



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA EN
CALABAZAS (*Cucurbita* spp.) AL DAMPING-OFF**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias en
Protección Vegetal**

**Presenta:
ALEXANDER PÉREZ MICELI**



**DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**

Chapingo, México. Diciembre de 2002.



Bib. 98468

**OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA EN
CALABAZAS (*Cucurbita* spp.) AL DAMPING-OFF**

Tesis realizada por Alexander Pérez Miceli bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: _____

Dr. Cecilio Mendoza Zamora † (q.e.p.d)

CO-DIRECTOR: _____

Dr. Clemente Villanueva Verduzco

ASESOR: _____

Dr. Victor Manuel Pinto

ASESOR: _____

Dr. Samuel Ramírez Alarcón

Chapingo, México; Diciembre de 2002.

A. 40545

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mis estudios de Maestría en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Chapingo, que gracias al apoyo que brinda a cada uno de sus estudiantes, me ha permitido concluir una Maestría en Ciencias.

Al Departamento de Parasitología Agrícola por el apoyo brindado.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco, de una manera muy especial a quién agradezco el apoyo en la planeación y dirección de este trabajo y por su invaluable amistad.

A los profesores: Dr. Victor Manuel Pinto y Dr. Samuel Ramírez Alarcón, por su acertada asesoría en el presente trabajo de investigación, su confianza y amistad.

A la Ing. Irma Sánchez por sus enseñanzas en los aspectos de cultivo de tejidos y por su amistad.

Al M. C. Isaías Gil Vazquez por su amistad y por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología del Depto. de Preparatoria Agrícola.

Al Sr. Maximino Ramírez, por la ayuda brindada en la fase de invernadero y campo.

Al Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza por sus consejos, apoyo y dedicación brindados.

A la Sra. Aurora Huerta por su apoyo durante mi estancia en la Maestría.

DEDICATORIA

A TI SEÑOR, por brindarme la oportunidad de vivir y rodearme de seres maravillosos que son el motivo de mis deseos de superación.

A MIS PADRES: Angel Pérez Fernández y Amalia Miceli García

Con todo mi amor y agradecimiento eterno, por hacer realidad mis sueños. A ti mamá por ser esa gran mujer que admiro y amo, que me ha dado a manos llenas su amor, ternura, comprensión y a ti papi por ser ese hombre sensato y cariñoso que me hace ver mis errores para ser cada día mejor y porque siempre tienes la respuesta correcta a todas mis preguntas.

A MIS HERMANOS: María de los Angeles, José Luis y Angelo

Por contagiarme sus enormes ganas de vivir y enseñarme a desafiar al mundo con inteligencia.

A mi Novia: Biól. Georgina Margarita Beltrán Rjos.

Por sus consejos, ayuda y motivación recibida de Ella y por darle ese toque mágico a mi vida. T. Q. M.

A un gran amigo el Dr. Cecilio Mendoza Zamora (†), por su apoyo incondicional y por enseñarme a enfrentar y resolver los problemas de la vida, por más difíciles que estos fueran (In memoriam).

A mis amigos, miembros de la Generación 28 de la Maestría en Protección Vegetal.

DATOS BIOGRÁFICOS DEL AUTOR

Alexander Pérez Miceli nació el 8 de Febrero de 1976, en el Municipio de Villaflores, Chiapas.

Sus estudios Básicos los realizó en ese Municipio en el período comprendido entre 1983-1992. En 1992, ingresó a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

En 1995, ingresó al Departamento de Parasitología Agrícola, de donde en 1999 egresa obteniendo el Título de Ing. Agr. Especialista en Parasitología Agrícola.

Su desempeño profesional lo realizó en la Compañía Transnacional "Del Monte Fresh Products Inc" donde fue miembro del Departamento de Control Fitosanitario en una Finca de 1 000 hectáreas de Melón de Exportación, en el Municipio de Arcelia, Guerrero, México.

En el 2001-2002, cursó la Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	4
Hipótesis	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. El cultivo de calabaza	5
2.1.1. Origen y distribución	5
2.1.2. Posición taxonómica	6
2.1.3. Generalidades botánicas	6
2.1.4. Composición genética del género	7
2.1.5. Importancia	7
2.1.6. Principales usos	9
2.1.6.1. Alimenticio	9
2.1.6.2. Industrial-comercial	10
2.1.6.3. Medicinal	11
2.1.6.4. Otros	11
2.1.7. Valor nutritivo	11
2.2. Mejoramiento genético	14
2.3. Resistencia genética	15
2.3.1. Tipos de resistencia	15
2.3.2. Estudios de resistencia a enfermedades de la raíz en Cucurbitáceas	16
2.4. Principales enfermedades radicales en Cucurbitáceas	20
2.4.1. Marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend. : Fr. W. C. Snyder & H. N. Hansen	20

2.4.1.1.	Importancia y distribución	20
2.4.1.2.	Diversidad de hospedante	21
2.4.1.3.	Epidemiología y ciclo biológico	21
2.4.1.4.	Síntomas	22
2.4.1.5.	Medidas de control	23
2.4.1.5.1.	Control biológico	23
2.4.1.5.2.	Control genético	24
2.4.1.5.3.	Control cultural	24
2.4.1.5.4.	Control químico	25
2.4.2.	Ahogamiento y pudrición radicular por <i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp	25
2.4.2.1.	Importancia y distribución	25
2.4.2.2.	Diversidad de hospedantes	26
2.4.2.3.	Epidemiología y ciclo biológico	26
2.4.2.4.	Síntomas	27
2.4.2.5.	Medidas de control	28
2.4.2.5.1.	Control biológico	28
2.4.2.5.2.	Control genético	28
2.4.2.5.3.	Control cultural	28
2.4.2.5.4.	Control químico	29
2.4.3.	Pudrición radicular y marchitez por <i>Phytophthora capsici</i> Leonian (1992) emend. A. Alizadeh and P. H. Tsao (1988); Tsao (1991); Mchau and Coffey (1995)	29
2.4.3.1.	Importancia y distribución	29
2.4.3.2.	Diversidad de hospedantes	30
2.4.3.3.	Epidemiología y ciclo biológico	31
2.4.3.4.	Síntomas	31

2.4.3.5.	Medidas de control	32
2.4.3.5.1.	Control cultural	32
2.4.3.5.2.	Control genético	32
2.4.3.5.3.	Control químico	32
2.4.4.	Pudrición de la raíz y cuello <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	33
2.4.4.1.	Importancia y distribución	33
2.4.4.2.	Diversidad de hospedantes	33
2.4.4.3.	Epidemiología y ciclo biológico	34
2.4.4.4.	Síntomas	34
2.4.4.5.	Medidas de control	35
2.4.4.5.1.	Control biológico	35
2.4.4.5.2.	Control cultural	35
2.4.4.5.3.	Control químico	35
2.5.	El cultivo de tejidos	36
2.5.1.	Importancia	36
2.5.2.	Antecedentes en calabaza y otras Cucurbitáceas	37
2.5.3.	Fases del proceso de multiplicación <i>in vitro</i>	39
2.5.4.	Aclimatación desde el medio de cultivo al invernadero-suelo	40
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1.	Fase de invernadero	43
3.1.1.	Ubicación del experimento	43
3.1.2.	Material genético evaluado	43
3.1.3.	Diseño experimental	44
3.1.4.	Modelo estadístico	45
3.1.5.	Aislamiento e incremento del inóculo	45
3.1.6.	Preparación del inóculo	46
3.1.7.	Siembra e inoculación	47
3.1.8.	Riegos	48

3.1.9.	Evaluación de variables	49
3.1.9.1.	Porcentaje de germinación	49
3.1.9.2.	Muerte Post-emergente	50
3.1.9.3.	Incidencia	50
3.1.9.4.	Severidad	50
3.1.9.5.	Porcentaje de infección	51
3.1.10.	Reaislamiento de patógenos	51
3.1.11.	Transplante a suelo acolchado de plantas resistentes en invernadero	52
3.1.12.	Polinización controlada	53
3.1.13.	Cosecha de frutos	53
3.2.	Fase de laboratorio	57
3.2.1.	Cosecha de explantes	57
3.2.2.	Desinfección de explantes	57
3.2.3.	Medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962)	58
3.2.4.	Siembra de explantes	59
3.2.5.	Fase de multiplicación	61
3.2.6.	Fase de enraizamiento y elongación	62
3.3.	Fase de aclimatación de plántulas propagadas <i>in vitro</i>	63
3.3.1.	Transporte	63
3.3.2.	Sustrato	64
3.3.3.	Desinfección de charolas	64
3.3.4.	Lavado y desinfección de plántulas	64
3.3.5.	Transplante a invernadero y aclimatación	65
3.3.6.	Riegos	66
3.4.	Fase de campo	66
3.4.1.	Transplante	66
3.4.2.	Fertilización	67
3.4.3.	Control de malezas	67
4.	RESULTADOS	68
4.1.	Porcentaje de germinación	68

4.2. Incidencia	72
4.3. Severidad como porcentaje de infección.....	74
4.4. Muerte postemergente	76
4.5. Porcentaje de plantas resistentes	78
4.6. Multiplicación <i>in vitro</i> de plantas resistentes	79
4.7. Adaptación de plántulas reproducidas <i>in vitro</i>	80
5. CONCLUSIONES	81
6. LITERATURA CITADA	83

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Nombres usados para designar a las calabazas en diferentes lenguas indígenas en la República Mexicana	8
Cuadro 2. Principales estados productores de calabacita para verdura en el ciclo agrícola 2001 – 2002	9
Cuadro 3. Composición de 100 g de diferentes partes comestibles de la planta de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	12
Cuadro 4. Composición de 100 g de porción fresca de hojas comestibles	13
Cuadro 5. Contenido promedio del néctar producido por una flor en un día de diferentes Cucurbitáceas	14
Cuadro 6. Hongos patogénicos inoculados en calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) para resistencia a enfermedades de la raíz, Chapingo, México, 2001 ...	44
Cuadro 7. Cantidades de nutrientes utilizados para preparar 200 litros de solución nutritiva tipo Steiner, empleada en calabazas (<i>Cucurbita</i> spp) para resistencia a enfermedades de la raíz. Chapingo, México, 2001	49
Cuadro 8. Escala utilizada para evaluar grado de severidad	50
Cuadro 9. Soluciones stock (madre) y sus componentes utilizados para preparar el medio de cultivo MS	60
Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para cuatro variables en la reacción a inoculación controlada en calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.) con hongos del complejo de damping-off. Chapingo, México. 2001	70
Cuadro 11. Comparación de medias para cuatro variables de la reacción de calabaza (<i>C. pepo</i> L.) a la inoculación controlada de hongos causantes de damping-off. Chapingo, México. 2001	71
Cuadro 12. Porcentaje de plantas resistentes de calabaza (<i>C. pepo</i> L.) a diferentes hongos causantes de damping – off en condiciones de invernadero. Chapingo, Méx. 2001.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Daños causados por <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas adultas de calabaza (<i>C. pepo</i> L.)	23
Figura 2. Daños causados por <i>Phytophthora capsici</i> en almácigo	30
Figura 3. Transplante de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.) resistente a <i>Rhizoctonia solani</i> a suelo acolchado en condiciones de invernadero (Agosto, 2001)	54
Figura 4. Esquema metodológico de las fases en invernadero, laboratorio y campo, para obtención de calabazas resistentes a hongos causantes de damping-off. Chapingo, Méx. 2001-2002	55
Figura 5. Flor femenina de calabaza (<i>C. moschata</i>)	56
Figura 6. Flor masculina de calabaza (<i>C. moschata</i>)	56
Figura 7. Frutos maduros de calabaza (<i>Cucurbita moschata</i>) listos para cosecha, de plantas resistentes a damping-off	56
Figura 8. Cosecha de explantes para micropropagación	62
Figura 9. Multiplicación <i>in vitro</i>	62
Figura 10. Elongación de plantas de calabaza (<i>C. pepo</i> L.) producidas <i>in vitro</i>	63
Figura 11. Plantas producidas mediante cultivo de tejidos y aclimatadas en invernadero, listas para ser transplantadas a campo	65
Figura 12. Plantas generadas <i>in vitro</i> , transplantadas en campo directo para su multiplicación de semilla botánica	67
Figura 13. Porcentaje de germinación en calabaza (<i>C. pepo</i> L.) permitido por diferentes hongos inoculados para selección por resistencia a damping-off. Chapingo, Mex. 2001	72
Figura 14. Porcentaje de incidencia de diferentes hongos fitopatógenos causantes de damping-off inoculados en calabaza (<i>C. pepo</i> L.), para selección por resistencia. Chapingo, México, 2001 ...	73

Figura 15. Porcentaje de infección de diferentes hongos fitopatógenos causantes de damping-off inoculados en calabaza (<i>C. pepo</i> L.), para selección por resistencia. Chapingo, México, 2001 ...	75
Figura 16. Porcentaje de muerte post-emergente de diferentes hongos fitopatógenos causantes de damping-off inoculados en calabaza (<i>C. pepo</i> L.), para selección por resistencia. Chapingo, México, 2001	77

RESUMEN

OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA EN CALABAZAS (*Cucurbita* spp.) AL DAMPING-OFF

Alexander Pérez Miceli. Maestro en Ciencias en Protección Vegetal.

