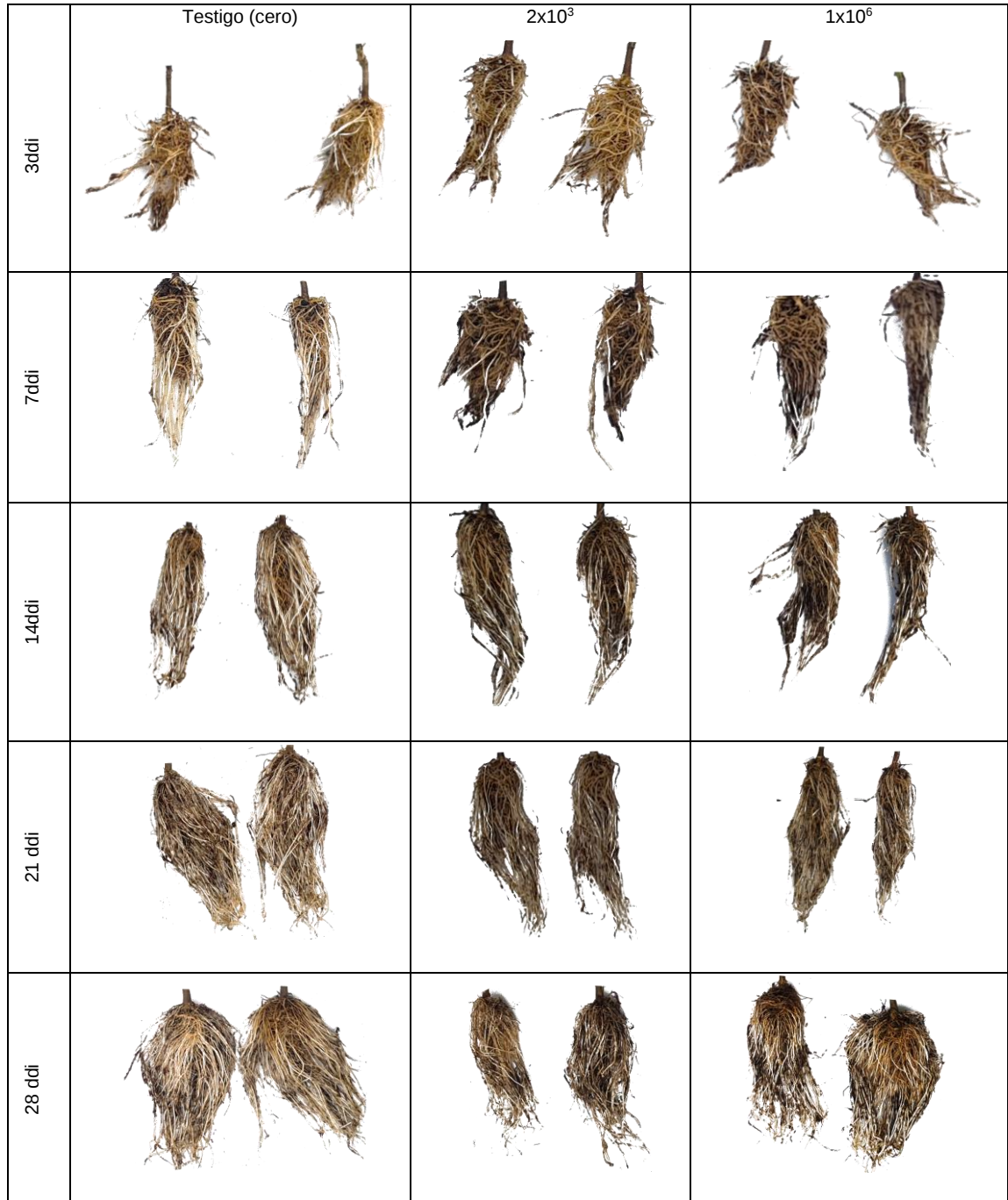


Figura 1. Plántulas de chile manzano inoculadas con la cepa 6143 atenuada de *Phytophthora capsici*, con tres concentraciones de zoosporas (cero, 2×10^3 y 1×10^6), muestreadas en 3, 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (ddi).

Particularmente, en las mediciones de la masa seca de tallo, solo se observó disminución ($P \leq 0.05$) en las plantas inoculadas con la concentración de 2×10^3 en orden de 17 % a 28 ddi, y de 15 y 31% a los 7 y 28 ddi respectivamente, para la masa seca de hojas. Mientras que con la concentración de 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹, fue similar respecto al testigo ($P \leq 0.05$).

Cuadro 1. Comparación de medias del volumen de raíz y masa seca de raíz, tallo y hoja, muestreados a 28 y 35 días después de la inoculación (ddi), en plántulas de chile manzano inoculadas con la cepa 6143 atenuada de *Phytophthora capsici*, a tres concentraciones.

Concentración (zoosporas·mL ⁻¹)	Volumen de raíz (ml)	28 ddi		
		MS-raíz (g)	MS-tallo (g)	MS-hoja (g)
Testigo (cero)	36.67 A	3.34 a	2.21 a	2.93 a
2×10^3	17.77 B	1.67 b	1.82 b	2.01 b
1×10^6	24.10 B	2.12 b	1.44 ab	2.46 ab
C.V.	21.02	23.13	16.82	11.11
DMSH	9.50	0.94	0.53	0.48

Concentración (zoosporas·mL ⁻¹)	Volumen de raíz (ml)	35 ddi		
		MS-raíz (g)	MS-tallo (g)	MS-hoja (g)
Testigo (cero)	45.58 A	5.51 a	2.90 a	3.82 a
2×10^3	46.09 a	5.24 a	2.49 a	3.45 a
1×10^6	42.70 a	4.52 a	2.54 a	3.28 a
C.V.	31.57	34.51	27.41	20.22
DMSH	25.09	3.12	1.29	1.26

*Letras minúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; MS: Masa seca; C.V.: Coeficiente de variación; DMSH: Diferencia mínima significativa homologada.

Estos resultados sugieren la posible presencia de activación de los mecanismos de defensa por el efecto de la cepa 6143 atenuada, al detectar los efectores (Fan et al., 2018, Stam et al., 2013) y contrarrestar la colonización del patógeno. El-Hadrami et al. (2009) mencionaron la actividad de un gen señalizador que codifica la enzima beta glucoronidasa en plantas de chícharo inoculadas con una cepa del oomiceto no patogénico.

De acuerdo con los estudios de Wang et al. (2013), la actividad de los metabolitos secundarios en la raíz para la defensa de *Capsicum annum*, como la peroxidasa y la β -1,3-glucanasa es mayor cuando existe una relación incompatible entre

patógeno-hospedero, razón por la que se sugiere que en futuras investigaciones se evalúe el contenido de estas enzimas.

El uso de cepas no patogénicas se encuentra ligado a la resistencia sistémica inducida (ISR), la cual tiene como característica que la activación de los mecanismos de defensa de la planta y sus compuestos sintetizados son capaces de ser transferidos a cualquier parte vegetal disponible (Delgado-Oramas, 2020; Heil & Bostock 2002). Además, con la liberación de elicitores como el β -glucano, que ocurre durante el proceso de patogénesis de *P. capsici*, la planta comienza la síntesis de enzimas hidrolíticas (Castro et al., 2012).

Algunos ejemplos de la utilización de cepas no patogénicas son *Fusarium* sp. y *Phytium* sp.; al respecto, Singh (2016) encontró mayor volumen de raíz en plantas inoculadas de jitomate. También, Li et al. (2020) demostraron que al silenciar la expresión de un efector producido por *P. capsici* la patogenicidad del oomiceto es reducida e impidió la manifestación de síntomas de la enfermedad.

La prevalencia de *P. capsici* de la cepa 6143 atenuada para invadir las raíces de las plántulas de chile manzano, en la concentración de 2×10^3 zoosporas·mL⁻¹ se incrementó de 6, 20, 26 hasta 66 % en los muestreos de 3, 7, 14 y 21 ddi, respectivamente. Mientras que con la concentración de 1×10^6 zoosporas· mL⁻¹, la prevalencia fue de 13, 26, 40 y 46 %, en los mismos muestreos, y prevalencia cero para el testigo sin inocular. Finalmente, la prevalencia del oomiceto disminuyó a 33 %, en las plantas inoculadas con la concentración de 2×10^3 zoosporas·mL⁻¹ a 28 y 35 ddi; en contraste, la prevalencia de *P. capsici* fue de 20 y 26 %, en las plantas con concentración de 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹ (Figura 2).

La mayor prevalencia del oomiceto fue en la parte media y superior de la raíz, esto de acuerdo con Zhou et al. (2017), se debe a que las zoosporas de *P. capsici*, buscan establecerse en el primer tejido de la rizosfera con el que tenga contacto. De acuerdo con Saltos et al. (2022), para que se lleve a cabo el proceso de patogénesis es necesario que el patógeno se adhiera a la superficie de la raíz y forme el haustorio que le permita ingresar al tejido vegetal.

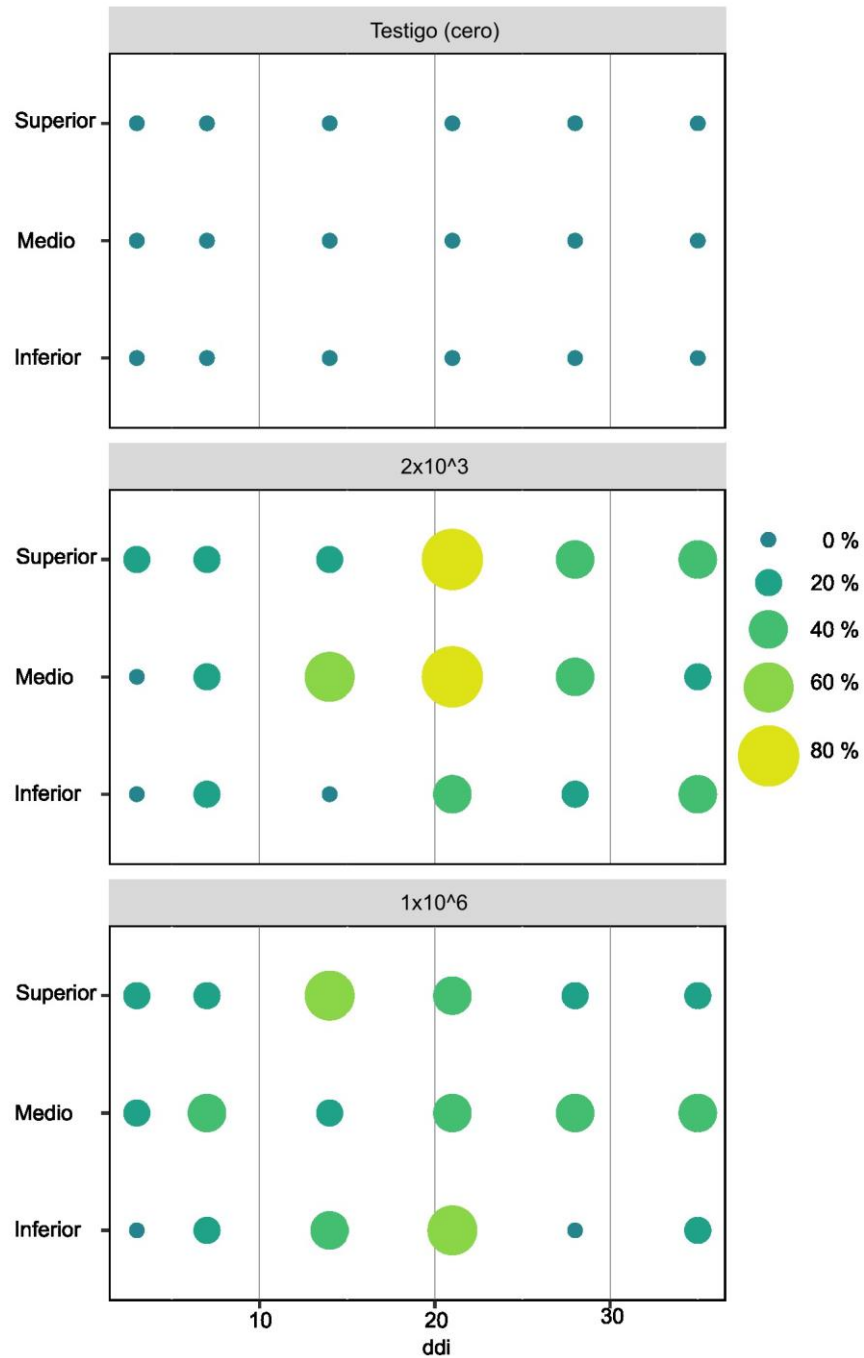


Figura 2. Porcentaje de prevalencia de la cepa de *Phytophthora capsici* 6143 atenuada en el estrato superior, medio e inferior de raíces de plántulas de chile manzano, con tres concentraciones de zoosporas (cero, 2×10^3 y 1×10^6), muestreadas en 3, 7, 14, 21 y 28 días después