Parasitología Agrícola, UACH.

Dr. Clemente Villanueva Verduzco.

Las calabazas son afectadas por hongos que destruyen las raíces y obstruyen el sistema vascular e inducen síntomas de ahogamiento o damping-off, marchitamiento, amarillamiento y muerte de las plantas atacadas. Los estudios de campo, laboratorio e invernadero de esta investigación fueron llevados a cabo en el 2001 en calabazas (*Cucurbita* spp.) con el objetivo de seleccionar e incrementar plantas resistentes al complejo de hongos causantes de damping-off, así como definir la metodología de micropropagación *in vitro* para incrementar la semilla de plantas de calabaza resistentes mediante cultivo de tejidos. Se realizaron inoculaciones artificiales con diferentes hongos, bajo condiciones de invernadero, ajustando la concentración de inóculo con un hematocitómetro. Se obtuvieron plantas resistentes a las especies de hongos inoculadas, así como a la mezcla de ellos. Utilizando el medio de cultivo Murashige-Skoog (1962) suplementado con $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de la hormona bencil adenina, se obtuvieron plantas vigorosas con alta calidad genética a partir de puntas de guías esterilizadas, las cuales fueron adaptadas exitosamente (70% en condiciones de invernadero con Peat- moss® como sustrato) y 100% a las condiciones de campo para producción de semillas de plantas resistentes.

Palabras clave: *Cucurbita pepo* L., resistencia genética, damping-off, cultivo de tejidos, aclimatación.

ABSTRACT

OBTENTION AND UTILIZATION OF GENETIC RESISTANCE IN SQUASH (*Cucurbita* spp.) TO DAMPING-OFF COMPLEX

Alexander Pérez Miceli. Maestro en Ciencias en Protección Vegetal.

Parasitología Agrícola, UACH.

Dr. Clemente Villanueva Verduzco.

Squashes are affected by soil fungi that destroy roots and obstruct vascular system and induce symptoms of damping-off, wilting, yellowing and death of attacked plants. The field, laboratory and greenhouse studies were carried out in 2001 in squash (*Cucurbita* spp.) to select and reproduce plants resistant to the fungus complex that causes damping-off, to define the methodology of *in vitro* micropropagation for increasing the quality of seed squash of resistant plants through tissue culture. Artificial inoculations were carried out with different fungi under greenhouse conditions; the inoculum density was adjusted with a hemacytometer. We obtained plants resistant to the different species of fungi and also to the mixture of them. Using the Murashige and Skoog (1962) culture medium supplemented with $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ benzylamino purine, we obtained vigorous plants with high genetic quality from sterilized shoots tip, which were successfully adapted (70%) to greenhouse conditions with Peat-moss[®] as substrate and to field conditions (100%) for seed production with resistant plants.

Key words: *Cucurbita pepo* L., genetic resistance, damping-off, plant tissue, acclimatation.

1.- INTRODUCCIÓN

La familia *Cucurbitaceae* aparece como una de las primeras plantas utilizadas por el hombre, abarcando aproximadamente 30 especies de 9 géneros de plantas cultivadas (Esquinas, 1983). El género *Cucurbita* está constituido por 25 especies, siendo cinco las que se cultivan: *C. argyrosperma* Huber, *C. ficifolia* Bouché, *C. maxima* Duch. Ex Lam., *C. moschata* (Duch. ex Lam) Duch. ex Poir y *C. pepo* L., y veinte silvestres: *C. californica*, *C. cordata*, *C. cylindreata*, *C. digitata*, *C. ecuatorensis*, *C. foetidissima*, *C. fraterna*, *C. galeottii*, *C. gracilio*, *C. kelliana*, *C. lundelliana*, *C. martinezzi*, *C. melopepo*, *C. okeechobensis*, *C. palmata*, *C. palmeri*, *C. pedatifolia*, *C. radicans*, *C. scabridifolia*, *C. texana*, (Lira, 1995 y Pérez, et al., 1997).

El cultivo de la calabaza (*Cucurbita* spp.) ha tenido primordial importancia en el desarrollo de las primeras civilizaciones de América, siendo muy popular en México y en la mayoría de los países americanos en donde existen variedades criollas para una determinada región. A nuestro país se le considera Centro de Origen y de distribución de las diferentes especies de esta hortaliza (Pérez, et al., 1997).

Los frutos inmaduros y maduros, así como las semillas de las especies cultivadas de este género han tenido y tienen gran importancia alimentaria en gran parte del mundo, y en muchas regiones de Latinoamérica, las flores y algunas partes vegetativas (p.e: las puntas tiernas de los tallos o guías) son apreciadas como verdura (Lira, 1995; Ayala, 2002). Además de que en general son fuente de fibras, aceites, carbohidratos y otros usos como alfarería y cerámica (Ortiz, 1986).

Las *Cucurbitáceas*, como otras hortalizas también son afectadas por microorganismos habitantes del suelo; entre éstos tenemos a los hongos quienes inducen síntomas en los que destaca el ahogamiento de plántulas o damping-off, marchitamiento y muerte de las plantas atacadas, que resultan de la destrucción del sistema radical y la obstrucción del sistema de conducción (Cruz, *et al.*, 1998).

El ahogamiento de las plántulas, es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo; afecta semillas, plántulas y plantas adultas de la mayoría de las hortalizas, cereales, árboles frutales y forestales; tanto en campo como en invernadero. En cualquiera de los casos, los daños más importantes son los que sufren las semillas y las raíces de las plántulas durante su germinación, ya sea antes o después de que emerjan del suelo (Romero, 1993; Agrios, 1996 y Cruz, *et al.*, 1998).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa una herramienta valiosa para el mejoramiento genético y el estudio de diversos fenómenos fisiológicos de las plantas, debido a sus ventajas con respecto a los métodos tradicionales, ya que con ésta técnica se pueden lograr altas tasas de multiplicación de plantas sanas, vigorosas y de alta calidad genética en corto tiempo, utilizando espacios reducidos, optimizando recursos y sin limitaciones por la época del año (Robles, 1993 y Villatoro 1996).

Hasta la fecha, el cultivo *in vitro* de calabazas ha sido poco estudiado, por lo que se desconoce la capacidad de regeneración de los tejidos *in vitro* de esta especie y del efecto que tienen varios factores como el genotipo, la composición química del medio de cultivo, las condiciones físicas del ambiente y la desinfección del material vegetal, entre otros. Es necesario entonces establecer protocolos de regeneración *in vitro* que permitan obtener una alta tasa de multiplicación a partir de plantas seleccionadas de calabaza. También es necesario conocer la capacidad de aclimatación de las plántulas obtenidas por cultivo de tejidos a las condiciones de invernadero, ya que dicha aclimatación es afectada por aspectos morfológicos y fisiológicos de las plántulas y los factores del ambiente (Pierik, 1990 y Andrade, 1998).

En base a lo anteriormente expuesto y con fines de buscar y proveer mejores alternativas en el manejo de enfermedades radiculares en calabazas, así como proporcionar información acerca del empleo de la técnica de cultivo de tejidos en ésta especie, se desarrolló la presente investigación con los siguientes:

Objetivos:

1. Seleccionar plantas de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) resistentes a las especies de hongos del suelo causantes del ahogamiento de plántulas o damping-off individualmente, y al complejo de ellos.
2. Definir la metodología de micropropagación en plantas de calabaza resistentes al complejo de hongos del suelo e individualmente.
3. Incrementar aceleradamente la disponibilidad de semilla de calabaza de plantas resistentes, vía cultivo de tejidos.
4. Establecer el protocolo de aclimatación a condiciones en invernadero y campo para la adaptación de plántulas de calabaza obtenidas *in vitro*.

Hipótesis

La variabilidad genética existente en poblaciones criollas de calabaza *Cucurbita pepo* permite seleccionar germoplasma resistente y tolerante a las especies de hongos causantes del ahogamiento o damping –off y al complejo de las mismas.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales aplicada en calabazas nos permite multiplicar gran cantidad de plántulas resistentes de buena calidad en poco tiempo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo de calabaza

2.1.1. Origen y distribución

De acuerdo a investigaciones arqueológicas, biosistemáticas, etnobotánicas y morfométricas, el género *Cucurbita* presenta gran cantidad de registros arqueológicos superado solamente por el maíz (Lira, 1995 y Pérez *et al.*, 1997).

Cucurbita pepo parece ser una de las primeras especies en haber sido domesticadas, por el hombre. Los restos más antiguos encontrados en diferentes partes del continente Americano, como los localizados en el valle de Oaxaca México, datan del año 8,750 A. C. Otros reportes indican que restos de pedúnculos, pericarpio y semillas datan del año 7,000 A. C, encontrados en las Cuevas de Ocampo, Tamaulipas, México; y finalmente vestigios de *C. maxima* localizados en el Valle de Ica, Perú cuentan con una edad calculada en 6,000 años A. C. indicando, sin lugar a dudas, que América es el centro de origen de las calabazas (Lira, 1995).

Pérez, *et al.*, (1997) mencionan que la familia *Cucurbitaceae* es originaria del continente Americano, siendo México su principal centro de distribución, en donde las especies cultivadas aún coexisten con sus ancestros silvestres.

2.1.2. Posición taxonómica

De acuerdo con los trabajos más recientes, las calabazas se agrupan en el reino vegetal de la siguiente manera (Jeffrey, 1990):

Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotiledónea
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Subfamilia	Cucurbitoideae
Tribu	Cucurbiteae
Género	<i>Cucurbita</i>
Especie	<i>Cucurbita pepo</i> L.

2.1.3. Generalidades botánicas

Las especies silvestres y cultivadas del género *Cucurbita* son plantas monoicas, rastreras o arbustivas y en algunas variedades de *C. pepo*, el tallo puede alcanzar una longitud de 12 a 15 m el cual presenta hojas simples con 3 ó 5 lóbulos y pedúnculos largos y huecos; de las axilas de las hojas se desprenden zarcillos ramificados que sirven como sostén a las guías. Sus flores son gamopétalas con colores que van desde el amarillo pálido hasta el naranja

brillante. Los frutos y semillas presentan forma, color, tamaño y texturas variables (Guenkov, 1974; Lira, 1995 y Pérez *et al.*, 1997).

2.1.4. Composición genética del género

Diversos estudios en Citogenética han demostrado que las especies del género *Cucurbita* tanto silvestres como cultivadas, poseen un número cromosómico constituido por 20 pares de pequeños cromosomas; y mediante análisis de isoenzimas se ha logrado definir que el género es un antiguo tetraploide (García, 1988; Lira, 1995 y Pérez *et al.*, 1997).

Hall, *et al.*, (1976) realizaron un estudio con semillas de *Cucurbita pepo* L., reportando la relación de los porcentajes molares de bases del ADN: Adenina: 30.2, Guanina: 21.0, Citosina: 16.1, 5- metilcitocina: 3.7 y Timina: 29.0.

2.1.5. Importancia

El género *Cucurbita* es bien conocido por sus especies cultivadas, las cuales en los países de habla hispana son comúnmente conocidas como “calabazas”, “zapallos” o mediante numerosos nombres en lenguas indígenas (Cuadro 1), mientras que en los países anglosajones se les denomina “squashes”, “pumpkins” o “gourds” (Lira, 1995).

Cuadro 1. Nombres usados para designar a las calabazas en diferentes lenguas indígenas en la República Mexicana.

Nombre	Lengua	Estado
Tamalayota, támala	Náhuatl	Puebla, Guerrero y Oaxaca
Mmá	Chinanteca	Oaxaca
Ká-mí, ká-maaré, ká-narim, ká-rumi	Trique	Oaxaca
Moen-yé	Mixe	Oaxaca
Shikin-ñaami	Mixteca	Oaxaca
K'uum	Maya	Chiapas, Yucatán, Campeche

Fuente: Lira, 1995.

El cultivo de las especies de *Cucurbita* es un elemento común y parte fundamental en la agricultura tradicional de subsistencia que se practica en Latinoamérica. Sus especies son cultivadas de manera más o menos extensiva en los sistemas de policultivo conocidos como “milpas”. La selección empírica de los materiales destinados a plantarse en el siguiente ciclo contribuyen al mantenimiento y la ampliación de la diversidad genética. Las características consideradas por los agricultores en la selección son: el tamaño de los frutos, color y sabor de su pulpa, cantidad y tamaño de las semillas, así como su adaptación a condiciones ecológicas (Lira, 1995).