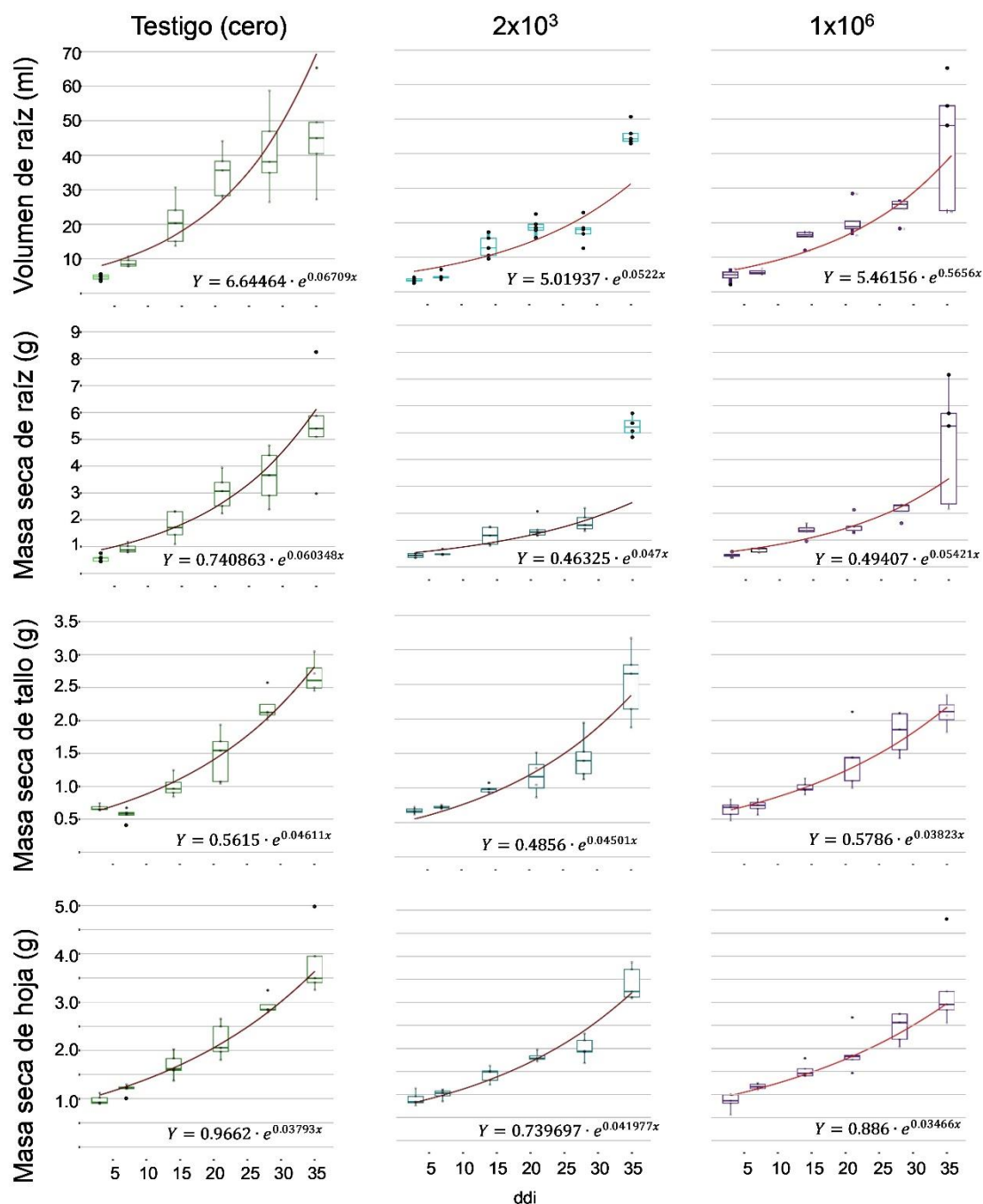
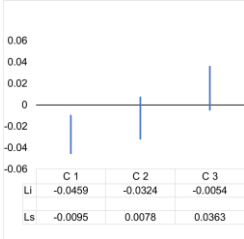
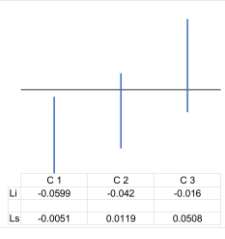
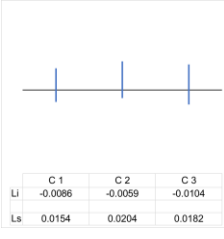
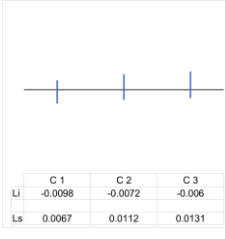


Figura 3. Regresores estimados correspondientes a una regresión no lineal con modelo exponencial ($Y_p = \beta_0 \cdot e^{\beta_1 \cdot x}$), para volumen de raíz y masa seca de raíz, tallo y hoja, muestreados a 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días después de la inoculación (ddi), en plántula de chile manzano inoculadas con la cepa 6143 atenuada de *Phytophthora capsici*, a tres concentraciones de zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$.

El hecho de que el oomiceto atenuado no causó la muerte de las plántulas de chile manzano, inoculadas con 2×10^3 y 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹, sugiere, que acuerdo con Lamour et al. (2012), el oomiceto se mantuvo en la fase biotrófica; en la que las células del hospedero no presentaron algún tipo de daño visual, debido a una supresión local o activación de los mecanismos de defensa que impidieron al ciclo de la enfermedad avanzar a su fase necrofítica.

Cuadro 2. Comparación de las tasas de crecimiento (β_1), de los modelos de regresión exponencial, a través de los intervalos de confiabilidad de la prueba de verosimilitud, inoculadas con la cepa 6143 atenuada de *Phytophthora capsici*, a tres concentraciones de zoosporas·mL⁻¹

Concentración	Volumen de raíz	Masa seca de raíz	Masa seca de tallo	Masa seca de hoja
Testigo (cero)	0.06709 a	0.060348 a	0.04611 a	0.037930 a
2×10^3	0.05220 b	0.047000 b	0.04501 a	0.041977 a
1×10^6	0.05656 ab	0.054210 ab	0.03823 a	0.034660 a

* Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna es significativo con $P \leq 0.05$; si el intervalo de verosimilitud generalizada contiene al cero (línea central), no se rechaza la hipótesis nula; C1: comparación de las tasas de crecimiento (β_1) entre el testigo y las plantas inoculadas con 2×10^3 zoosporas·mL⁻¹; C2: comparación de las tasas de crecimiento (β_1) entre el testigo y las plantas inoculadas con 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹; C3: comparación de las tasas de crecimiento (β_1) en las plantas inoculadas con 2×10^3 y 1×10^6 zoosporas· mL⁻¹.

El análisis de regresión no lineal con modelo exponencial (Figura 3), presentó una correcta explicación de los datos observados con los valores predichos, a excepción del volumen de raíz y masa seca de raíz a los 35 ddi, en las plántulas inoculadas con las concentraciones de 2×10^3 y 1×10^6 zoosporas·mL⁻¹, donde la media se desvía considerablemente de la línea de regresión. De acuerdo con los intervalos de confiabilidad de la prueba de verosimilitud generalizada de las tasas de crecimiento (β_1), la masa seca de hoja y tallo de las plántulas de chile manzano

no presentaron diferencias ($P \leq 0.05$) en las tres concentraciones inoculadas de la cepa 6143 atenuada de *P. capsici*. Sin embargo, para el volumen y masa seca de raíz la única diferencia ($P \leq 0.05$) observada fue entre el testigo y las plántulas inoculadas con la concentración de 2×10^3 zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 4).

La activación de los mecanismos de defensa a través del uso de cepas atenuadas de *P. capsici* sugiere una relación estrecha ligada a la concentración del inoculo que se utilice, similar a lo encontrado por Castro et al. (2012).

2.4 CONCLUSIÓN

Se estimuló la activación de los mecanismos de defensa de las plántulas de chile manzano a través de la inoculación de la cepa 6143 de baja virulencia de *Phytophthora capsici* Leo. a tres concentraciones de zoosporas, evitando la reinoculación del oomiceto a los 35 días después de la inoculación, fecha en la que las plántulas inoculadas con las concentraciones de 2×10^3 y 1×10^6 zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$ produjeron la misma masa seca de hoja, tallo y raíz que el testigo sin inocular.

2.5 LITERATURA CITADA

- Castro R., A., Fernández P., S. P., & Osuna Á., P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 49-65. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092012000100005&script=sci_arttext
- Chávez-Díaz, I. F., & Zavaleta-Mejía, E. (2019). Molecular communication in the pathosystem *Capsicum* species -*Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(2), 251-278. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1901-3>
- Córdoba-Rodríguez, D., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., & Muñoz-Orozco, A. (2011). Crecimiento de la raíz en plantas jóvenes de *Pinus pinceana* Gordon en respuesta a la humedad del suelo. *Agrociencia*, 45(4), 493-506. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n4/v45n4a8.pdf>
- Delgado-Oramas, P. B. (2020). La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 35(1), Article e07. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522020000100001&script=sci_arttext&lng=en
- El-Hadrami, A., El-Hadrami, I. & Daayf F. (2009). Suppression of induced plant defense responses by fungal and oomycete pathogens. In K. Bouarab, N. Brisson, & F. Daayf (Eds.), *Molecular Plant-Microbe Interactions* (pp. 231-268). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845935740.0231>
- Fan G., Yang Y., Li T., Lu W., Du Y., Qiang X., Wen Q., & Shan W. (2018). A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits a plant PPIase to suppress endoplasmic reticulum-mediated Immunity. *Molecular Plant*. 11, 1067–1083. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.009>

- Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503-512. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf076>
- Kim, S. G., & Kim, Y. H. (2009). Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *The Plant Pathology Journal*, 25(2), 113-120. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2009.25.2.113>
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host - range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329-337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Li, Q., Wang, J., Bai, T., Zhang, M., Jia, Y., Shen, D., Zhang, M., & Dou, D. (2020). A *Phytophthora capsici* effector suppresses plant immunity via interaction with EDS1. *Molecular Plant Pathology*, 21(4), 502-511. <https://doi.org/10.1111/mpp.12912>
- Moreira-Morrillo, A. A., Monteros-Altamirano, Á., Reis, A., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). *Phytophthora capsici* on *Capsicum* plants: a destructive pathogen in chili and pepper crops. In Y. O Baylen (Ed.), *Capsicum - Current Trends and Perspectives* (pp. 1-16). Intechopen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104726>
- Pérez, M. L., Durán, O. L. J., Ramírez, M, R., Sánchez, P. J. R., & Olalde, P. V. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1), 19-25. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221103.pdf>
- Reeves, G., Monroy-Barbosa, A., & Bosland, P. W. (2013). A novel *Capsicum* gene inhibits host-specific disease resistance to *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 103(5), 472-478. <https://doi.org/10.1094/phyto-09-12-0242-r>

- Saltos, L. A., Monteros-Altamirano, Á., Reis, A., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). *Phytophthora capsici*: the diseases it causes and management strategies to produce healthier vegetable crops. *Horticultura Brasileira*, 40(1), 5-17. <https://doi.org/10.1590/s0102-0536-20220101>
- Seber, G. A. F., & Wild, C. J. (1989). *Nonlinear regression*. John Wiley & Sons.
- Singh, S. (2016). Role of nonpathogenic fungi in inducing systemic resistance in crop plants against phytopathogens. In D. P. Singh, H. B. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Functional Applications* (pp. 69-83). Springer New Delhi <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4>
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A. J. M., Morris, J. A., Boevink, P. C., Hedley, P. E. & Huitema, E. (2013). Identification and characterisation CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity. *PLoS One*, 8(3), Article e59517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059517>
- Trillas, M. I., & Segarra, G. (2009). Interactions between nonpathogenic fungi and plants. In J. C. Kader & M. Delseny, (Eds), *Advances in Botanical Research* (pp. 321-359). Utrecht University. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51008-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51008-7)
- Wang, J. E., Li, D. W., Zhang, Y. L., Zhao, Q., He, Y. M., & Gong, Z. H. (2013). Defence responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) infected with incompatible and compatible strains of *Phytophthora capsici*. *European Journal of Plant Pathology*, 136(3), 625-638. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0193-8>
- Zhou, T., Yang, X., Qiu, D., & Zeng, H. (2017). Inhibitory effects of xenocoumacin 1 on the different stages of *Phytophthora capsici* and its control effect on *Phytophthora* blight of pepper. *BioControl*, 62, 151-160. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9779-3>

- Como se envió a: *The Plant Pathology Journal* -

CAPÍTULO III. EFECTO DE ELICITORES EN LA PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL DE DOS GENOTIPOS DE *Capsicum pubescens* Y EN EL CHILE SERRANO CRIOLLO MORELOS 334 (*Capsicum annuum*) PARA LA RESISTENCIA A *Phytophthora capsici*

RESUMEN

La marchitez causada por *Phytophthora capsici*, representa un problema en el cultivo de chile, ya que disminuye su productividad y calidad de fruto. El presente estudio investigó el potencial de diferentes elicitores aplicados a la raíz, en dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) (*Capsicum pubescens*) y en el chile serrano Criollo Morelos-334 (CM334) (*Capsicum annuum*), para estimular la producción de capsidiol en raíz y activar la resistencia sistémica adquirida (RSA). En un experimento se aplicaron seis elicitores a la raíz (metalaxil, acibenzolar, quitosano, fosfanato de potasio, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*), y se evaluó la concentración del capsidiol en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de raíz; y en otro experimento se inoculó la cepa 6143 de *P. capsici* en raíces y tallos, a los 7 y 14 días después de aplicar elicitores (DDA), y se midió la severidad del daño visual en raíz (%) y la longitud de necrosis en tallo (mm). Los resultados indican que el CM334, tuvo mayor concentración de capsidiol a los 7 y 14 DDA (2.63 y 3.17 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente), en contraste de 0.35 y 1.33 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a los 7DDA y 0.22 y 0.60 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a los 14DDA ($P\leq 0.05$), en L1 y L3, respectivamente. Además, el CM334 presentó menor daño visual en raíces (12 %) y necrosis (7.4 mm), comparado con L1 y L3 (41.32 % y 32.29 %, y 65.4 mm y 39.6 mm, respectivamente). El chile manzano, el quitosano y *Trichoderma harzianum* mostraron variaciones en la producción de capsidiol y, por ende, en la RSA.

Palabras clave: *Resistencia Sistémica Adquirida, fitoalexina, Criollo Morelos-334.*

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Efrén Cíntora Portuguese

Dirección: Dr. Mario Pérez Grajales

CHAPTER III- EFFECT OF ELICITORS ON CAPSIDIOL PRODUCTION IN TWO *Capsicum pubescens* GENOTYPES AND THE SERRANO LANDRACE CRIOLLO MORELOS 334 (*Capsicum anuum*) FOR *Phytophthora capsici* RESISTANCE.

ABSTRACT

Wilt caused by *Phytophthora capsici* represents a challenge in pepper farming, as it decreases production and affects fruit quality. This study explored the potential of different elicitors applied to roots in two genotypes of manzano peppers (L1 and L3) (*Capsicum pubescens*), and of serrano landrace CRIOLLO MORELOS 334 (CM344) (*Capsicum anuum*), to stimulate capsidiol production in roots, and activate acquired systemic resistance (ASR). In one trial, six elicitors were administered to roots (metalaxyl, azibenzolar, Quitosano, Fosfanato de potasio, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*), and capsidiol concentrations were recorded in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of root tissue, while in another experiment, the 6143 isolate of *P. capsici* was inoculated in roots and stems. Seven and fourteen days after inoculation (DAI), visual severity of root damages (%) and length of stem necrosis (mm) were measured. Obtained results indicate that CM334 produced the highest capsidiol concentration both 7 and 14 after inoculation (2.63 and $3.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively), differing from 0.35 and $1.33 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ found at 7 DAI, and 0.22 and $0.60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ found at 14 DAI ($P\leq 0.05$), in L1 and L3, respectively. Additionally, CM334 demonstrated the least visual damage in roots (12 %) and stem necrosis (7.4 mm), when compared to L1 and L3 (41.32 % and 32.29 %, and 65.4 mm and 59.6 mm, respectively). Manzano peppers, along with quitosano and *T. harzianum* applications, demonstrated variations in capsidiol production, and ergo, in ASR.

Key words: *Systemic acquired resistance, Phytoalexins, Criollo Morelos-334*

Tesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Efrén Cíntora Portuguese

Advisor: Dr. Mario Pérez Grajales

3.1 INTRODUCCIÓN

En las plantas, el metabolismo secundario proporciona la capacidad de defenderse contra plagas (Sepúlveda et al., 2003), a través de los mecanismos de defensa, mismos que son inducidos por diferentes factores ambientales y han sido estudiados desde principios del siglo XX. El término de “resistencia inducida” se acuñó en el año 2000 (Delgado-Oramas, 2020), el cual se refiere a una respuesta local o sistémica ante una infección (Kuc, 2001; Van Loon, 1997), en la actualidad existen dos formas de resistencia inducida, la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI) y son resultado a la exposición de la planta a microorganismos no patogénicos, virulentos o avirulentos (Choudhary et al., 2007).

Los principales mecanismos de defensa de las plantas son la síntesis de proteínas R, acumulación de ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ), modificación de la pared celular, acumulación de enzimas hidrolíticas (quitinasas, β -1,3-glucanasa) (Heil & Bostock, 2002) y formación de fitoalexinas como el capsidiol, escopoletina, resveratrol, etc. (Ahuja et al., 2012). La activación de los mecanismos de defensa provocada por la RSA o por la RSI es más rápida y efectiva, a este proceso se le conoce como cebado o ‘priming’ en inglés (Conrath et al., 2001). El cebado se alcanza con la interacción de la planta con microorganismos benéficos como *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp, rizobacterias y micorrizas (Shoreish et al., 2010); también de agroquímicos como el metalaxil, acibenzolar, fosfitos, fosetil y quitosano (Guarnizo et al., 2020).

Para llevar a cabo la activación de los mecanismos de defensa de la planta, es necesario la interacción metabólica con los microorganismos o de agroquímicos denominados elicitores y es indispensable el reconocimiento por la célula vegetal (Benhamou, 1996), para realizar diferentes estrategias de defensa como la acumulación de iones de calcio en la membrana celular (Meena et al., 2022) conlleva a una serie de cambios como el cierre de canales iónicos, cambios de polaridad, activación de cinasas (Garagounis et al., 2021), mayor concentración

de AS y AJ y posteriormente la reacción de hipersensibilidad (Choi & Hwang; 2015), lo que se conoce como RSI y RSA (Oostendorp et al., 2001).

La actividad enzimática en la síntesis de fitoalexinas se considera como un proceso clave durante la activación de los mecanismos de defensa en solanáceas (Egea et al., 1996b), específicamente de la 5-epi-aristolóqueno sintetasa, catalizador de compuestos sesquiterpénicos como el capsidiol en plantas de tabaco y chile (Zavala et al., 2000). El capsidiol se ha identificado como uno de los metabolitos de defensa más importantes para el combate de patógenos en estas especies (Araceli et al., 2007) y está involucrado tanto en la RSI y como en la RSA (Maldonado et al., 2008).

El chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es un cultivo típicamente establecido en las zonas altas y templadas de México, tanto en condiciones de campo abierto como en invernadero (Pérez & Castro, 2008). Se ha observado un crecimiento en la producción y rentabilidad de este cultivo en ambos sistemas de producción (Puente et al., 2014). Los genotipos L1 y L3 son líneas progenitoras del híbrido 'Dali' de chile manzano, obtenidos dentro del programa de mejoramiento genético de chile manzano de la Universidad Autónoma Chapingo. Entre las estrategias evaluadas para el manejo de la marchitez causada por *P. capsici* se encuentra el uso del chile serrano 'Criollo Morelos 334' como portainjerto del chile manzano (Pérez et al., 2021).

Sin embargo, debido que la RSA y RSI son estrategias de manejo y control de enfermedades con mayor potencial para la sustentabilidad en el manejo de cultivos (Vallad & Goodman, 2004), el objetivo de esta investigación fue medir la concentración de capsidiol y su relación con la respuesta de resistencia sistémica adquirida a la marchitez causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo., en dos genotipos de chile manzano 'L1' y 'L3' (*Capsicum pubescens* R. y P.) y uno de chile serrano 'Criollo Morelos 334' (*Capsicum annuum* L.), tratados con seis elicitores y aplicados a la raíz. Bajo la hipótesis que el 'Criollo Morelos 334' tendrá mayor concentración de capsidiol, menor severidad daño en raíz y longitud de necrosis en el tallo que el chile manzano.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

Se evaluaron dos líneas avanzadas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) 'L1' y 'L3', generadas en el programa de mejoramiento de chile manzano de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y el chile serrano (*Capsicum annum* L.) 'Criollo Morelos-334' (CM334), resistente a *Phytophthora capsici* (Castro et al., 2012), del mismo programa. La siembra de los tres genotipos de chile se llevó a cabo en charolas de poliestireno de 200 cavidades y se utilizó turba húmeda como sustrato, 60 días después fueron transplantadas en macetas de polivinilo con capacidad de 1.5 L rellenas con una mezcla de turba (50 %), vermiculita (25 %) y perlita (25 %). Las plántulas fueron regadas con solución nutritiva de Steiner al 50 % de concentración con un gasto de 490 mL·día⁻¹·planta⁻¹, fraccionado en 10 eventos de riego por goteo.