Los frutos inmaduros, maduros y las semillas de las especies cultivadas de este género han tenido y tienen gran importancia alimenticia en gran parte del mundo, ya que son utilizados como ingredientes especiales en numerosos platillos exóticos; además de que en muchas regiones de Latinoamérica, las

flores y algunas partes vegetativas como las puntas tiernas de los tallos o “guías” son también muy apreciadas como verdura (Lira, 1995). Además de que en algunas regiones del continente Africano, las calabazas son usadas en cultos y ceremonias religiosas.

En México, la calabacita (*C. pepo* L.) es la única especie que se cultiva a nivel comercial para verdura. En el ciclo agrícola Otoño-Invierno (2001) y Primavera-Verano (2002), se sembraron un total de 25, 765 ha, obteniéndose una producción de 311,838 ton, siendo los principales Estados productores, por su superficie cosechada: Sinaloa, Puebla, Morelos, Hidalgo y Jalisco (Cuadro 2).

Cuadro 2. Principales Estados productores de calabacita para verdura en el ciclo agrícola 2001 – 2002.

Estado	Superficie cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton· ha⁻¹)
Sinaloa	8, 085	81, 177	10.0404
Puebla	2,022	23, 998	11.8684
Morelos	1,647	23,529	14,286
Hidalgo	1,330	11,561	8.6924
Jalisco	1,204	15,229	12.6486

Fuente: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, 2002.

2.1.6. Principales usos

2.1.6.1. Alimenticio. Es evidente que éste es el uso más importante al que se han destinado las calabazas, no sólo en América Latina, sino en el mundo

entero. En el caso de la pulpa de los frutos maduros, la forma más difundida de consumirla es como dulce y se prepara tanto hervida como asada. Las especies más apreciadas para este propósito son *C. maxima* y *C. moschata*, y en menor grado *C. pepo* y *C. ficifolia*. Esta última es empleada especialmente en la elaboración de un dulce muy conocido en México, llamado “cabellos de angel”.

Las semillas por su parte son consumidas preferentemente asadas o tostadas, ya sea como botanas enteras o simplemente aderezadas con sal, o más frecuentemente molidas y como parte de numerosos platillos; y su consumo aun en las zonas urbanas de México y Centro América, es todavía bastante común.

Los tallos tiernos, las flores y sobre todo los frutos inmaduros, son consumidos como verdura cocida y frita, etc., frecuentemente formando parte de diversos platillos. Es común encontrar a la venta frutos inmaduros de algunas variedades comerciales de *C. pepo*. En algunas partes de la Península de Yucatán, los campesinos prefieren consumir tallos y flores de *C. argyrosperma* y *C. pepo* que de *C. moschata*, ya que la pubescencia de esta última le confieren un sabor desagradable y hacen más difícil su digestión (Lira, 1995).

2.1.6.2. Industrial - comercial. Existen cultivares de semilla sin testa, que para el caso de elaboración de botanas y moles, facilitan su preparación y envasado; así como la producción de aceite comestible. Por otro lado, la pulpa de los frutos de varias especies es utilizada en la elaboración de jabones destinados a la limpieza de artículos de piel. Otro aspecto que también se está aprovechando

es la producción de frutos de colores y formas vistosas con fines ornamentales; así como en la obtención de algunas enzimas proteolíticas empleadas en el tratamiento de aguas residuales (Lira, 1995).

2.1.6.3. Medicinal. En muchas regiones del mundo se utilizan diversas partes de las plantas de calabaza como curativas, por ejemplo: en Brasil, se usan frutos y semillas con propiedades diuréticas y vermífugas; en China, se emplean raíces, flores y semillas para calmar dolores de dientes, tratamientos antihelmínticos y tónicos estomacales, entre otros (Lira, 1995).

2.1.6.4. Otros. Es común encontrar que en algunas partes de Oaxaca y Chiapas, México; así como en la costa de Ecuador, los frutos sean proporcionados al ganado como suplemento alimenticio y el menos importante es el uso de las cáscaras secas de los frutos para la elaboración de recipientes, sonajas y otros artículos empleados en la alfarería (Ortiz, 1986 y Lira, 1995).

2.1.7. Valor nutritivo

La importancia de las calabazas se debe al contenido de sustancias nutritivas y a las cualidades gustativas del fruto. La pulpa del fruto contiene de 11 a 17% de sólidos totales y hasta 45% de azúcares de acuerdo con las variedades; y las semillas son ricas en grasa y albúmina (Guenkov, 1974), en el Cuadro 3 se presenta la composición de diferentes partes comestibles de la planta de calabaza.

Cuadro 3. Composición de 100 g de diferentes partes comestibles de la planta de calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

Concepto	Fruto maduro^a	Fruto tierno^b	Hojas frescas^c	Flores masculinas^d	Semillas^e
Agua	90 g	---	90 g	80.7 g	---
Proteínas	1.3 g	1.76 g	4.2 g	26.95 g	44 %
Lípidos	0.2 g	0.11 g	0.4 g	---	---
Azúcares	6 g	2.14 g	3.4 g	0.035 g	---
Sales minerales	0.4 – 0.5 g	---	---	---	---
Vitamina A	---	100 U.I	0.8 mg	---	---
Vitamina B ₁	---	60 mcg	0.14 mg	---	---
Vitamina B ₂	---	40 mcg	0.17 mg	---	---
Niacina	---	---	1.8 mg	---	---
Vitamina C	---	20 mg	58 mg	16.32 mg	---
Ácido ascórbico	10.0 mg	---	---	16.0 mg	---
Tiamina	0.05 mg	---	---	---	---
Riboflavina	0.05 mg	---	---	---	---
PP	0.50 mg	---	---	---	---
Carotenoides	2.0 mg	---	---	2.24 g	---
Fibra	---	---	1.5 g	---	---
Ceniza	---	---	1.6 g	2.80 g	---
Valor energético	---	17 cal.	26.0 kcal.	---	---
Aceite	---	---	---	---	39 %
Azúfre	10 mg	---	---	---	---
Fósforo	30 mg	21 mg	96.0 mg	12.38 mg	1 %
Sodio	3 mg	---	---	---	---
Potasio	400 mg	---	---	37.63 mg	---
Magnesio	10 mg	---	---	---	---
Calcio	21 mg	18 mg	127.0 mg	79.0 mg	---
Hierro	0.8 mg	0.6 mg	5.8 mg	6.50 mg	---
Zinc	0.21 mg	---	---	---	---

Fuente: ^a: Japón, 1981, ^b: Maroto, 1989, ^c: INCAP-ICNND, 1961, ^d: Montalvo, 2001 y ^e: Lira, 1995. (Tomado de Ayala, 2002).

Se observa que todas las partes comestibles del cultivo de calabaza presentan un alto valor nutritivo; incluso notablemente superior en algunos aspectos, a otros cultivos hortícolas (Cuadro 4). Las partes comestibles sobresalen en general, por su alto contenido de Calcio, Fósforo, Tiamina, Riboflavina, Niacina

y Ácido Ascórbico. Los frutos maduros sobresalen por su alto valor nutritivo, sobresaliendo en carotenos y azúcares; así mismo, las hojas lo hacen por su alto contenido de Proteínas, Lípidos, Calcio, Fósforo y Vitamina C, aún por arriba de los frutos maduros. El alto contenido de aceites y proteínas localizado en las semillas de este cultivo, hacen que tenga una fuerte demanda en la industria.

Cuadro 4. Composición de 100 g de porción fresca de hojas comestibles.

Concepto	Calabaza	Espinaca	Acelga	Lechuga
Proteína (g)	4.2	2.8	1.6	1.0
Grasa (g)	0.4	0.7	0.4	0.1
Carbohidratos (g)	3.4	5.0	5.6	3.0
Fibra (g)	1.5	0.7	1.0	0.5
Ceniza (g)	1.6	1.8	1.6	0.4
Calcio (mg)	127.0	60.0	110.0	16.0
Fósforo (mg)	96.0	30.0	29.0	23.0
Hierro (mg)	5.8	3.2	3.6	0.4
Vitamina A (mg)	0.8	1.2	0.9	---
Vitamina B1 (mg)	0.14	0.06	0.03	0.05
Vitamina B2 (mg)	0.17	0.17	0.09	0.03
Niacina (mg)	1.8	0.6	0.4	0.3
Vitamina C (mg)	58.0	46.0	34.0	7.0
Humedad	90.0	90.0	91.0	96.0
Energía (kcal)	26.0	30.0	27.0	13.0

Tomado de: Ayala, 2002.

También se han realizado estudios como los de Fahn (1979) para determinar la cantidad de néctar producido por una flor por día, (Cuadro 5).

Cuadro 5. Contenido promedio del néctar producido por una flor en un día de diferentes Cucurbitáceas.

Nombre de la Planta	Néctar fresco en mg	Néctar deshidratado en mg	Porcentaje de Materia Seca
<i>Bryonia multiflora</i>	0.75	---	---
<i>Cucumis sativus</i>	3.25	1.00	30.7
<i>Cucurbita maxima</i>	201.25	32.37	16.0
<i>Cucurbita pepo</i>	98.40	27.60	28.0

Fuente: Fahn, A. 1979.

2.2. Mejoramiento genético

Debido a que la reducción del vigor durante varios ciclos de autofecundación no es significativa, en las especies cultivadas de *Cucurbita* se han aplicado metodologías tendientes a explotar la endogamia y la heterosis. Los principales objetivos en el mejoramiento de esta especie están enfocados al rendimiento y calidad de fruto, semilla y contenido de aceite, así como la búsqueda de resistencia a enfermedades virales y en menor grado las enfermedades de raíz (Pérez, *et al.*, 1997; Sánchez y Velásquez, 1999).

Pérez *et al.*, 1997, señalan que el principal método de mejoramiento utilizado en calabazas es la hibridación en cruza simple, debido a su leve depresión endogámica, suficiente heterosis y fácil emasculación.

Para la aportación de características deseables como la resistencia a algún tipo de enfermedad o mejoramiento de alguna variedad se utiliza el método

trisómico, el cual consiste en localizar el cromosoma en el que se encuentra el gen deseado y transferirlo mediante retrocruzas.

Se han estudiado cruzamientos interespecíficos para transferir cualidades superiores a los frutos como la resistencia a plagas y enfermedades, obtención de variedades que se adapten a climas adversos, pero la información existente es aún escasa (Chatterjee y More, 1991 y Pérez, *et al.*, 1997).

Desde 1996, en la Universidad Autónoma Chapingo, a través del proyecto “Milpa” financiado por la fundación Mc Knigth, se han realizado numerosos estudios en el sistema milpa-calabaza, obteniéndose importantes resultados en la mejora de la cantidad y calidad de frutos y semilla por fruto producidos por planta; incremento en la cantidad de azúcares y del color en la pulpa; cultivares resistentes a herbicidas comunes preemergentes empleados en maíz y resistentes a hongos del suelo (Sánchez y Velásquez 1999 y Ayala 2002).

2.3. Resistencia genética

2.3.1. Tipos de resistencia

Vardeplank (1963) estableció la diferencia entre resistencia monogénica y poligénica, usando el término resistencia vertical y horizontal, respectivamente.

La resistencia vertical normalmente es de tipo cualitativa, en el sentido de que está presente o ausente, sin valores intermedios. Esto significa que hay un alto

nivel de resistencia de una variedad a alguna raza fisiológica de un patógeno y un nivel bajo de resistencia a otras razas (Manners, 1993 y Robinson, 1996).

Jones (1987), menciona que la resistencia vertical es llamada también resistencia específica y es fácil de detectar en etapa de plántula y relativamente fácil de incorporar a nuevas variedades ya que a menudo es controlada por uno hasta tres pares de genes.

Para que exista resistencia vertical, debe haber genes simples de resistencia en las plantas y también genes simples de actividad parasítica en el parásito. Este es un fenómeno muy importante conocido como relación gene – gene, descubierta en 1940 por H . H. Flor, en los estados Unidos (Robinson, 1996).

Por otro lado la resistencia horizontal es de tipo cuantitativa, en el sentido de que la enfermedad puede presentarse a cualquier nivel entre un mínimo y un máximo y es expresada igualmente a todas las razas conocidas del patógeno independientemente de las llaves bioquímicas que pueda poseer; lo que significa que este tipo de resistencia no puede ser acoplada, además de que es grandemente influenciada por el medio (Jones, 1987 y Robinson, 1996).