3.2.2 ELICITORES Y DOSIS

Se estudiaron seis elicitors, dos de origen químico (metalaxil y acibenzolar), dos orgánicos (fosfanato de potasio y quitosano) y dos bio-fungicidas (*Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*) (Godínez et al., 2020; Lyon, 2014). La aplicación de los elicitors se realizó 30 días después del transplante (100 días después de la siembra), las dosis de cada ingrediente activo (i.a.) fueron las siguientes: metalaxil (1.68 mL·L⁻¹ de i.a.), acibenzolar (200 mg·L⁻¹ de i.a.), fosfanato de potasio (150 mg·L⁻¹ de i.a.), quitosano (250 mg·L⁻¹ de i.a.), *T. harzianum* (60 000 000 ufc·L⁻¹), *B. subtilis* (60 000 000 ufc·L⁻¹) y un testigo (Blanco), al cual se le aplicó agua destilada estéril. La aplicación de los elicitors implicó la adición de 50 mL de cada solución preparada a la base del tallo de cada plántula.

3.2.3 EXPERIMENTO 1: EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAPSIDIOL

La extracción de capsidiol se realizó mediante una serie de tres experimentos completamente al azar con arreglo factorial de doble entrada 3x7 con tres

repeticiones, la unidad experimental consistió en una plántula por tratamiento (100 días de edad). Se separó y lavó la raíz de cada plántula a los cero, 7 y 14 días después de la aplicación de los elicitores (DDA) y se midió la masa fresca en gramos (g). Luego, se congeló la raíz con nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo fino, después se transfirió a un tubo de centrifugado de 15 mL, al que se añadieron 10 mL de diclorometano (Song et al., 2019).

Posteriormente, se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto, durante cinco minutos y se dejó reposar durante 36 horas. Pasado este tiempo, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo para evaporar el solvente a baño maría a una temperatura de 90 °C. El soluto resultante se re-diluyó con 1 mL de acetonitrilo y se filtró a través de acrodiscos de PTFE con poro de 0.2 µm. Las muestras filtradas se analizaron en el HPLC Agilent® mod. HP-1260, equipado con un detector de UV y una columna Agilent HYPERSIL ODS de 4.0 x 250 mm y 5 µm de tamaño de partícula, con un tiempo de corrida por muestra de 22 minutos.

La concentración del capsidiol en las raíces se determinó con el área bajo la curva (ABC) calculada por el HPLC, se utilizó la señal correspondiente a una longitud de onda de 209.4 nm, se calculó la concentración de en mg·mL⁻¹, utilizando el ABC de la muestra estándar de capsidiol (1.5 mg·mL⁻¹), con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de capsidiol} = \frac{\left(\frac{ABC_{\text{muestra}} \cdot 1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}}{ABC_{\text{estándar}}} \right)}{\text{g de raíz fresca}}$$

3.2.4 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (RSA)

Para la evaluación de la RSA se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de doble entrada 3x8 con cuatro repeticiones, la unidad experimental consistió en tres plántulas por tratamiento. A los siete DDA de los elicitores, se llevó a cabo la inoculación de *Phytophthora capsici*. Para ello, se agregó 5 mL al cuello de la planta con la suspensión de zoosporas, a una concentración de 3x10⁵ zoosporas·mL⁻¹. Además, se incluyó a un doble testigo

al cual se le añadió 5 mL de agua destilada estéril (Godínez et al., 2020). A los 14 DDA, se cortó el tallo de las plántulas a la altura de la primera bifurcación, aproximadamente 30 y 15 cm, para el chile manzano y el CM334, respectivamente, sobre el corte del tallo, se colocó un disco de 5 mm de diámetro de tomate agar que contenía el micelio del oomiceto *P. capsici* y se cubrió con papel aluminio (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, 2018).

Se midió la longitud (mm) del avance de la necrosis en el tallo, a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación del oomiceto en tallo (DDIT). A los 35 DDA, se separó la plántula de la maceta de cultivo y se procedió a lavar la raíz, para determinar el daño físico de las mismas. Para ello, en este estudio, se propuso y utilizó una escala diagramática del daño (%) físico en raíces de chile manzano, causado por *P. capsici*, a los 140 días de edad de las plántulas (Figura 4).



Figura 4. Escala diagramática para la evaluación del daño físico (%) en raíces de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.), atacadas por *Phytophthora capsici* Leo., propuesta de este trabajo.

3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la concentración de capsidiol, severidad de daño físico en raíz y longitud de necrosis en tallo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de

medias de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$). Además de análisis de regresión no lineal con modelos exponenciales ($Y_p = \beta_0 \cdot e^{\beta_1 \cdot x}$) y cuadráticos ($Y_p = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$) para las interacciones de genotipo y elicitores evaluados para la concentración de capsidiol.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 PRODUCCIÓN DE CAPSIDIOL EN RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE ELICITORES

La concentración de capsidiol en el Criollo Morelos 334 (CM334) superó significativamente a la L3 de chile manzano con 47 y 81 % ($P \leq 0.05$) a los 7 y 14 días después de la aplicación de los elicitores (DDA), respectivamente y más aún a la 'L1' con 87 y 93 %. Aunque, antes de la aplicación de los elicitores la 'L3' de chile manzano fue el genotipo que mayor concentración de capsidiol (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de medias de la concentración de capsidiol, sin aplicación y a los 7 y 14 días después de la aplicación de los elicitores (DDA), en dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y en el chile serrano Criollo Morelos 334 (CM334).

Genotipo	Concentración de capsidiol $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of root tissue		
	Sin aplicación de elicitor	7 DAA	14 DAA
L1	0.03 c*	0.35 c	0.22 c
L3	0.34 a	1.33 b	0.60 b
CM334	0.11 b	2.63 a	3.17 a
C.V.	18.93	34.21	27.81
DMSH	0.02	0.37	0.27

*Letras minúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; C.V.: Coeficiente de variación; DMSH: Diferencia mínima significativa homologada.

Las mediciones del capsidiol en CM334, superaron la concentración de $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a los siete y 14 DDA; de acuerdo con lo publicado por Castro et al. (2012) y Egea et al. (1996a), la acción de defensa del capsidiol depende de su concentración, teniendo una acción fungistática a 3.75 mM y fungitóxica a niveles mayores de 5 mM, lo que equivale aproximadamente a 0.887 y $1.182 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,

respectivamente. La importancia de esta fitoalexina, de acuerdo con Giannakopoulou et al. (2014), es que reduce en 50 % el contenido de proteínas de la membrana celular de *P. capsici* y un 33 % de los fosfolípidos.

La alta producción de capsidiol observada en las raíces del CM334, se relaciona con lo mencionado en los estudios de Glosier et al. (2008) y Oelke & Bosland, (2006), al establecer que el Criollo Morelos-334 es la fuente de resistencia más estable a la enfermedad de la marchitez causada por *P. capsici*.

También se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la concentración de capsidiol entre los dos genotipos de chile manzano, destacando la L3 con los mayores valores, además de alcanzar niveles fungitóxicos con $1.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a los 7 DDA (Cuadro 3). En particular, la L3 es una línea pura que se emplea como progenitor en varios de los híbridos comerciales de chile manzano. Incluso, se tiene su registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) y se caracteriza por tener un porte de planta intermedio (entrenudos de tamaño medio), alto rendimiento de fruto de tamaño medio y pericarpio grueso, de color amarillo intenso y de larga vida poscosecha, que le proporciona alto valor comercial (Pérez et al., 2019; Pérez et al., 2021), y en adición a estas características ahora se incorpora su capacidad de respuesta favorable en la producción de capsidiol con la aplicación de elicitores.

3.3.2 PRODUCCION DE CAPSIDIOL EN LA INTERACCION GENOTIPO POR ELICITOR

La mayor producción de capsidiol alcanzada en la interacción Genotipo x Elicitor fue de $5.386 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}$ de raíz a los 7 DDA, ($P \leq 0.05$), en el CM334 y el elicitor quitosano, mientras que la menor fue de $0.032 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de raíz a los 7 DDA, en mismo genotipo con *Bacillus subtilis*. Para el caso de la L1 de chile manzano la interacción con el metalaxil fue la de mayor concentración de capsidiol con $1.578 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de raíz a los 7 DDA y la mínima se registró con *Trichoderma harzianum* con $0.004 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de raíz a los 14 DDA. En la L3 de chile manzano

la concentración máxima de capsidiol se alcanzó con *T. harzianum* con 2.598 mg·mL⁻¹·g⁻¹ de raíz a los 7 DDA y la mínima de 0.003 mg·mL⁻¹·g⁻¹ de raíz a los 14 DDA en el Blanco sin elicitor. Este comportamiento indica que la producción de capsidiol dependerá del genotipo de chile y el elicitor empleado.

En contraste, la concentración del capsidiol en la interacción del CM334 sin inductor, mostró una eficiencia igual ($P \leq 0.05$) a las mediciones con inductores a los 14 DDA (Figura 5), lo cual es consistente con la complejidad de la maquinaria bioquímica involucrada en la resistencia a *P. capsici* (Chávez-Díaz & Zabaleta-Mejía, 2019).

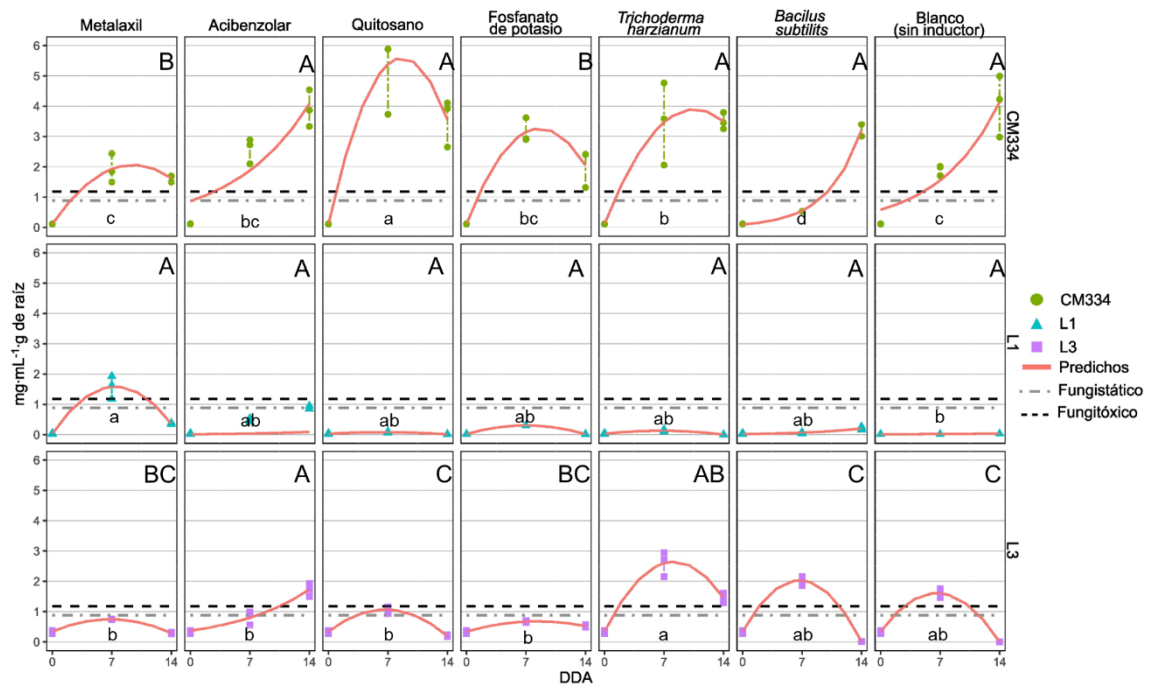


Figura 5. Comparación de medias de mínimos cuadrados Tukey-Kramer, de la interacción (Genotipo x Inductor), en plántulas de dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y el chile serrano Criollo Morelos-334 (CM334). *Letras minúsculas diferentes en la misma fila muestra diferencia significativa a los 7DDA con $P \leq 0.05$. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila muestra diferencia significativa a los 14DDA con $P \leq 0.05$.

Los análisis de regresión (Cuadro 4) revelaron que la respuesta en la concentración del capsidiol predicha a la influencia del acibenzolar y *B. subtilis*, mostraron una distribución exponencial ($P \leq 0.05$), destacando este último por su mayor tasa de crecimiento. Estos resultados corresponden a las mediciones del

CM334 y la L1 del chile manzano. En contraste, se identificaron respuestas cuadráticas ante la influencia de metalaxil, quitosano, fosfanato de potasio y *T. harzianum* ($P \leq 0.05$), este comportamiento es característico de una respuesta donde se alcanza un punto máximo, seguido de una disminución en la misma. Dichos patrones se reflejan en los tiempos de 9.5, 8.7, 8.6 y 10.6 DDA para el genotipo CM334, mientras que para la línea L1 se predijeron tiempos máximos de 7.4, 6.5, 7.0 y 6.6 DDA en los mismos inductores (Figura 5).

Cuadro 4. Modelos ajustados de regresión no lineal ($Y_p = \beta_0 \cdot e^{\beta_1 \cdot x}$ y $Y_p = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$) para la concentración de capsidiol, medida a los cero, 7 y 14 días después de la aplicación de elicitores (DDA), de la interacción (Genotipo x Inductor), en plántulas de dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y el chile serrano Criollo Morelos 334 (CM334).

	Interacción Genotipo x Elicitor	Modelo de regresión ajustado para la concentración de capsidiol	R- cuadrada ajustada
CM334	Metalaxyl	$y = 0.114237 + 0.410089x - 0.02157x^2$	0.896
	Azibenzolar	$y = 0.8654210 \cdot e^{0.110635x}$	0.790
	Quitosano	$y = 0.114237 + 1.260173 - 0.07244x^2$	0.847
	Fosfanato de potasio	$y = 0.114237 + 0.729543x - 0.04225x^2$	0.902
	<i>Trichoderma harzianum</i>	$y = 0.114237 + 0.716491x - 0.0339x^2$	0.808
	<i>Bacillus subtilis</i>	$y = 0.09469 \cdot e^{0.251544x}$	0.992
	Control	$y = 0.582491 \cdot e^{0.139926x}$	0.859
L1	Metalaxyl	$y = 0.03039 + 0.418477x - 0.0282x^2$	0.910
	Azibenzolar	$y = 0.148624 \cdot e^{0.129161x}$	0.912
	Quitosano	$y = 0.03039 + 0.015741x - 0.00122x^2$	0.796
	Fosfanato de potasio	$y = 0.020257 + 0.081535x - 0.00584x^2$	0.999
	<i>Trichoderma harzianum</i>	$y = 0.03039 + 0.030243x - 0.0023x^2$	0.870
	<i>Bacillus subtilis</i>	$y = 0.021071 \cdot e^{0.163484x}$	0.871
	Control	$y = 0.013918 \cdot e^{0.069027x}$	0.827
L3	Metalaxyl	$y = 0.343235 + 0.118818x - 0.00874x^2$	0.963
	Azibenzolar	$y = 0.369593 \cdot e^{0.110292x}$	0.924
	Quitosano	$y = 0.343235 + 0.217106x - 0.01625x^2$	0.969
	Fosfanato de potasio	$y = 0.343235 + 0.080803x - 0.00485x^2$	0.901
	<i>Trichoderma harzianum</i>	$y = 0.343235 + 0.564933x - 0.03469x^2$	0.937
	<i>Bacillus subtilis</i>	$y = 0.343235 + 0.505394x - 0.03778x^2$	0.991
	Control	$y = 0.343235 + 0.384843x - 0.02923x^2$	0.986

El genotipo L3 de chile manzano mostró una síntesis de capsidiol, significativamente mayor ($P \leq 0.05$) en respuesta a los inductores biológicos (*T.*

harzianum y *B. subtilis*) a los 7 DDA. Los análisis de regresión para este genotipo revelaron una respuesta cuadrática en la concentración de capsidiol para todos los inductores evaluados, excepto para el acibenzolar el cual presentó una tendencia exponencial. Se predijeron tiempos máximos de 6.8, 6.7, 8.3, 8.1 y 6.7 DDA para el efecto del metalaxil, quitosano, fosfanato de potasio, *T. harzianum* y *B. subtilis*, respectivamente (Cuadro 4).

3.3.3 SEVERIDAD DE LA MARCHITEZ

De acuerdo con las “Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad” para el cultivo de chile de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (2018), un genotipo se considera altamente resistente a *P. capsici*, si muestra un avance de la necrosis en tallo menor a cinco mm por semana. Este criterio se cumplió con el CM334, donde la diferencia entre las mediciones semanales de las necrosis de tallo no superó los cuatro mm (Cuadro 3). Lo que coincide con lo ya mencionado por Castro et al. (2012), Glosier et al. (2008) y Oelke & Bosland (2006); al catalogarlo como la fuente estable y universal de resistencia a *P. capsici*.

En contraste, para ambos genotipos (L1 y L3) de chile manzano, el avance de la necrosis semanal en tallo varió desde los 15 mm hasta los 40 mm (Cuadro 3), que supera significativamente la referencia de los 5 mm establecida por la UPOV (2006), para catalogarlos como variedades resistentes a *P. capsici*. Al respecto, Vallejo et al. (2019), evaluaron a la resistencia de 16 genotipos de chile manzano a *P. capsici* y solo encontraron tolerancia en tres genotipos.

Así mismo, *T. harzianum* registró el menor avance de necrosis en tallo en la L3 de chile manzano ($P \leq 0.05$) a los 14 y 21 DDA (Cuadro 5). En relación con esto, se sabe que *T. harzianum* promueve la acumulación del ácido salicílico en los vasos del floema en plantas tabaco y que esta acumulación activa diferentes mecanismos de defensa independientes entre sí Alfiky & Weisskopf, (2021), Ezziyyani et al. (2005), Khan et al. (2022), Kessmann et al. (1994) y Pieterse et al. (2014). También, Jimenéz et al. (2013), indicaron la acción sistémica de los mecanismo de defensa en plantas de ajo, tratadas con *T. harziamun*, a través de

la acción de enzimas peroxidadas, polifenol oxidasa y de la β -1,3-glucanasa, proteínas involucradas en la acumulación de ácido salicílico y ácido jasmónico, para la posterior indicación de la síntesis de fitoalexinas (Ahuja et al., 2012; Gayoso et al., 2004; Quispe & Garcés, 2022), y la respuesta de la L3 de chile manzano y el tabaco con *T. harzianum* se relaciona al pertenecer a la misma familia botánica (*Solanaceae*).

Cuadro 5. Comparación de medias de mínimos cuadrados Tukey-Kramer, de la interacción Genotipo x Inductor, en la severidad visual de raíz (%) y longitud de necrosis en tallo (mm), a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación en tallo (DDIT), en dos genotipos de chile manzano (L1 y L3) y el chile serrano Criollo Morelos 334 (CM334).

Interacción Genotipo x Elicitor		Necrosis en tallo (mm)			Severidad (%) visual en raíz
		7 DDIT	14 DDIT	21 DDIT	
CM	Metalaxyl	5.29 a	5.83 a	7.88 a	8.33 a*
	Azibenzolar	5.13 a	4.50 a	6.38 a	18.33 a
	Quitosano	4.92 a	7.00 a	8.08 a	20.00 a
	Fosfanato de potasio	3.67 a	6.63 a	8.58 a	5.45 a
	<i>Trichoderma harzianum</i>	6.88 a	7.25 a	9.38 a	28.33 a
	<i>Bacillus subtilis</i>	5.00 a	8.25 a	9.67 a	6.67 a
	Blanco	4.67 a	8.04 a	9.71 a	10.00 a
	Control (sin inocular)	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 b
L1	Metalaxyl	18.63 bc	47.46 b	73.58 bc	27.27 bc
	Azibenzolar	14.11 c	28.00 c	39.21 d	49.09 ab
	Quitosano	33.56 a	51.21 ab	56.11 cd	36.67 b
	Fosfanato de potasio	19.25 bc	45.79 b	73.54 bc	46.67 b
	<i>Trichoderma harzianum</i>	15.00 c	68.79 a	104.50 a	75.00 a
	<i>Bacillus subtilis</i>	17.83 bc	42.79 bc	68.38 bc	33.33 b
	Blanco	28.00 ab	54.67 ab	89.46 ab	51.67 ab
	Control (sin inocular)	0.00 d	0.00 d	0.00 e	0.00 c
L3	Metalaxyl	21.17 a	39.22 ab	35.75 bc	41.67 ab
	Azibenzolar	14.17 a	32.54 b	38.25 bc	29.67 b
	Quitosano	15.54 a	37.67 ab	51.54 abc	40.00 ab
	Fosfanato de potasio	17.29 a	31.58 b	44.58 abc	30.00 ab
	<i>Trichoderma harzianum</i>	14.54 a	23.67 b	30.63 c	41.67 ab
	<i>Bacillus subtilis</i>	19.17 a	51.42 a	54.71 ab	25.00 bc
	Blanco	16.38 a	34.88 ab	61.88 a	53.33 a
	Control (sin inocular)	0.00 b	0.00 c	0.00 d	0.00 c

* Letras minúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$.