2.3.2. Estudios de resistencia a enfermedades de la raíz en Cucurbitáceas

A continuación se enlistan las metodologías y resultados obtenidos en algunos trabajos para detectar resistencia a algunas enfermedades:

Cohen y Eyal (1987) reportan estudios realizados en una línea de melón (*Cucumis melo* L.) PI-124111F, derivada de la séptima generación de selección por resistencia a mildiu (*Pseudoperonospora cubensis* patotipo 3), cenicilla polvorienta (*Sphaerotheca fuliginea* razas 1 y 2) y marchitez (*Fusarium oxysporum* f sp. *melonis* razas 0, 1 y 2). Los resultados indicaron que el gen responsable de conferir resistencia a la marchitez por *Fusarium* razas 0 y 2 es el *Fom* 1 y 2 manifestando un alto grado de resistencia para esta enfermedad.

Martyn *et al.*, (1991) simularon condiciones de campo en el estudio de la resistencia a la marchitez por *Fusarium oxysporum* f sp. *niveum* razas 0 y 1 y *F. o.* f sp. *cucumerinum* en sandía (*Citrullus lanatus*). Ambas formas especiales de hongos mostraron los primeros síntomas a las 2 semanas. Los resultados indican que la marchitez por *Fusarium* es fuertemente influenciada por los factores ambientales como la temperatura y humedad del suelo.

Zink & Gubler (1986) y Zink (1991), estudiaron el modo de herencia de la resistencia a la marchitez en melón *Cucumis melo* L. en los cultivares 'Mango-Melon', 'Smith's Perfect', 'Rio Gold', 'Wescan', 'Dulce' y 'Perlita', utilizando diferentes concentraciones (0.05×10^6 , 0.1×10^6 , 0.5×10^6 y 1.0×10^6 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$) de *Fusarium oxysporum* f sp. *melonis* raza 2. Además, estudió la segregación de la resistencia a la marchitez en las generaciones F_1 y F_2 , concluyendo que la resistencia a la raza 2 en esos cultivares es determinada por un gen dominante; y por último, en pruebas de alelismo, se determinó que la resistencia es controlada por el gene *Fom* 3, o un alelo de este gene. De los

diferentes cultivares se obtuvieron pocas plantas libres de síntomas a los 42 días de edad, consideradas como resistentes. El mismo autor en 1992, reporta plantas de melón cultivares 'Honey Dew', 'Iroquois' y 'Delicious 51' con resistencia a las razas 0 y 2 de *Fusarium oxysporum* f sp. *melonis* pero susceptibles a la raza 1, las pruebas de alelismo indicaron que el gen *Fom 1*, o un alelo de este gen es el responsable de la resistencia a la marchitez por *Fusarium*.

En 1992, se probaron métodos en invernadero para determinar resistencia de 5 variedades de pepino a *Rhizoctonia solani*. Las plantas se inocularon cuando la segunda hoja verdadera estuvo expandida y la infección fue estimada en una escala de 1-9, 5-12 días después de la inoculación. Los métodos de riego al suelo y disco en el hipocótilo indujeron la mejor expresión de síntomas, y la misma reacción. Usando el método de riego al suelo, 76 de las variedades más comerciales fueron las más resistentes y Supergreen fue la más susceptible. Ninguno de los métodos probados en plántulas se correlacionaron con la resistencia de campo de las variedades (Uchneat, 1997).

Se probaron 3 genotipos de *Cucurbita* spp: CNPH 88-393 resistente, Mocinha moderadamente resistente y CNPH 88-625 susceptible en diferentes etapas de desarrollo (7, 11, 14 y 18 días después de la siembra), concentración de inóculo (102, 103, 104 y 105 zoosporas por mL) y condiciones ambientales (invernadero de cristal, plástico y condiciones controladas); para observar su reacción a *Phytophthora capsici*. El resultado fue que los 3 genotipos

mantuvieron su respectiva resistencia bajo todas las condiciones ambientales evaluadas. La inoculación con 103 o 104 zoosporas por mL a los 7, 11 o 14 días después de la siembra fue considerado lo adecuado para buscar la resistencia (Henz & Lima, 1994).

Una variedad de pepino se probó en dos tipos de composta (corteza de pino) y Peat mix[®], mezcla supresiva y favorable a la pudrición por *Pythium* respectivamente. Se transplantaron las plantas de 2 semanas de edad y se inoculó con *P. ultimum* y *P. aphanidermatum*, en mezclas de los dos tipos de composta para probar la resistencia de esta variedad. La pudrición fue menos severa en mezclas con el primer tipo de composta (Zhang, *et al.*, 1996).

Pan y More (1996) evaluaron colectas de melón *Cucumis melo* L. para resistencia a cenicilla (*Sphaerotheca fuliginia*), mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*), Virus Mosaico Verde Moteado del Pepino (CGMMV) y a la marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f sp. *melonis* Schlecht); para esta última enfermedad, hicieron inoculaciones artificiales en plántulas empleando cepas de 10 días de edad y una concentración de inóculo de 5×10^6 conidios mL^{-1} . Se consideraron como plantas resistentes a todas aquellas que alcanzaron 62 días de edad, el cual fue un porcentaje muy bajo.

Sánchez y Velásquez (1999) realizaron inoculaciones artificiales de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium*

spp., causantes de ahogamiento en calabaza (*C. pepo* L.) y chilacayote (*C. ficifolia* Bouché) bajo condiciones de invernadero, obteniendo plantas resistentes tanto a las especies de hongos individuales y a la mezcla de ellos.

2.4. Principales enfermedades radicales en Cucurbitáceas

2.4.1. Marchitez por *Fusarium oxysporum* Schlechtend. : Fr. W. C. Snyder & H. N. Hansen

2.4.1.1. Importancia y distribución

Fusarium oxysporum, es un hongo cosmopolita responsable de la pudrición y marchitez, debido a que bloquea los tejidos vasculares, impidiendo de esta forma el movimiento de agua en las raíces de más de 100 especies de plantas económicamente importantes (Kistler, *et al.*, 1998; De Cal, *et al.*, 2000 y Migheli, *et al.*, 2000). Puede causar pérdidas que fluctúan entre un 75 - 90% de plantas establecidas en campo (Leach y Currence, 1938; Moreno y Alférez, 2001).

En 1920 en el Estado de Texas, Estados Unidos, se presentó una enfermedad, en sandía (*Citrullus lanatus*) la cual causó pérdidas cuantiosas. Los síntomas que se observaron correspondieron a marchitez, amarillamiento y pudrición de raíces, el agente causal fue identificado entonces como *Fusarium vasinfectum* Taubenhause (1920), posteriormente como *Fusarium oxysporum*, después la enfermedad fue reportada también en los Estados de Maryland, Florida, Alabama, Oklahoma, Iowa, Minnesota, California y Oregon (Leach y Currence, 1938; y Walker, 1941).

2.4.1.2. Diversidad de hospedantes

Existe un sin número de formas especiales de *Fusarium oxysporum* que atacan a más de 100 especies, tanto cultivadas como silvestres. Específicamente en Cucurbitáceas, todas las especies cultivadas de esta familia son fácilmente atacadas por las siguientes formas especiales de *Fusarium*: melón (*Fusarium oxysporum* f sp. *melonis*), sandía (*Fusarium oxysporum* f sp. *niveum*), pepino (*Fusarium oxysporum* f sp. *cucumerinum* y *F. o. f. sp. radicis-cucumerinum**), calabaza (*Fusarium oxysporum* f sp. *niveum* y *Fusarium solani* f sp. *cucurbitae*) (Caperton, et al., 1986; Hopkins, et al., 1992; Kistler, et al., 1998., Vakalounakis y Fragkiadakis, 1998*; Moreno y Alférez, 2001).

2.4.1.3. Epidemiología y ciclo biológico

Fusarium oxysporum inverna en el suelo en forma de micelio y en cualquier forma de sus esporas, pero lo hace con mayor frecuencia por clamidosporas en los restos vegetales y puede persistir más de 10 años en ausencia de hospedantes susceptibles, como saprófito; y alcanza a sobrevivir más de 2 años en la semilla. Se propaga a cortas distancias mediante el salpique por el agua de lluvia, a través del agua de riego, equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias mediante semilla y propágulos infectados (Blancard, et al., 1991; Romero, 1993 y Agrios, 1996).

En las plantas sanas que crecen en un suelo contaminado, al emerger las raíces laterales o al existir heridas causadas por daños mecánicos por el crecimiento de la raíz o por implementos de labranza; los tubos germinativos de

las esporas o el micelio penetran directamente. El micelio invade la región vascular propagándose intercelularmente, donde produce microconidios que son transportados en sentido ascendente hacia el tallo y la corona de la planta. Produce sustancias que degradan tejidos y colapsan las células del hospedante; provocan decoloración café y taponamiento de vasos del sistema vascular, existiendo déficit hídrico, lo cual induce marchitamiento y posteriormente muerte de la planta (Agrios, 1996 y Cruz, *et al.*, 1998).

La temperatura óptima para el desarrollo de *Fusarium oxysporum* es de 26.5° C, pero los síntomas se manifiestan a temperaturas más altas, en periodos de baja humedad relativa y fuerte luminosidad. El hongo es favorecido por suelos con alto contenido de materia orgánica, así como por aquellos suelos en donde existen poblaciones de nemátodos agalladores, ya que estos favorecen la penetración del hongo al causar heridas en las plantas (Caperton, *et al.*, 1986 y Blancard, *et al.*, 1991).

2.4.1.4. Síntomas

Cuando las plantas son afectadas en etapa de plántula por *Fusarium oxysporum*, es posible que éstas se marchiten y mueran poco después de que aparezcan los primeros síntomas. En plantas adultas ocasiona pudrición de raíces, tallos y frutos. El ataque comienza bajo el nivel del suelo como una pudrición suave y oscura de cuello y raíz, induciendo marchitamiento en la planta a causa de la obstrucción del sistema de conducción (Fig. 1).

Las plantas afectadas se marchitan durante el día y se recuperan por la noche, repitiéndose esta secuencia hasta que finalmente mueren (Blancard, *et al.*, 1991 y Cruz, *et al.*, 1998).



Figura 1. Daños causados por *Fusarium oxysporum* en plantas adultas de calabaza (*C. pepo* L.).

2.4.1.5. Medidas de control

2.4.1.5.1. Control biológico

Se han descubierto recientemente cepas de *Fusarium oxysporum* no patogénicas que juegan un papel importante en la supresión natural de variantes agresivas o virulentas del mismo hongo (Biles y Martyn, 1989; Agrios, 1996; Larkin, *et al.*, 1996 y Migheli, *et al.*, 2000), tal es el caso de la utilización

de *Fusarium oxysporum* cepa Fo47 y *Pseudomonas putida* cepa WCS358, en el control de la marchitez del lino y del clavel; se observó disminución del crecimiento micelial y detención de la actividad patogénica en la cepa agresiva de *Fusarium oxysporum*, debido a que existe competencias intraespecífica por fuentes de carbono y fierro (Duijff, *et al.*, 1999). Inoculaciones de 10^7 conidios/mL de *Penicillium oxalicum* lograron reducir considerablemente los daños causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en jitomate (De Cal, *et al.*, 2000).

2.4.1.5.2. Control genético

Sin duda alguna este es el mejor tipo de control ya que una vez establecida la resistencia en el cultivo, el agricultor sólo tiene que cambiar la variedad susceptible por una resistente; así, Caperton, *et al.*, 1986 recomiendan utilizar variedades resistentes a la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y al nematodo agallador *Meloidogyne incógnita* como la calabaza de verano *Cucurbita pepo* var. *melopepo*; para sandía, la variedad Calohun Gray, muestra buena tolerancia a esta enfermedad (Martyn, 1991 y Hopkins, *et al.*, 1992), en melón, la variedad WI998FR muestra alto grado de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* razas 0 y 2 (Zink, 1986, 1992;).

2.4.1.5.3. Control cultural

Medidas fitosanitarias como el uso de semilla sana y prácticas que ayuden a mantener una buena estructura en el suelo; manejo del drenaje para evitar estrés en las plantas por exceso o falta de agua, y una adecuada fertilización

para favorecer el crecimiento vigoroso de las plantas y la fertilización nitrogenada con nitrato se ha demostrado que ayuda a reducir la pudrición de la raíz causada por especies de *Fusarium* y por último la rotación de cultivos, dejando descansar por 10-12 años, ya que éste es el tiempo que el hongo puede sobrevivir en el suelo (Taubenhaus, 1920; Agrios, 1996 y Rodríguez, 1998).

2.4.1.5.4. Control químico

En invernaderos, la esterilización del suelo con bromuro de metilo o con vapor proporciona un control eficaz de esta enfermedad; la semilla debe ser tratada con fungicidas como el naban, quintoceno, benomyl y captafol, otros productos como el thiabendazol o thiophanato metílico en tratamiento a la semilla y/o aplicaciones al cuello al momento de la emergencia de las plantas también son efectivos (Agrios, 1996 y Rodríguez, 1998).