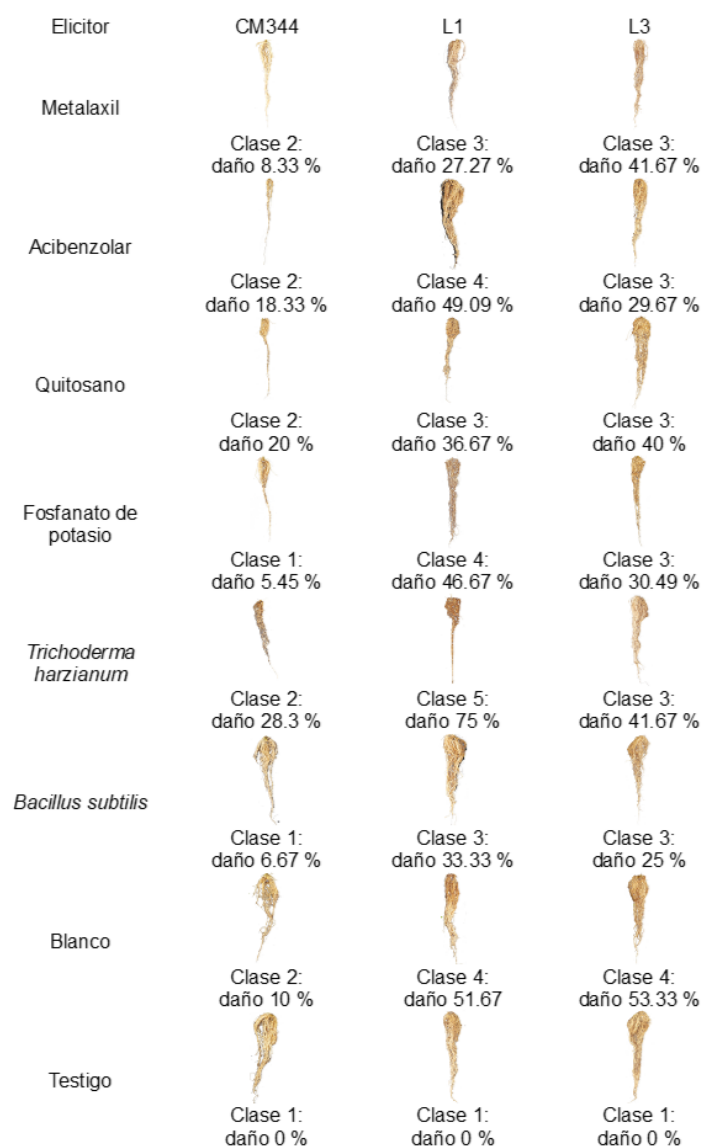


Figura 6. Representación diagramática de la severidad del daño en raíz, de dos genotipos de chile manzano y el CM334, a los 140 de edad, tratadas con seis elicitores e inoculadas con *Phytophthora capsici*.

La severidad del daño visual en raíz para el CM334 vario de 6.67 hasta 28.33 %, que corresponden a las clases 1 y 2 de la escala diagramática para la evaluación de daño físico en raíces de chile manzano, atacadas por *P. capsici* propuesta para la evaluación en este estudio. En contraste, en el chile manzano (L1) vario de 27 a 75 %, que corresponde a las clases de la 2, 3, 4 y 5 de la misma escala. En la L3 la variación fue de 25 hasta 53.33 % y corresponden a las clases 2, 3 y 4 (Figura 6).

3.3.4 RESISTENCIA SITEMICA ADQUIRIDA

El genotipo CM334 destacó por mostrar la mayor concentración de capsidiol (Cuadro 4), menor severidad de daño visual en raíz y menor longitud de necrosis en tallo (Cuadro 5). Estos resultados reflejan la importancia del capsidiol en la defensa contra fitopatógenos en el cultivo de chile. Dichos resultados son consistentes con el estudio de Villar-Luna et al. (2015), que encontraron una mayor acumulación de capsidiol en el patosistema incompatible del CM334 y *Meloidogyne incógnita* que evitó el establecimiento del nematodo en las células vegetales de raíz, en comparación con el patosistema compatible con *Nacobus aberrans* que produjo enfermedad.

Para la L1 y L3 del chile manzano, las concentraciones de capsidiol fueron menores significativamente con relación al CM334 (0.081 y 1.067 mg·ml⁻¹·g⁻¹ de raíz a los 7 DDA, respectivamente). Estos niveles están por debajo del umbral de la fungitoxicidad según Egea et al. (1996a), lo que se reflejó en el daño visual de raíz con una severidad estimada de 25 al 75 % (Cuadro 5), además de una longitud de necrosis de tallo final de hasta 100 mm, en la L1, lo que cataloga a estas líneas como susceptibles al ataque de *P. capsici*.

En relación con la acción de los elicitores, el quitosano fue el de mayor concentración de capsidiol, a los 7 DDA, en el CM334 y en la L3 de chile manzano. Además, el quitosano con la L3 tuvo una severidad media de daño de raíz (40 %) y longitud de necrosis en tallo (de 15.54 a 51.54 mm). De acuerdo con Riseh et al. (2022) el efecto de activación de los genes de defensa por el quitosano se relaciona con la producción de quitinasa y acumulación de ácido jasmónico. También Ueeda et al. (2005) lo vinculan con la acumulación de iones de calcio en la pared celular, y de acuerdo con Chavéz-Díaz & Zavaleta-Mejía, (2019) son parte fundamental para alcanzar la resistencia a *P. capsici*.

Trichoderma harzianum, fue el segundo elicitor con mayor concentración de capsidiol ($P \leq 0.05$) a los 7 DDA. En particular, la L3 de chile manzano este tratamiento fue el de mayor producción de capsidiol con 2.598 mg·mL⁻¹·g de raíz a los 7 DDA, no obstante, fue de los tratamientos con mayor severidad de daño

visual de raíces con 41.67 % ($P \leq 0.05$). Estos resultados concuerdan con los indicados por Ahmed et al. (2000), en plantas de “bell pepper”, ya que las lesiones necróticas producidas por *P. capsici* continuaron su progreso aún con la presencia de *T. harzianum*. Lo anterior, se atribuye al mecanismo de acción del *Trichoderma*, que al invadir las células vegetales de raíz desencadenan la síntesis de compuestos fenólicos en las paredes celulares y de esta manera el desarrollo del microorganismo benéfico se limita, además, *Trichoderma* segrega proteínas como xylanasa y celulasa relacionadas con lesiones necróticas en la raíz (Shoresh et al., 2010).

3.4 CONCLUSIONES

La producción y acumulación del capsidiol es una estrategia que usan las plantas de chile para defenderse al ataque de los patógenos, lo cual se reflejó en lo observado en el chile serrano Criollo Morelos 334 que fue resistente, en contraste las dos líneas de chile manzano (L1 y L3) que fueron susceptibles a la enfermedad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici* Leo.

Los diferentes elicitores utilizados mostraron variaciones en su eficacia para inducir la producción de capsidiol y la resistencia sistémica adquirida. El quitosano y *Trichoderma harzianum* destacaron por sus efectos en la producción de capsidiol lo que desencadena una serie de procesos de defensa de manera local y sistémica en la planta, para el combate de *Phytophthora capsici* Leo.

3.4 LITERATURA CITADA

- Ahmed, A. S., Pérez, S. C., & Candela, M. E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 817-824. <https://doi.org/10.1023/A:1008780022925>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73-90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>
- Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), Article 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- Arreola-Cortés, A., Castro-Mercado, E., Lozoya-Gloria, E., & García-Pineda, E. (2007). Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1-3), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.07.002>
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7), 233-240. [https://doi.org/10.1016/1360-1385\(96\)86901-9](https://doi.org/10.1016/1360-1385(96)86901-9)
- Castro R., A., Fernández P., S. P., & Osuna Á., P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum*-*Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 49-65. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092012000100005&script=sci_arttext
- Chávez-Díaz, I. F., & Zavaleta-Mejía, E. (2019). Molecular communication in the pathosystem *Capsicum* species -*Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(2), 251-278. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1901-3>

- Choi, H. W., & Hwang, B. K. (2015). Molecular and cellular control of cell death and defense signaling in pepper. *Planta*, 241(1), 1-27. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2171-6>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289-297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., & Kohler, A. (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 113-119. <https://doi.org/10.1023/A:1008768516313>
- Delgado-Oramas, P. B. (2020). La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 35(1), Article e07. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522020000100001&script=sci_arttext&lng=en
- Egea, C., Alcázar, M. D., & Candela, M. E. (1996a). Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 737-742. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb06679.x>
- Egea, C., Pérez, M. D. G., & Candela, M. E. (1996b). Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 149(6), 762-764. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80104-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80104-0)
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2005). Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*. 27, 143-153. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/29941/29141>
- Garagounis, C., Delkis, N., & Papadopoulou, K. K. (2021). Unraveling the roles of plant specialized metabolites: using synthetic biology to design molecular

biosensors. *New Phytologist*, 231(4), 1338-1352.
<https://doi.org/10.1111/nph.17470>

Gayoso, C., Pomar, F., Merino, F., & Bernal, M. A. (2004). Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*, 102(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.015>

Giannakopoulou, A., Schornack, S., Bozkurt, T. O., Haart, D., Ro, D. K., Faraldos, J. A., & O'Maille, P. E. (2014). Variation in capsidiol sensitivity between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora capsici* is consistent with their host range. *PLoS One*, 9(9), Article e107462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107462>

Glosier, B. R., Ogundiwin, E. A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., & Prince, J. P. (2008). A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica*, 162(1), 23-30. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9532-1>

Godínez-Paoli, R., Leyva-Mir, S. G., García-Mateos, M. D. R., Magdaleno-Villar, J., Cruz-Alvarez, O., & Martínez-Damián, M. T. (2020). Fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia en híbridos comerciales de pimiento morrón inoculados con *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(2), 258-268. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-1>

Guarnizo, N., Oliveros, D., Murillo-Arango, W., & Bermúdez-Cardona, M. B. (2020). Oligosaccharides: Defense inducers, their recognition in plants, commercial uses and perspectives. *Molecules*, 25(24), Article 5972.
<https://doi.org/10.3390/molecules25245972>

Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503-512. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf076>

- Jiménez, M. A., Asdrubal, A., Ulacio, D., & Hernández, A. (2012). Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones de campo. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 3(1), 14-25. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=s2072-92942012000100003&script=sci_arttext
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S., & Ryals, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 439-459. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.002255>
- Khan, M. I. R., Poor, P., & Janda, T. (2022). Salicylic acid: A versatile signaling molecule in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(5), 1887-1890. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10692-4>
- Kuč, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 7-12. <https://doi.org/10.1023/A:1008718824105>
- Lyon, G. D. (2014). Agents that can elicit induced resistance. In D. R. Walters, A. C. Newton, & G. D. Lyon, (Eds.), *Induced resistance for plant defense* (2nd ed, pp. 11-40). Jhon Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118371848.ch2>
- Maldonado-Bonilla, L. D., Betancourt-Jiménez, M., & Lozoya-Gloria, E. (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 439-449. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9262-1>
- Meena, M., Yadav, G., Sonigra, P., Nagda, A., Mehta, T., Swapnil, P., & Marwal, A. (2022). Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. *Plant Stress*, 5, 100103. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100103>

- Oelke, L. M., Bosland, P. W., & Steiner, R. (2003). Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 213-218. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.2.0213>
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B., & Staub, T. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 19-28. <https://doi.org/10.1023/A:1008760518772>
- Pérez, G. M. y R. Castro B. (2012). *El chile manzano*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Perez-Grajales, M., Martínez-Damián, M. T., Cruz-Álvarez, O., Potrero-Andrade, S. M., Peña-Lomeli, A., González-Hernández, V. A., & Villegas-Monter, A. (2019). Content of capsaicinoids and physicochemical characteristics of manzano hot pepper grown in greenhouse. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 119-127. <https://doi.org/10.15835/nbha47111241>
- Pérez-Grajales, M., Pérez-Reyes, T. Q., Cruz-Álvarez, O., Castro-Brindis, R., & Martínez-Damián, M. T. (2021). Compatibilidad del portainjerto CM-334 y su respuesta sobre el rendimiento, calidad fisicoquímica y contenido de capsaicinoides en frutos de *Capsicum pubescens*. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 117(4), 332-346. <https://doi.org/10.12706/itea.2021.003>
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Puente, G. B., Torres, L. E. E., Hernández, E. F., & Abarca, O. R. (2014). Evaluación técnica, financiera y comercial de los sistemas de producción de chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P) en México. *Análisis*

Económico, 29(71), 209-219.
<https://www.redalyc.org/pdf/413/41333722010.pdf>

Quispe-Quispe, E., Moreira-Morrillo, A. A., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). A review about biocontrollers of *Phytophthora capsici* and its impact on *Capsicum* plants: A perspective from outside to inside the plant. *Scientia Agropecuaria*, 13(3), 275-289.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.025>

Riseh, R. S., Hassanisaadi, M., Vatankhah, M., Babaki, S. A., & Barka, E. A. (2022). Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 998-1009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.109>

Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., & Rocha, S. M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>

Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>

Song, N., Ma, L., Wang, W., Sun, H., Wang, L., Baldwin, I. T., & Wu, J. (2019). An ERF2-like transcription factor regulates production of the defense sesquiterpene capsidiol upon *Alternaria alternata* infection. *Journal of Experimental Botany*, 70(20), 5895-5908.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz327>

Ueeda, M., Kubota, M., & Nishi, K. (2005). Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3-5), 149-154.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.12.002>

- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. (2018). *Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad: ají, chile, pimienta*. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg076.pdf>
- Vallad, G. E., & Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44(6), 1920-1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
- Vallejo-Gutiérrez, A. J., Mejía-Carranza, J., García-Velasco, R., & Ramírez-Gerardo, M. G. (2019). Respuesta de genotipos de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 50-70. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092019000100004&script=sci_arttext
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 753-765. <https://doi.org/10.1023/A:1008638109140>
- Villar-Luna, H., Reyes-Trejo, B., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., & Zavaleta-Mejía, E. (2015). Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción compatible chile CM334/*Nacobbus aberrans* incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 45(1), 9-19. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/85048>
- Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., & Lozoya-Gloria, E. (2008). Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEAS1*) from chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, 110(3), 410-418. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2000.1100316.x>

CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA DEL CHILE SERRANO CRIOLLO MORELOS CM-344, RESISTENTE A *Phytophthora capsici* (2do ciclo).

RESUMEN

El chile serrano (*Capsicum annuum*) Criollo Morelos 344 (CM344) es una de las fuentes más estables de resistencia ante la enfermedad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici*, por lo que este genotipo se emplea en el desarrollo de diferentes estrategias de manejo de la enfermedad. En el presente estudio, se tuvo como objetivo realizar el segundo ciclo de caracterización morfológica en el CM344 para contar con la información necesaria dentro de un esquema de registro ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. La caracterización se llevó a cabo bajo las directrices de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y estabilidad de *Capsicum*. El estudio se efectuó en 24 plantas del CM344 resistente a *P. capsici*, y en 6 plantas de la variedad Mayito de chile manzano como referencia susceptible. Para determinar la resistencia o susceptibilidad, en ambos genotipos, se inoculó con *P. capsici* los tallos de las plantas a través de discos de tomate-agar con micelio del fitopatógeno. Como resultado en el CM344, se describieron 40 variables cuantitativas (porte, hoja, tallo, flor y fruto) y 7 cualitativas (pigmentación y presencia de capsaicina y entrenudos acortados de tallo), y se confirmó la resistencia del CM344 y la susceptibilidad de Mayito a *P. capsici*.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Efrén Cíntora Portugal

Dirección: Dr. Mario Pérez Grajales

CHAPTER IV. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CRIOLLO MORELOS 344 SERRANO PEPPER, *Phytophthora* *capsici* RESISTANT (2ND CYCLE)

ABSTRACT

The Criollo Morelos 344 (CM344) serrano pepper (*Capsicum annuum*) is one of the most stable sources of resistance to wilt disease caused by *Phytophthora capsici*, so this genotype valuable in the development of distinct disease management strategies. In this study, the objective was to conduct the second cycle of morphological characterization in CM344 to provide the necessary information within a registration scheme with the Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. The characterization was followed the guidelines of the International Union for the Protection of New Varieties of Plants for conduct of test for distinctness, uniformity, and stability of *Capsicum*. The study was conducted on 24 plants of CM344 resistant to *P. capsici*, and 6 of Mayito's variety of manzano pepper as susceptible reference. To determine resistance or susceptibility in both genotypes, plant stems were inoculated with *P. capsici*, using tomato-agar disks containing mycelium phytopathogen. In CM344, 40 quantitative variables (plant structure, leaf, stem, flower, and fruit) and 7 qualitative variables (pigmentation and presence of capsaicin and shortened stem internodes) were described. Confirming the resistance of CM344 and the susceptibility of Mayito to *P. capsici*.

Tesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Efrén Cíntora Portuguese

Advisor: Dr. Mario Pérez Grajales

4.1 INTRODUCCIÓN

México es el segundo productor de chile (*Capsicum* sp.) con 3.11 millones de toneladas en el 2022 (Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura, 2024). De las cuales, el 81.6 % corresponden a los tipos jalapeño, pimienta, poblano, serrano y chilaca (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2024).

El cultivo de chile representa una tradición en la cultura y en la dieta mexicana (Aparicio-del-Moral et al., 2013), presenta amplia diversidad morfológica y genética, con variaciones de tamaño, forma, color y pungencia; aporta minerales, proteínas, fibras y compuestos antioxidantes como flavonoides, fenoles, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina A y capsaicinoides (Mis-Valdez et al., 2022).

Debido al proceso de coevolución de las plantas cultivadas con diversos microorganismos fitopatógenos, se presentan limitaciones en la producción conocidas como enfermedades (Agrios, 1995). En este sentido, una de las enfermedades más importantes para el cultivo del chile es la marchitez causada por *Phytophthora capsici* Leo., que se encuentra distribuida en prácticamente todas las zonas productoras de chile en México (Apodaca et al., 2004; Gómez-Hernández et al., 2018; Morán et al., 2010; Silva-Rojas et al., 2009; Vallejo et al., 2018).

Una de las principales estrategias para el manejo de la marchitez es el uso de variedades resistentes (Agrios, 1995). Las investigaciones en este campo han revelado la complejidad genética de la resistencia, identificando diversos genes y loci asociados a la respuesta del chile ante la infección (Villar-Luna et al., 2022; Wang et al., 2016). En particular, el chile serrano Criollo Morelos 344 (CM344) es conocido por su resistencia estable a lo largo de generaciones y ha sido clave en la búsqueda de estrategias para mitigar los efectos devastadores de *P. capsici* (Castro et al., 2012; García-Rodríguez et al., 2010; Pérez et al., 2021).

Debido a la importancia de este genotipo en los procesos de mejoramiento genético y su uso como portainjerto resistente a *P. capsici*, se planteó realizar la segunda caracterización morfológica del chile serrano Criollo Morelos 344 (CM334) mediante las directrices de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (2018) para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad de *Capsicum* con la finalidad de obtener la información necesaria de los descriptores morfológicos, y confirmar su resistencia a *P. capsici*, comparado con la variedad Mayito de chile manzano.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 SITIO EXPERIMENTAL

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada en Chapingo, México, en un invernadero con cubierta de vidrio con temperatura media de 15.9 °C; humedad relativa media de 61.5 % y radiación media de 470.73 lum·sqf⁻¹·día⁻¹.

4.2.2 MATERIAL VEGETAL

Se utilizó el chile serrano Criollo Morelos 344 (CM344), resguardado en el programa de mejoramiento genético de chile manzano de la Universidad Autónoma Chapingo. Como testigo susceptible se utilizó la variedad de chile manzano 'Mayito', con registro SNICS 3290. La siembra se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades, como sustrato se empleó turba ("peat-moss") húmeda, las semillas se colocaron a una profundidad de dos centímetros y se cubrieron con vermiculita. A los 70 días después de la emergencia, se trasplantaron a macetas de polivinilo con capacidad de 15 L con tezontle rojo como sustrato. Las plantas fueron regadas con solución nutritiva Steiner al 50 % con 490 mL·día⁻¹ fraccionado en 10 riegos.

4.2.3 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

De acuerdo con la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, en sus directrices para la ejecución del examen de la distinción, homogeneidad y la estabilidad en *Capsicum* (2018), se realizó la caracterización en 24 plantas del CM344, a las cuales se les evaluó 40 caracteres morfológicos cuantitativos y 7 cualitativos. De los 40 cuantitativos, cinco fueron de planta completa, dos de tallo, ocho de hoja y 25 de fruto. De las siete cualitativas, cuatro fueron de pigmentación, uno de tamaño de entrenudo, uno de aspecto de cáliz y uno de la presencia de capsaicina.

4.2.4 PRUEBA DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici*

Se utilizó la cepa 6143 de *Phytophthora capsici*, proveniente de la colección resguardada por el Laboratorio de Micología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo. El oomiceto se cultivó por cinco días en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo tomate-agar, las cuales se colocaron en una incubadora a 24 °C. La inoculación se realizó en plantas con 90 días de edad, a las cuales se le cortó el tallo a la altura de la primera bifurcación. Posteriormente, a cada tallo se le colocó un disco de 5 mm con medio de cultivo y micelio de *P. capsici*. La evaluación consistió en medir la longitud de la necrosis en el tallo a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, 2018).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Descripción morfológica

El chile serrano Criollo Morelos 344 es una planta con ciclo productivo anual. El hipocótilo de las plántulas (Figura 7-a) tiene presencia de antocianinas. La altura final de la planta fue de 100.24 ± 11.07 cm, con porte erecto, longitud de tallo de 24.47 ± 8.5 cm y ausencia de entrenudos acortados con longitud de 8.85 ± 1.82 cm. Tiene presencia de pigmentación antociánica muy fuerte en los entrenudos (Figura 7-b), con pilosidad en los entrenudos en el 95 % de las plantas.

Las hojas presentaron un color verde con intensidad clara y brillo medio, de forma lanceolada, con longitud de limbo corto y una anchura estrecha de 6.899 ± 0.63 y 2.92 ± 0.31 cm, respectivamente. Carece de la presencia de ondulación en el margen, así como de abullonado del limbo y tiene un perfil transversal plano (Figura 7-c, d).