2.4.2. Ahogamiento y pudrición radicular por *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.

2.4.2.1. Importancia y distribución

Este hongo, causante del ahogamiento de las plantas o Damping-off, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo. Afecta semillas, plántulas y plantas adultas de la mayoría de las hortalizas (tanto en campo como en invernadero), cereales y muchos árboles frutales. Los daños más severos los causa cuando es favorecido por condiciones ambientales y en mayor grado lo

sufren las semillas y las raíces de las plántulas durante la germinación, ya sea antes o después de la emergencia al suelo (Blancard, *et al.* 1991; Romero, 1993; Cruz, *et al.* 1998 y Postma, *et al.* 2000).

2.4.2.2. Diversidad de hospedantes

El número de hospedantes de *Pythium aphanidermatum* es muy grande. Entre las plantas afectadas se encuentran el pasto *Agrotis alba*, amaranto (*Amarantus* sp.), Apio (*Apium graveolens*), avena (*Avena sativa*), betabel (*Beta vulgaris*), lechuga (*Brassica oleracea*), chile (*Capsicum annum*), mandarina (*Citrus vulgaris*), naranja (*Citrus cinensis*), melón (*Cucumis melo*), zanahoria (*Daucus carota*), algodón (*Gossypium* sp.), camote (*Ipomoea batata*), tomate (*Lycopersicum sculentum*), alfalfa (*Medicago sativa*), plátano (*Musa cabendishi*), arroz (*Oriza sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chicharo (*Pisum sativum*), manzana (*Pyrus communis*), rábano (*Raphanus sativus*), papa (*Solanum tuberosum*), sorgo (*Sorghum vulgare*), haba (*Vicia faba*), vid (*Vitis vinifera*), maíz (*Zea mays*), calabaza (*Cucurbita pepo*), fresa (*Fragaria* sp.), café (*Coffea arabica*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*), entre otros (Romero, 1993 y Mendoza, 1996).

2.4.2.3. Epidemiología y ciclo biológico

El tubo germinal de las esporas o el micelio de *Pythium aphanidermatum* entran en contacto con las semillas o los tejidos de las plántulas hospedantes, ya sea al azar o porque los exudados de esas plantas le sirven al hongo como nutrientes y estimulantes quimiotrópicos para sus zoosporas y micelio, los

cuales se mueven o crecen en dirección de las plantas. El hongo penetra directamente en las semillas a través de sus cubiertas hinchadas y humedecidas, o bien a través de hendiduras, incluso puede entrar al embrión o a los tejidos de las plántulas emergentes mediante penetración directa y por degradación enzimática. Las enzimas pectinolíticas que secreta el hongo degradan la lámina media que mantiene unidas a las células, dando como resultado la maceración de los tejidos. Así, la semillas infectadas que han sido destruidas forman una masa putrefacta que consta principalmente del hongo y sustancias como la suberina y lignina a las que el hongo no puede degradar (Agrios, 1996).

La infección de las raíces y los tallos de las plántulas tiernas y jóvenes ocurre a nivel de la superficie del suelo o ligeramente por debajo de ella dependiendo del grado de humedad y de la profundidad de siembra. El micelio del hongo penetra directamente en las células epidérmicas y corticales, se nutre de todos sus contenidos y degrada sus paredes celulares desintegrando sus tejidos. Las plántulas que han sido invadidas mueren con gran rapidez (Romero, 1993 y Agrios, 1996).

2.4.2.4. Síntomas

Antes de la emergencia, en las plantas atacadas por *Pythium aphanidermatum*, se desarrollan lesiones acuosas y ligeramente oscuras que al extenderse invaden todos los tejidos. La infección después de la emergencia, se desarrolla a nivel de la línea del suelo; la zona invadida se vuelve acuosa y decolorada, se

pierde firmeza y al dañarse circularmente la base del tallo, la plántula se dobla, cae al suelo y muere rápidamente (Agrios, 1996).

2.4.2.5. Medidas de control

2.4.2.5.1. Control biológico

Algunos microorganismos antagonistas como las *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter cloacae* y *Pythium oligandrum*, han mostrado potencial en el control biológico de *Pythium aphanidermatum* (Zhou y Paulitz, 1993 y Postma, *et al.*, 2000).

2.4.2.5.2. Control genético

No existen variedades de calabaza resistentes a este patógeno disponibles en el mercado, pero a nivel experimental se han obtenido plantas de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) con excelente grado de resistencia (Sánchez y Velásquez, 1999).

2.4.2.5.3. Control cultural

Se recomienda utilizar semilla sana y preferentemente tratada con fungicida. En invernadero, se recomienda utilizar sustratos esterilizados y la eliminación de plantas enfermas.

2.4.2.5.4. Control químico

Existen funguicidas sistémicos específicos para el control de hongos Oomycetes, tales como el metalaxyl, propamocarb, fosetyl- Al, quitosano, cymoxanil y oxadyxyl en aplicación al suelo. La semilla puede tratarse con daconil, o captan (Sanders, *et al.*, 1990, El Ghaouth, *et al.*, 1994 y Mendoza, 1996).

2.4.3. Pudrición radicular y marchitez por *Phytophthora capsici* Leonian (1992) emend. A. Alizadeh and P. H. Tsao (1988); Tsao (1991); Mchau and Coffey (1995)

2.4.3.1. Importancia y distribución

Esta especie fue descrita por Leonian (1992) en Nuevo México, Estados Unidos; causando tizones en chile pimienta. En México, puede causar pérdidas de 40- 80% en los cultivos de chile, berenjena, tomate, y cucurbitáceas (Mendoza, 1996). Actualmente se le reporta causando pérdidas económicas importantes en un sin número de cultivos a nivel mundial (Miller, *et al.*, 1994, y Erwin y Ribeiro, 1996).

Bajo condiciones favorables de temperatura (de 11 a 35° C, óptima de 25 - 28° C) y alta humedad en el suelo, este patógeno puede destruir tanto almácigos (Fig. 2) como campos enteros de siembra en poco tiempo (Ristaino *et al.*, 1992 y Romero, 1993).

2.4.3.2. Diversidad de hospedantes

Phytophthora capsici originalmente fue considerado como un patógeno específico del cultivo del chile (*Capsicum annum*); posteriormente fue encontrado en otros hospedantes como: calabazas (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativus*), frijol (*Phaseolus lunatus*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), berenjena (*Solanum melongena*), melón (*Cucumis melo*), y fresa (*Fragaria* spp.) (Romero, 1993 y Mendoza, 1996). Actualmente, se le reporta en una amplia gama de cultivos: cebolla (*Allium cepa*), anturio (*Anthurium andreanum*), lechuga (*Brassica oleracea*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), sandía (*Citrullus lanatus*), limón (*Citrus* spp.), toloache (*Datura stramonium*), zanahoria (*Daucus carota*), clavel (*Dianthus barbatus*), algodónero (*Gossypium hirsutum*), lino (*Linum* spp.), macadamia (*Macadamia integrifolia*), manzana (*Malus pumila*), alfalfa (*Medicago sativa*), tabaco (*Nicotiana glutinosa*), aguacate (*Persea americana*), pimienta (*Piper nigrum*), chicharo (*Pisum sativum*), durazno (*Prunus persica*), cacao (*Theobroma cacao*), vainilla (*Vanilla planifolia*) y haba (*Vicia faba*) (Erwin y Ribeiro, 1996).



Figura 2. Daños causados por *Phytophthora capsici* en almácigo.

2.4.3.3. Epidemiología y ciclo biológico

Phytophthora capsici sobrevive de una estación a otra en las semillas, residuos de cosecha y en el suelo como micelio u oosporas (Mendoza, 1996).

Las oosporas son la única fuente de inóculo primario y sobrevive en el suelo por más de dos años en ausencia del hospedante. El micelio es una fuente importante de inóculo secundario; en la semilla, el hongo forma micelio pero no sobrevive por más de un mes (Miller, *et al.*, 1994 y Cruz, *et al.*, 1998).

Las infecciones se dan en el cuello de la planta y son debidas a que las zoosporas del hongo son llevadas por el agua e inician la infección por las heridas, causando marchitamiento debido a la secreción de toxinas del hongo y taponamiento de los vasos conductores (Agrios, 1996).

2.4.3.4. Síntomas

En Cucurbitáceas puede causar pudrición de raíz y frutos, en estos últimos se diferencian dos tipos de síntomas: a) inicialmente se observan pequeñas decoloraciones circulares de color café, las cuales, a través del tiempo incrementan en tamaño y cambian a una coloración verde olivácea y de consistencia acuosa, b) lesiones acuosas con márgenes irregulares que en estados avanzados presentan micelio de color blanco, adquiriendo el fruto una consistencia suave.

En el follaje se puede observar marchitamiento de las guías, debido al daño sufrido en la base del tallo, el cual adquiere una consistencia corchosa (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.4.3.5. Medidas de control

2.4.3.5.1. Control cultural

Sembrar en suelos bien nivelados y con buen drenaje, estableciendo sobre surcos altos y dar riegos ligeros y frecuentes; hacer rotaciones de cultivos por más de tres años, así como la eliminación de plantas enfermas del cultivo (Ristaino, *et al.*, 1992; Miller, *et al.*, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996 y Cruz, *et al.*, 1998).

2.4.3.5.2. Control genético

Sánchez y Velásquez (1999) encontraron a nivel experimental, plantas de calabaza (*C. pepo* L.) y chilacayote (*C. ficifolia* Bouché) resistentes a *P. capsici*, aunque hasta la fecha no existen variedades comerciales resistentes al patógeno en el mercado.

2.4.3.5.3. Control químico

Se recomienda metalaxil en polvo para tratamiento a la semilla, suelo y follaje; Es importante iniciar el control con productos preventivos como el mancozeb, en alternancia con productos curativos sistémicos como mefenoxam, metalaxil

+ clorotalonil, fosetyl- Al , entre otros, para evitar generar resistencia (Erwin y Ribeiro, 1996; Mendoza, 1996; Lamour y Hausbeck, 2000).

2.4.4. Pudrición de la raíz y cuello *Rhizoctonia solani* Kühn

2.4.4.1. Importancia y distribución

Este hongo es uno de los patógenos habitantes del suelo más importantes ya que se encuentra distribuido en todo el mundo, causando pérdidas considerables en todo tipo de plantas: malezas, ornamentales, agrícolas, frutales y forestales (Blancard, *et al.*, 1991; Romero, 1993 y Agrios, 1996).

2.4.4.2. Diversidad de hospedantes

Entre los cultivos atacados por este patógeno se encuentran: el tomate (*Lycopersicum sculentum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*), espinaca (*Spinacea oleracea*), lechuga (*Brassica oleracea*), zanahoria (*Daucus carota*), camote (*Ipomoea batata*), chile (*Capsicum annum*), algodón (*Gossypium hirsutum*), fresa (*Fragaria* spp.), papa (*Solanum tuberosum*), haba (*Vicia faba*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), soya (*Glicyne max*), berenjena (*Solanum melongena*), cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium* sp.), rábano (*Raphanus sativus*), espárrago (*Asparagus officinalis*), nabo (*Raphanus raphanistrum*), apio (*Apium graveolens*), melón (*Cucumis melo*), pepino (*Cucumis sativus*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), remolacha azucarera (*Ipomoea* sp.), bulbos de tulipán (*Tulipa* sp.), clavel

(*Dianthus* sp.) y gladiolo (*Gladiolus* sp.), entre otros (Ichielevich- Auster, *et al.*, 1985; Blancard, *et al.*, 1991; Romero, 1993 y Mendoza, 1996).

2.4.4.3. Epidemiología y ciclo biológico

El patógeno inverna casi siempre en forma de micelio o esclerocios en el suelo; en plantas perennes infectadas o en órganos propagativos como bulbos y tubérculos. El hongo se disemina por la lluvia, riego, labores de cultivo y mediante órganos vegetativos infectados. La temperatura necesaria para que los síntomas se manifiesten varía entre los 15-35° C, siendo la óptima entre los 18-26° C (Benson y Baker, 1974 y Agrios, 1996).

2.4.4.4. Síntomas

Los síntomas comunes ocasionados por *Rhizoctonia solani* Kühn en la mayoría de los cultivos son el ahogamiento con lesiones necróticas y pudrición de raíces. Las plántulas pueden morir antes de que emerjan del suelo (muerte preemergente), debido a la destrucción del meristemo apical, si las plántulas llegan a emerger, entonces el ataque es a la base del tallo, donde tiene lugar una pudrición húmeda que provoca que las plántulas caigan y mueran, la lesión siempre es hundida y muestra varios tonos de café canela a café-rojizo (ahogamiento postemergente).