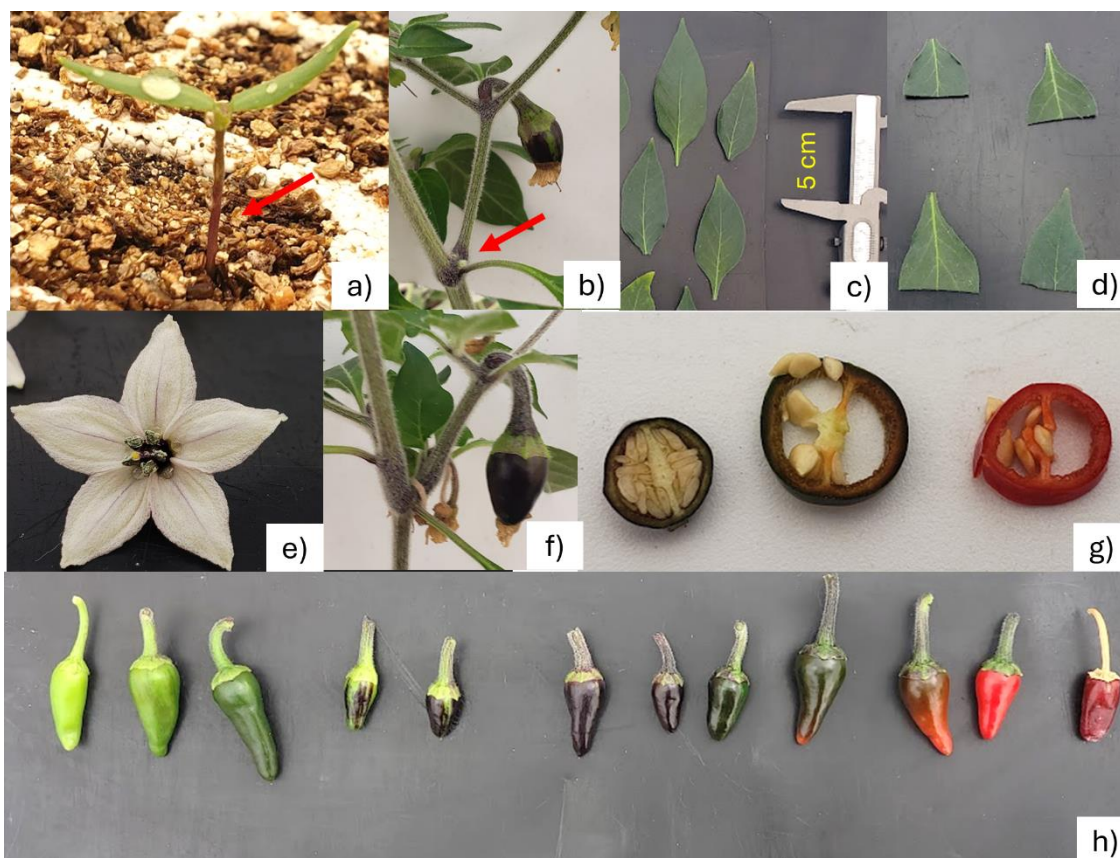


Figura 7. Caracteres morfológicos evaluado en el CM344; a) Presencia de antocianinas en hipocótilo, b) presencia de antocianinas en entrenudos, c) color y tamaño del limbo de la hoja, d) corte transversal de hoja, e) forma, color y presencia de antocianinas en flor, f) porte de fruto en planta, g) número de lóculos y color de semilla en fruto, h) proceso de maduración de fruto.

La producción floral es tardía con flores blancas de cinco pétalos y pigmentación antociánica y posee cinco anteras con pigmentación antociánica (Figura 7-e). Los frutos comienzan de un color verde oscuro pasando por un color púrpura y terminando en color rojo con intensidad media y brillo fuerte, al finalizar la madurez tardía (Figura 7-h). La forma longitudinal del fruto es moderadamente triangular con el ápice muy agudo, con longitud de 2.9 ± 0.4 cm y diámetro de 1.5

± 0.1 cm, lo que proporciona una relación de 1.7 ± 0.2 y la pulpa tiene un espesor de 1.73 ± 0.27 mm. Su pedúnculo presenta pigmentación antociánica (Figura 7-f).

El cáliz es de forma envolvente al fruto, con pedúnculo de porte intermedio y longitud de 1.88 ± 0.24 cm y espesor de 3.77 ± 0.38 mm y ausencia de cavidad peduncular. No presenta sinuosidad en el pericarpio en ninguna de las secciones del fruto (basal y apical) y su textura es lisa. Presenta predominantemente, dos lóculos sin presencia de surcos interloculares en el pericarpio. La forma transversal del fruto es redonda y cuenta con semillas de color blanco de 3.1 ± 0.02 mm de diámetro (Figura 7-g).

4.3.2 Resistencia a *Phytophthora capsici*

La longitud media de necrosis en el CM344 a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación con *P. capsici* fue de 7.41 ± 3.14 , 8.78 ± 4.41 y 10.12 ± 8.17 mm, respectivamente; mientras que, en la variedad Mayito, fueron de 39.4 ± 8.71 , 87.8 ± 13.7 y 127.2 ± 16.51 mm, respectivamente. Los rangos para determinar si una variedad es resistente a *P. capsici*, de acuerdo con la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (2018), es que la diferencia en la longitud de necrosis sea menor a 5 mm por semana y si supera los 8 mm la variedad se considerará como susceptible. En este sentido la diferencia en la longitud de necrosis en CM344 fue de 1.37 y 1.34 mm por semana, en contraste la diferencia en 'Mayito' fue de 48.4 y 39.4 mm. De esta manera, se concluye que el chile serrano CM344 es resistente y la variedad Mayito de chile manzano es susceptible a *Phytophthora capsici*.

Los resultados obtenidos en relación con la resistencia a *P. capsici*, refuerza lo mencionado por Castro et al. (2012) y Villar-Luna et al. (2022) al identificar al CM344 como fuente de resistencia. Y es consistente con los estudios de Glosier et al. (2008), Pérez et al. (2021) y Oelke et al. (2006) quienes encontraron que no hay manifestación de la marchitez en el CM344, con la presencia del oomiceto; así como Villar-Luna et al, (2015), quienes determinaron que el CM344 genera

una alta producción de fitoalexinas de defensa ante la presencia de fitopatógenos.



Figura 8. Avance de la necrosis de tallo provocado por la inoculación de *Phytophthora capsici*, a los 21 días después de la inoculación en plantas de chile manzano (izquierda, las primeras cinco plántulas) y plantas CM344 (derecha, ocho últimas plántulas).

4.4 CONCLUSION

En el CM344 se describieron, 40 variables morfológicas cuantitativas (porte, hoja, tallo, flor y fruto) y 7 cualitativas (pigmentación y presencia de capsaicina y entrenudos acortados de tallo), de acuerdo con las directrices para la ejecución del examen de la distinción, homogeneidad y la estabilidad en *Capsicum*, de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). También se confirmó la resistencia a *P. capsici* del CM344 y la susceptibilidad de la variedad Mayito de chile manzano.

4.5 LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. (1995). *Fitopatología* (Segunda edición). Limusa.

Aparicio-del-Moral, J. O., Tornero-Campante, M. A., Sandoval-Castro, E., Villarreal-Manzo, L. A., & de los Ángeles Rodríguez-Mendoza, M. (2013). Factores sociales y económicos del cultivo de chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en tres municipios de los valles centrales de Oaxaca. *Ra Ximhai*, 9(1), 17-24. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46127074003.pdf>

Apodaca, S., M., Á., Zavaleta M., E., Osada K., S., García, E., R., & Valenzuela, U., J., G. (2004). Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1), 22-29. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222104.pdf>

Castro R., A., Fernández P., S. P., & Osuna Á., P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 49-65. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092012000100005&script=sci_arttext

García-Rodríguez, M. R., Chiquito-Almanza, E., Loeza-Lara, P. D., Godoy-Hernández, H., Villordo, P., E., Pons-Hernández, J. L., González-Chavira, M. M., & Anaya-López, J. L. (2010). Producción de chile ancho injertado sobre criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia*, 44(6), 701-709. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952010000600009&script=sci_arttext

Glosier, B. R., Ogundiwin, E. A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., & Prince, J. P. (2008). A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica*, 162(1), 23-30. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9532-1>

- Gómez-Hernández, D., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chávez-Servia, J. L., & Perales-Segovia, C. (2018). Pathogenicity of *Phytophthora capsici* Leon and *Rhizoctonia solani* Khün, on seedlings of 'costeño' pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Bio Ciencias*, 5(1), e356. <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e356>
- Mis-Valdez, Y. A., Hernández, P., M. J., Garruña, R., Medina, D., K. B., & Andueza-Noh, R. H. (2022). Características fenotípicas, nutricionales y nutraceuticas de frutos de chile x catik, dulce y su híbrido F1 (*Capsicum annuum* L.). *Polibotánica*, (53), 183-195. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.53.12>
- Morán-Banuelos, S. H., Aguilar-Rincon, V. H., Corona-Torres, T., & Zavaleta-Mejia, E. (2010). Resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 21-26. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802010000500006&script=sci_abstract&lng=en
- Oelke, L. M., Bosland, P. W., & Steiner, R. (2003). Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 213-218. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.2.0213>
- Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. (2024). *Cultivos y productos de ganadería*. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Pérez-Grajales, M., Pérez-Reyes, T. Q., Cruz-Álvarez, O., Castro-Brindis, R., & Martínez-Damián, M. T. (2021). Compatibilidad del portainjerto CM-334 y su respuesta sobre el rendimiento, calidad fisicoquímica y contenido de capsaicinoides en frutos de *Capsicum pubescens*. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 117(4), 332-346. <https://doi.org/10.12706/itea.2021.003>

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2024). *Anuario estadístico de la producción agrícola*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Silva-Rojas, H. V., Fernández-Pavia, S. P., Góngora-Canul, C., Macías-López, B. C., & Ávila-Quezada, G. D. (2009). Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 134-147. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092009000200006&script=sci_abstract&tlng=pt
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. (2018). *Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad: ají, chile, pimienta*. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg076.pdf>
- Vallejo-Gutiérrez, A. J., Mejía-Carranza, J., García-Velasco, R., & Ramírez-Gerardo, M. G. (2019). Respuesta de genotipos de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 50-70. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092019000100004&script=sci_arttext
- Villar-Luna, H., Reyes-Trejo, B., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., & Zavaleta-Mejía, E. (2015). Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción compatible chile CM334/*Nacobbus aberrans* incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 45(1), 9-19. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/85048>
- Villar-Luna, H., Corona-Torres, T., Castillo-González, F., Gómez-Rodríguez, O., Segura-León, O., & Aguilar-Rincón, V. H. (2022). Genética de la

resistencia a *Phytophthora capsici* de la línea de chile 41-1 (*Capsicum annuum*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(2), 211-217.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2022.2.211>

Wang, P., Wang, L., Guo, J., Yang, W., & Shen, H. (2016). Molecular mapping of a gene conferring resistance to *Phytophthora capsici* Leo. race 2 in pepper line PI201234 (*Capsicum annuum* L.). *Molecular Breeding*, 36, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0464-0>

CONCLUSIONES GENERALES

Se consiguió activar la Resistencia Sistémica Adquirida en plántulas de chile manzano, al recuperar la masa seca y volumen de raíces a los 35 días después de la inoculación con la cepa atenuada de *Phytophthora capsici*.

El uso de elicitores promovió la síntesis de capsidiol en plántulas de chile manzano y en el Criollo Morelos 344. La mayor concentración de capsidiol ($5.38 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}$ de raíz) se consiguió en el CM344 con la aplicación de quitosano y la mejor manifestación de Resistencia Sistémica Adquirida en chile manzano fue con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*.

En el CM344 se describieron 40 variables morfológicas cuantitativas (porte, hoja, tallo, flor y fruto) y 7 cualitativas (pigmentación y presencia de capsaicina y entrenudos acortados de tallo) con las directrices de la UPOV. También se confirmó la resistencia del CM344 a *P. capsici* y la susceptibilidad del chile manzano variedad Mayito.