En plantas adultas se puede observar canchros del tallo y pudrición de raíces. Justamente por debajo de la superficie del suelo, se forman lesiones hundidas, de color café rojizo que, si las condiciones del suelo y clima son favorables,

llegan a abarcar toda la base del tallo y las raíces; como resultado, las plantas muestran un debilitamiento general, amarillamiento del follaje y algunas veces la muerte (Romero, 1993).

2.4.4.5. Medidas de control

2.2.2.5.1. Control biológico

Algunas bacterias del género *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., habitantes naturales de la rizosfera, pueden ayudar a mantener controladas las poblaciones de este patógeno.

2.4.4.5.2. Control cultural

En condiciones de campo es difícil erradicar esta enfermedad, pero la adopción de algunas medidas como las siguientes, ayudan a retrasar la dispersión de la enfermedad en la parcela: eliminación y quemado de plantas enfermas, evitar riegos pesados y excesivos. En invernadero se debe utilizar material vegetal sano y sustratos esterilizados con vapor a 60° C durante 30 minutos (Blancard, *et al.*, 1991 y Rodríguez, 1998).

2.4.4.5.3 Control químico

Existen productos específicos en el control de *Rhizoctonia* como el pencycuron y el fluazinam. Otros productos como el benlate, zineb, carbendazim, quintoceno, clorotalonil, captán y tecto, también ofrecen buenos resultados (Mendoza, 1996).

2.5. El cultivo de tejidos

2.5.1. Importancia

En el mejoramiento vegetal el cultivo de tejidos juega un papel determinante, ya que a través del cultivo *in vitro* es posible obtener individuos haploides, cuya duplicación posterior de su número cromosomal dará origen a diploides, triploides, etc., homocigóticos. El intercambio y almacenamiento de Germoplasma es otra utilización frecuente de la técnica; además de que sirve como herramienta en investigaciones bioquímicas y fisiológicas en la búsqueda para incrementar el conocimiento en biología celular. En la actualidad, el cultivo de tejidos ha sido perfectamente integrado a la Biotecnología e Ingeniería Genética, permitiendo la regeneración de plántulas como clones y transgénicos (Quintana, 1988; Segura, 1989; Pierik, 1990 y Montoya, 1991).

Los métodos de multiplicación asépticos han presentado ventajas con respecto a los métodos tradicionales, debido a que se pueden lograr altas tasas de multiplicación de plantas sanas en corto tiempo, utilizando espacios reducidos y sin limitaciones por la época del año. Así pues, el cultivo de tejidos *in vitro* representa una herramienta valiosa para el mejoramiento genético y el estudio de diversos fenómenos fisiológicos de las plantas.

Robles (1993) menciona que la producción masiva y relativamente rápida de las plantas sanas y de alta calidad genética, es una de las aplicaciones prácticas del cultivo de tejidos vegetales. Con esta técnica se puede lograr en poco

tiempo y de manera sostenida en cualquier época del año, la producción de plantas vigorosas y sobre todo libres de plagas y enfermedades. A partir de un ápice de planta seleccionada, es posible producir infinidad de nuevas plantas (vitroplantas), las cuales conservan las características de la planta original.

La producción de plantas mediante cultivo de tejidos comprende una secuencia de cinco fases principales que van desde la selección de la planta de la cual se obtendrá el explante, cosecha del mismo, establecimiento en el medio de cultivo, multiplicación y aclimatación del material propagado para su trasplante en invernadero (Murashige, 1974; Pierik, 1990 y Montoya, 1991).

Villatoro (1996) menciona que antes de iniciar la micropropagación de cualquier especie vegetal es necesario conocer los factores que intervendrán en el proceso de multiplicación *in vitro*, tales como las concentraciones de los constituyentes del medio de cultivo, condiciones hormonales para la inducción de brotación de hojas y raíces y las condiciones físicas de incubación.

2.5.2. Antecedentes en calabaza y otras Cucurbitáceas

A continuación se describen brevemente algunos trabajos enfocados a la multiplicación *in vitro* de calabazas (*Cucurbita pepo* L.):

Schroeder (1968), tomó tejidos de las paredes del pericarpio de un fruto fresco de *Cucurbita pepo* L. variedad 'Zucchini', el cual había sido cultivada *in vitro* bajo condiciones estériles por cerca de 30 meses, el tejido se transfirió a medio

de cultivo, en el cual se observó crecimiento de callos (masa amorfa de células), que posteriormente se diferenciaron en plántulas completas, lo cual indicó que cada célula tiene la totipotencialidad de generar un nuevo individuo.

Jelaska (1972, 1974) y Jelaska *et al.*, (1985) sembraron explantes de cotiledones de *Cucurbita pepo* L. en medio de cultivo MS (Murashige and skoog, 1962), al cual le adicionaron glucosa como fuente de carbono, obteniendo plántulas vigorosas.

Whener y Locy (1981) tomaron explantes de hipocótilos y cotiledones de plántulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) germinadas *in vitro* bajo condiciones altamente asépticas y sembradas en medio de cultivo MS (Murashige and skoog, 1962) al cual le adicionaron $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Bencil Adenina (BA), $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido indol acético + 3 % de sacarosa, logrando obtener plántulas completas.

Pink y Walkey (1984), emplearon la técnica de cultivo de tejidos para obtener una rápida multiplicación de clones de *Cucurbita pepo* L. cultivar 'Cinderella', el cual mostró excelente resistencia al Virus Mosaico del pepino (CMV); obtuvieron meristemos de plántulas germinadas *in vitro* bajo completa desinfección y los sembraron en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), al cual le adicionaron $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA, obteniendo excelentes resultados; los subcultivos se realizaron cada 3 semanas en promedio.

Lee y Thomas (1985) sembraron yemas axilares de la calabaza búfalo (*Cucurbita foetidissima* HBK.) en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con $1-5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido naftalenacético. Lograron obtener plántulas vigorosas que posteriormente fueron transplantadas exitosamente a invernadero en sustrato estéril.

Plader, *et al.*, (1998), estudiaron los cambios fenotípicos que pueden existir en el proceso de regeneración *in vitro*, los cuales pueden ser observados en poco tiempo o hasta una generación infinita y provocados por factores genotípicos de la planta madre, la duración del cultivo y concentración de hormonas, entre otros.

Como se aprecia, todos los protocolos de micropropagación de calabazas parten de explantes obtenidos a partir de plántulas germinadas *in vitro* en condiciones asépticas, lo cual no es posible en el caso de que se desee clonar plantas que se seleccionaron por su resistencia en bioensayos conducidos en invernadero, de donde se transplantan a campo las plantas para verificar su resistencia en planta adulta.

2.5.3. Fases del proceso de multiplicación *in vitro* (Murashige, 1974; Pierik, 1990)

Fase 0: Se refiere a lo que ocurre antes de que comience el cultivo *in vitro*. Esto es la elección y mantenimiento adecuado de la planta madre seleccionada.

Fase 1: Realizar el aislamiento estéril de los explantes sean meristemos, ápices del vástago o segmentos meristematicos de la planta seleccionada, y establecimiento del cultivo aséptico.

Fase 2: Es la fase de multiplicación. El primer objetivo en ella es conseguir la propagación sin perder la estabilidad genética. En esta fase se requiere llevar a cabo un crecimiento y desarrollo sin contaminación por microorganismos. Los ápices perfectamente desinfectados se siembran en un medio de cultivo artificial y bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura.

Fase 3: Incluye la preparación de las plántulas que se obtuvieron en la fase 2, para ser transferidas al suelo en ambiente natural.

Fase 4: Comprende la transferencia desde el tubo de ensayo al suelo y el establecimiento y aclimatación de las plántulas. Las vitroplantas se sacan del medio de cultivo y se les lavan los residuos, posteriormente se plantan en suelo orgánico esterilizado y se pasan al invernadero; donde gradualmente se exponen a las condiciones naturales de luz, temperatura y humedad. Al cabo de dos semanas, las plantas emiten hojas nuevas adaptadas al ambiente natural.

2.5.4. Aclimatación desde el medio de cultivo al invernadero - suelo.

1. Una planta que se ha originado *in vitro*, difiere en muchos aspectos de las que se originan *in vivo*. Así, las plantas cultivadas en medios de cultivo tienen generalmente la cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada, debido a la

alta humedad relativa (90-100%) que se da *in vitro*. Como consecuencia, cuando se transfiere la planta al suelo, se produce una transpiración cuticular adicional, ya que la humedad del aire en las condiciones *in vivo* es más baja. Las hojas de una planta producida *in vitro*, son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas; y por consiguiente mal adaptadas a las condiciones que se pueden encontrar *in vivo*. Las plantas procedentes de cultivo de tejidos tienen las células en empalizada, que son las que deben utilizar la luz, más pequeñas y en menor cantidad. Los estomas de las plantas *in vitro* pueden no ser suficientemente operativos; y al permanecer abiertos, cuando la planta ha pasado al suelo, puede ser el origen de un importante estrés hídrico, durante las primeras horas de aclimatación. En las plantas micropropagadas, la conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conducción vascular. Es importante tener en cuenta que las plantas *in vitro* han sido criadas como heterótrofas, pero se deben comportar como autótrofas *in vivo*: el azúcar debe ser producido por medio de la fotosíntesis (Pierik, 1990).

Por lo anteriormente dicho, a las plantas *in vitro* se les debe dar un cierto tiempo para acostumbrarse a las condiciones *in vivo*; y/o permitirles aclimatarse *in vitro*, de manera que queden endurecidas para afrontar el nuevo ambiente. La aclimatación debe realizarse permitiendo a las plantas micropropagadas habituarse de forma gradual a una humedad relativa más baja, como la que encontraran *in vivo*.

2. Las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* (no tienen, o tienen pocos pelos radicales); por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. El desarrollo de pelos radicales *in vitro* puede a veces ser estimulado al desarrollar las raíces en un medio líquido. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración (Ammirato, *et al.*, 1990; Pierik, 1990; Vasil y Thorpe, 1994).

Ammirato, *et al.*, 1990; Pierik, 1990; Vasil y Thorpe, 1994, recomiendan seguir las siguientes indicaciones para el transplante del medio de cultivo al suelo u otro sustrato:

- a) Para evitar infecciones por hongos y bacterias, el agar (con azúcar) debe ser bien eliminado y utilizar suelo esterilizado de preferencia con vapor.
- b) Para evitar daños a las raíces, es recomendable plantar en suelo finamente tamizado.
- c) Regar las plántulas recién transplantadas con una solución de fungicida.
- d) Si se tienen las posibilidades, se deben instalar cortinas de humedad con sistemas de niebla automáticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fase de invernadero

3.1.1. Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo durante el verano del 2001 en un invernadero del Departamento de Fitotecnia, localizado en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

El lugar se ubica entre los paralelos 19° 29' latitud Norte y 98° 53' longitud Oeste, a una altura de 2250 msnm, con un clima que corresponde a un Cb (wo) (i')g; es decir, templado subhúmedo con verano fresco y largo, con una temperatura media anual de 15.2° C, con lluvias en verano y una precipitación media anual de 636.5 mm (García, 1988).

3.1.2. Material genético evaluado

Se utilizó germoplasma de *Cucurbita pepo* L., proveniente de colectas realizadas en la Sierra Norte del Estado de Puebla; Valle de Chalco, estado de México y Valle de Cuautla, Morelos (Villanueva 2001, comunicación personal).

3.1.3. Diseño experimental

Debido a las condiciones homogéneas del invernadero donde se desarrolló el experimento, se utilizó el diseño experimental completamente al azar, el cual consistió de cinco tratamientos y un testigo absoluto (Cuadro 6), con cinco repeticiones en los tratamientos individuales (especies de hongo), y en el testigo absoluto. En el caso del tratamiento de la mezcla de hongos se incluyeron ocho repeticiones debido a que en ella se esperaba mayor agresividad sobre las plantas, en comparación con los hongos inoculados por separado; y porque parte de los objetivos fue obtener plantas resistentes. La unidad experimental consistió de una charola en la cual se sembraron 100 semillas alineadas en surquillos y colocadas equidistantemente y con la punta delgada hacia abajo.

Cuadro 6. Hongos patógenicos inoculados en calabaza (*Cucurbita pepo* L.) para resistencia a enfermedades de la raíz, Chapingo, México, 2001.

Trat.	<i>C. pepo</i> L.	Densidad de inóculo
T ₁	<i>R. solani</i>	2.36×10^4 propagulos $\cdot$ mL ⁻¹
T ₂	<i>F. oxysporum</i>	5×10^6 conidios $\cdot$ mL ⁻¹
T ₃	<i>P. capsici</i>	5×10^4 zoosporas $\cdot$ mL ⁻¹
T ₄	<i>P. aphanidermatum</i>	5×10^6 zoosporas $\cdot$ mL ⁻¹
T ₅	Mezcla de hongos	Mismas concentraciones de especies individuales
T ₆	Testigo*	Sin inoculación de hongos

* Sin inoculación de hongos.

3.1.4. Modelo estadístico

Los experimentos fueron analizados bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Respuesta obtenida en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento.

μ : Efecto medio general del experimento.

T_i : Efecto atribuido al i-ésimo tratamiento.

E_{ij} : Término de error aleatorio, asociado a cada unidad experimental.

3.1.5. Aislamiento e incremento del inóculo

Para el aislamiento de los patógenos considerados en esta investigación se eligió un lote del Campo Agrícola Experimental de Chapingo, en el cual existía una plantación de calabazas (*Cucurbita pepo* L.) en asociación con maíz; y que además había estado sembrada esta misma asociación durante seis años consecutivos con intermedio de siembra invernal de avena, donde año tras año se incrementaban las pérdidas tanto en plántulas como de plantas adultas por enfermedades de la raíz.

Se colectaron plántulas de calabazas enfermas con síntomas de ahogamiento, además de plantas adultas que mostraban síntomas de marchitamiento y amarillamiento, causados por la obstrucción y pudrición del sistema radical

(Cruz, *et al.*, 1998). De esta manera, fue aislado el hongo *Fusarium oxysporum*. Los hongos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*, utilizados fueron cepas procedentes del Colegio de Postgraduados (Mendoza y Tlapal 2001, comunicación personal).

Una vez obtenidas las cuatro especies de hongos requeridas se prosiguió a su incremento en el Laboratorio de Micología, del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH. Para *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* se usó medio de cultivo PDA (Papa- Dextrosa- Agar) y para el caso de *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* se incrementaron en medio de cultivo selectivo a base de jugo de tomate. Las condiciones en que se mantuvieron las cepas de los diferentes hongos para su desarrollo fueron de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con una temperatura promedio de 25° C (Ainsworth y Sussman, 1965; Freeman y Rodríguez, 1993; Romero, 1993; Postma *et al.*, 2000 y Sujkowski *et al.*, 2000).

3.1.6. Preparación del inóculo

Una vez que los hongos se desarrollaron completamente en las cajas petri, se preparó el inóculo (con cepas de 2 semanas de edad), licuando el contenido de cada caja en agua destilada estéril. La concentración de inóculo se ajustó empleando un hematocitómetro. De *Fusarium oxysporum* se utilizaron 5×10^6 conidios·mL⁻¹ (Freeman & Rodríguez, 1993; Pan & More, 1996 y Migheli *et al.*, 2000); *Rhizoctonia solani*, 2.36×10^4 propágulos·mL⁻¹ (Sánchez y Velásquez,

1999); *Pythium aphanidermatum*, 5×10^6 zoosporas·mL⁻¹ (Postma *et al.*, 2000) y *Phytophthora capsici*, 5×10^4 zoosporas·mL⁻¹ (Sujkowski *et al.*, 2000).

3.1.7. Siembra e inoculación

El sustrato utilizado fue Peat – Moss[®] ya que este material cuenta con excelentes características de la retención de agua y el pH no influye en el crecimiento de las plantas por ser un material inerte. Se utilizaron charolas de plástico de 45 x 35 x 11 cm, como contenedores sin perforaciones para evitar pérdidas de la suspensión del inóculo y eventuales escapes a la infección. A cada contenedor se le adicionó un promedio de 650 g de Peat – Moss[®], con los cuales se cubrieron 7 cm de espesor en la charola. Para la siembra se depositaron un total de 100 semillas por charola, cuidando que todas quedaran en la misma posición, profundidad y distancia.

Ya sembrado, se procedió a la inoculación, la cual consistió en adicionar 3 litros de suspensión de inóculo por charola, ya que a esa cantidad se lograba la saturación del sustrato. Se inoculó cada patógeno por separado, a las concentraciones mencionadas. En el caso de la mezcla de hongos, se usaron las mismas concentraciones que para los tratamientos individuales (especie de hongo) y en lo que corresponde al testigo absoluto, sólo se saturó con agua proveniente de pozo profundo.

La segunda inoculación se llevó a cabo 10 días después de la primera, agregando un litro de inóculo a los tratamientos, a la misma concentración que la primera, esto para garantizar que ninguna planta escapara a la exposición del hongo inoculado y de esta forma se presentara resistencia por escape. Para esta fecha ya había comenzado la germinación.

3.1.8. Riegos

Se realizaron cada tercer día para mantener las condiciones necesarias de humedad en los tratamientos y de esta forma lograr los síntomas de enfermedad deseada. Después de la germinación y hasta tres semanas posteriores a ésta, los riegos se efectuaron con agua de pozo profundo debido a que las plántulas todavía contaban con reservas de energía almacenada en los cotiledones. Pasado este tiempo, se utilizó una solución nutritiva (Cuadro 7) para aplicarla dos veces por semana, intercalado con un riego semanal de agua de pozo. Al inicio se utilizó la solución nutritiva al 25% de concentración, esto para evitar causar quemaduras en las plántulas. Una vez que las plantas alcanzaron las cinco semanas de edad, se empleó la solución nutritiva al 50% y; a las siete semanas al 100% de concentración.

Cuadro 7. Cantidades de nutrientes utilizadas para preparar 200 litros de solución nutritiva tipo Steiner, empleada en calabazas (*Cucurbita* spp) para resistencia a enfermedades de la raíz. Chapingo, México, 2001.

Nutriente	Fórmula	Concentración		
		25%	50%	100%
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	43.5 g	87 g	174 g
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	61.5 g	123 g	246 g
Nitrato de Potasio	KNO ₃	37.5 g	75 g	150 g
Nitrato de Calcio	Ca(NO ₃) ₂	130 g	260 g	520 g
Sulfato Ferroso	FeSO ₄	0.5 g	1.0 g	2.0 g
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄	0.25 g	0.5 g	1.0 g
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄	0.1 g	0.2 g	0.4 g
Sulfato de Cobre	CuSO ₄	0.1 g	0.2 g	0.4 g
Ácido Fosfórico	H ₂ PO ₄	1.5 mL	3.0 mL	6.0 mL
Bórax	-	0.5 g	1.0 g	2.0 g
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	1.0 mL	2.0 mL	4.0 mL

Fuente: Villanueva 2001, comunicación personal.

3.1.9. Evaluación de variables

3.1.9.1. Porcentaje de germinación

Se contabilizó el número de semillas germinadas en cada unidad experimental.

El conteo se realizó a los 8, 12 y 16 días después de la siembra (dds) .

3.1.9.2. Muerte Post-emergente

Para la evaluación de esta variable se tomó una muestra al azar por unidad experimental constituida por 30 plantas; y en ellas se contó el número de plantas muertas, a los 15, 21, 28, 35 y 41 dds.

3.1.9.3. Incidencia

Se realizaron conteos de las plantas que mostraron síntomas del ataque de los hongos a los 15, 21, 28, 35 y 41 dds. Tomando una muestra al azar de 30 plantas por evaluación.

3.1.9.4. Severidad

Se utilizó una escala exprofeso para evaluar esta variable, tomando una muestra aleatoria de 30 plantas por repetición; ubicándolas en las diferentes categorías de acuerdo al grado de la enfermedad (Cuadro 8). Los registros fueron a los 15, 21, 28, 35 y 41 dds.

Cuadro 8. Escala utilizada para evaluar grado de severidad.

CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN
0	Síntomas foliares no visibles.
1	Clorosis foliar en 1 ó 2 hojas.
2	Clorosis foliar en 3 ó 4 hojas.
3	Clorosis foliar en más de 4 hojas y marchitamiento.
4	Clorosis, marchitamiento y achaparramiento.
5	Planta muerta.

Fuente: Mendoza, Z. C. 2001, comunicación personal.

3.1.9.5. Porcentaje de infección

Se determinó mediante la fórmula de Townsend y Heuberger (1943) a los 15, 21, 28, 35 y 41 dds, mostrada a continuación:

$$P = \frac{\sum_{i=1}^N n v_i}{(\text{Categoría mayor}) (N)} \times 100$$

Donde:

P: porcentaje de infección para cada unidad experimental respecto al total sembrado.

i= i-ésima categoría de severidad.

n: número de plantas por categoría.

v: valor numérico de cada categoría, según la escala del Cuadro 8.

Categoría mayor: 5, según la escala del Cuadro 8.

N: número total de plantas de la muestra.

3.1.10. Reaislamiento de patógenos

Una vez que la infección se presentó en las plantas de cada uno de los tratamientos, se procedió a coleccionar plantas enfermas para verificar que la infección realmente fue causada por los hongos inoculados: para ello se tomó tejido enfermo de la zona de transición (entre el tejido enfermo y sano) y se sembraron en medio de cultivo de acuerdo a cada hongo (PDA o jugo de tomate) y luego se identificaron mediante preparaciones observadas al microscopio compuesto.

3.1.11. Transplante a suelo acolchado de plantas resistentes en invernadero

Después de haber realizado las evaluaciones para las variables contempladas en esta investigación, se procedió al transplante de todas las plantas que lograron sobrevivir a la inoculación de los diferentes hongos (Fig. 3), en un invernadero del Campo Agrícola Experimental San Martín. Esto ocurrió después de los 50 dds (13 de Agosto de 2001). La Figura 4 muestra un resumen de las diferentes etapas que se siguieron en el desarrollo de esta investigación

Para el transplante cortó una circunferencia de sustrato de 10 cm de radio de cada planta resistente, para posteriormente colocarla en cepas de 20 X 20 cm en invernadero, con una separación entre cepas e hileras de 1.5 m, preparadas con anterioridad; una vez colocadas las plantas mencionadas, se procedió a llenar la cepa con suelo, se regó y se etiquetaron las plantas para no perder su identidad.

Por último se fertilizó con 100 g de urea al lado de cada planta. Cabe mencionar que el transplante se realizó por la mañana para de esta forma evitar causar demasiado estrés a las plantas por calor; además, no se realizó ningún tipo de tratamiento con fungicidas al momento del transplante. Es decir, los hongos inoculados estuvieron todo el tiempo en contacto con el sistema radicular de las plantas.

3.1.12. Polinización controlada

Una vez que las plantas transplantadas en el invernadero llegaron a la fase de floración, se procedió a la autofecundación manual controlada, con la finalidad de fijar genéticamente la resistencia de las plantas que resistieron a los hongos inoculados y evitar que la resistencia encontrada hasta ese momento se perdiera ó erosionara, al cruzarse mediante polinizadores (abejas) con plantas susceptibles de siembras comerciales ubicadas dentro del radio de acción de las abejas (5 km).

La polinización consistió en cubrir las flores masculinas y femeninas (Fig 5 y 6) próximas a abrir (24 h antes) con bolsas de papel glacyne sujetadas con un clip. A la mañana siguiente, se procedía a la polinización, desprendiendo completamente la flor masculina eliminándole la corola; a la flor femenina también se le eliminaba la corola, y luego se depositaba el polen friccionando las anteras de la flor masculina en el estigma de la flor femenina, la cual se cubría nuevamente con la bolsa de papel glacyne y se le anotaban los datos: fecha, tipo de polinización y clave de la especie de hongo probada. Esta actividad se realizó en los meses de septiembre y parte de octubre de 2001. La polinización controlada se debe realizar antes de las 11:00 h debido a que después el polen se deshidrata fácilmente con el sol y pierde viabilidad.

3.1.13. Cosecha de frutos

Esta actividad se llevó a cabo en el mes de enero del 2002, una vez que los frutos se encontraban completamente maduros (Fig. 7), para evitar que la

semilla estuviera tierna y no presentara problemas de germinación al momento de la siembra.

A los frutos cosechados se les tomaron los siguientes datos: especie de calabaza, especie de hongo probada, largo y ancho de fruto, color, sabor y grosor de pulpa, para tener referencias posteriores y poderlos comparar con los frutos obtenidos de plantas resistentes clonadas mediante cultivo de tejidos y de esta forma observar si existe variabilidad en cuanto a las características de los frutos obtenidos de las plantas originalmente resistentes con sus respectivos clones producidos *in vitro*.



Figura 3. Transplante de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) resistente a *Rhizoctonia solani* a suelo acolchado en condiciones de invernadero (Agosto, 2001).

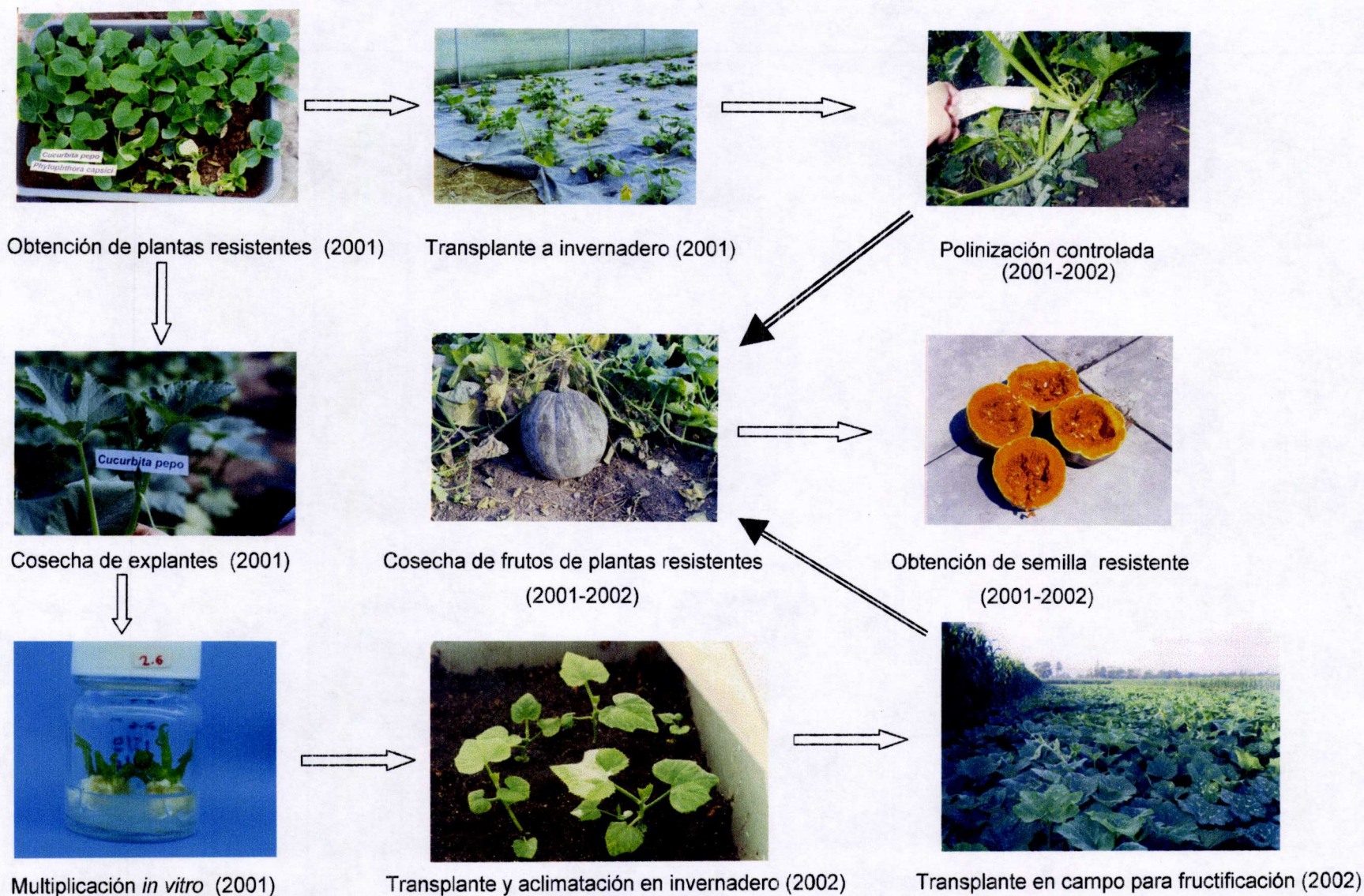


Figura 4. Esquema metodológico de las fases en invernadero, laboratorio y campo, para obtención de calabazas resistentes a hongos causantes de damping-off. Chapingo, Méx. 2001-2002.



Figura 5. Flor femenina de calabaza (*C. moschata*). **Figura 6.** Flor masculina de calabaza (*C. moschata*).



Figura 7. Frutos maduros de calabaza (*Cucurbita moschata*) listos para cosecha, de plantas resistentes a damping-off .

3.2. Fase de laboratorio

3.2.1. Cosecha de explantes

Antes de transplantar a invernadero el material que resultó resistente, se cosecharon las puntas de las guías para ser utilizadas como explantes (Fig. 8), ya que aquí se localizan los meristemos apicales que son los órganos útiles para la micropropagación mediante el uso de la técnica de cultivo de tejidos o multiplicación *in vitro*.

Esta actividad se llevó a cabo cuando las plantas tenían 50 dds, antes de la etapa de floración. La cosecha de explantes se realizó por la mañana para evitar que se deshidrataran por efecto del calor. Cada punta de guía se cortó con una navaja e inmediatamente se depositó en una bolsa de plástico, teniendo el cuidado de etiquetarla para no perder la identidad tanto de la especie de calabaza como de la del hongo a la que mostró resistencia.

3.2.2. Desinfección de explantes

Una vez que se cosecharon los explantes en el invernadero del Campo Agrícola Experimental de Chapingo, se trasladaron rápidamente al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados.

Los explantes se lavaron durante una hora en agua jabonosa (detergente común) contenida en un vaso de precipitado, agitando suavemente el tejido; luego se decantó la solución jabonosa, teniendo cuidado de que el tejido

permaneciera en el recipiente. El tejido se enjuagó varias veces con agua destilada hasta que desaparecieron completamente los residuos de jabón. En seguida se sumergió el tejido en alcohol al 70% durante 1 minuto y luego se pasó a una solución de hipoclorito de sodio al 10% de concentración más 2 gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Por último, el tejido se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

3.2.3. Medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962)

Para preparar un litro de medio de cultivo MS se agregaron 500 mL de agua des-ionizada en un matraz de Erlenmeyer de 1 L. Se adicionaron 30 g de sacarosa. Disolver completamente. Posteriormente añadir las soluciones madre en el siguiente orden: 20 mL de solución A, 5 mL de cada una de las soluciones B a la G (Cuadro 9), más 1 mL de Benciladenina (BA una hormona del grupo de las citocininas). Agitar completamente y aforar a 1 litro. Calibrar el pH del medio de cultivo a 5.7 con un potenciómetro. A este valor de pH, los nutrientes son fácilmente asimilables (Pierik, 1990).

Para elevar el pH se utiliza NaOH 1 N, cuando el ajuste es grande y NaOH 0.1 N cuando el ajuste es pequeño; y para bajarlo se emplea HCl 1 N y 0.1N, cuando el ajuste es grande y pequeño, respectivamente.

Una vez ajustado el pH, agregar 7.5 g de agar-agar. Agitar durante 1 min para homogeneizar los componentes del medio. Calentar en horno de microondas durante 8 min a máxima potencia para fundir y disolver el agar, cuidando que

no alcance el punto de ebullición. Suspender el microondas y agitar el medio de cultivo cada 2 min para evitar que el agar precipite y se queme; posteriormente vaciar 25 mL de medio de cultivo a cada frasco gerber, previamente lavados, para después esterilizarlos en autoclave durante 20 min a 15 lb / pulg² a 121° C.

3.2.4. Siembra de explantes

En medio de cultivo sólido se sembraron los ápices de las guías de calabaza, previamente decapitados, con un tamaño aproximado de 5 mm² bajo condiciones de alta esterilidad o asepsia, empleando una campana de flujo laminar, material e instrumental de laboratorio para manipulación esterilizado, batas de laboratorio y cubrebocas.

Una vez sembrados los explantes, etiquetar cada frasco con una clave que identifique las especies de hongo y de calabaza, así como la fecha. En seguida colocar una banda de Agapack[®] o Parafilm[®] puenteando la tapa y el cuello del frasco en todo el entorno, para cubrir el vacío entre el frasco y su tapa y así evitar contaminaciones del material sembrado. La etapa final consistió en colocar los frascos sembrados con 6 explantes por frasco en promedio en el cuarto de incubación a una temperatura promedio de 26° C y fotoperíodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad, respectivamente.

Cuadro 9. Soluciones stock (madre) y sus componentes utilizados para preparar el medio de cultivo MS.

REACTIVOS	MS (mg/lit)	g/lit	Vol. a añadir (por litro)	g/100 mL
Solución A			20 mL	
NH ₄ NO ₃	1650	82.5		8.25
KNO ₃	1900	95.0		9.5
Solución B			5 mL	
H ₃ BO ₃	6.2	1.2		0.12
KH ₂ PO ₄	170	34.0		3.4
KI	0.83	0.17		0.017
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.05		0.005
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.005		0.0005
Solución C			5 mL	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	88.0		8.8
Solución D			5 mL	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	74.0		7.4
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3	4.46		0.45
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	1.72		0.17
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.005		0.0005
Solución E			5 mL	
Na ₂ EDTA	37.3	7.46		0.746
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	5.56		0.6
Solución F			5 mL	
Tiamina · HCl	0.1	0.02		0.002
Ácido nicotínico	0.5	0.10		0.01
Piridoxina (vit. B6)	0.5	0.10		0.01
Glicina	2.0	0.40		0.04
Solución G			5 mL	
Myo-inositol	100	20.0		2.0

Fuente: Murillo y Gil, 2002.

Recomendaciones al momento de la siembra de explantes:

Encender la campana de flujo laminar 30 min antes de comenzar a sembrar y limpiarla con alcohol al 96%.

Utilizar navajas nuevas para bisturí, del No. 10 u 11.

Usar cubrebocas.

Emplear cajas petri esterilizadas.

Flamear por 11 veces las pinzas y bisturí con alcohol antes de iniciar.

Siempre trabajar lo más cercano posible a la de flama de un mechero o lámpara de alcohol.

3.2.5. Fase de multiplicación

Esta actividad consiste en sembrar los explantes en frascos con medio de cultivo fresco, el cual contiene BA, responsable de la diferenciación de órganos (organogénesis directa) (Fig. 9).

A brotes que ya se han diferenciado en plántula o están por hacerlo y que se encuentran en medio de cultivo viejo se subcultivan en medio con BA. Esto se realizó cada 4 semanas en promedio, el cual corresponde al tiempo en que las plantas han agotado los nutrientes disponibles en el medio de cultivo. Pasado este tiempo (4 semanas), se vuelve a realizar esta actividad hasta obtener la cantidad de plantas deseadas. De cada explante (punta de guía) sembrado inicialmente, se tienen al cabo de un mes, 8 plantas en promedio.

3.2.6. Fase de enraizamiento y elongación

Una vez que las plantas estuvieron completamente formadas se empleó el medio de cultivo MS sin la hormona (BA), para causar enraizamiento y elongación de los brotes y obtener las plantas completas *in vitro* (Fig. 10). Pueden realizarse tantos subcultivos como sean necesarios, previa etapa de multiplicación para inducir la formación de nuevos brotes hasta tener el número deseado de plantas multiplicadas. Así como para esperar la época ideal del año (sin riesgos de heladas) para su aclimatación en invernadero y campo.



Figura 8. Cosecha de explantes para micropropagación



Figura 9. Multiplicación *in vitro*.



Figura 10. Elongación de plantas de calabaza (*C. pepo* L.) producidas *in vitro*.

3.3. Fase de aclimatación de plantas propagadas *in vitro*

3.3.1. Transporte

Una vez que pasó el período de heladas las plántulas multiplicadas en el laboratorio, se trasladaron a un invernadero del Campo Agrícola Experimental de Chapingo, procurando realizar esta actividad por la mañana para no dañarlas por el calor. Ya dentro del invernadero, se colocaron a la sombra durante dos días, eliminando la cinta de Agapack® y aflojando ligeramente la tapa de los frascos, evitando que los rayos del sol llegaran directamente a las plantas, pues la cutícula de las hojas es muy delgada y no contiene ceras y se pueden dañar por exceso de transpiración. Todo esto fue con la finalidad de que las plantas comiencen a adaptarse a condiciones diferentes a las existentes en el laboratorio donde estaban a temperaturas y fotoperíodo estables.

3.3.2. Sustrato

Se utilizó Peat- Moss[®], esterilizado durante una hora a 15 lb / pulg² a 121° C, para evitar contaminantes al momento del transplante. No se recomienda utilizar productos de composta o vermicomposta ya que éstos tienen un pH demasiado ácido y provoca quemadura y muerte en las plantas, a no ser de que sean mezclados con suelo o Peat- Moss[®], en proporción 1:3, respectivamente y se les incremente el pH a 6.0 adicionando cal.

3.3.3. Desinfección de charolas

Se utilizaron charolas de plástico de 45 x 35 x 11 cm como contenedores, las cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex[®]) al 10% durante 1 día.

3.3.4. Lavado y desinfección de plántulas

Antes de transplantar las plántulas micropropagadas, se procedió a la eliminación del medio de cultivo (agar) de sus raíces, mediante lavado con agua limpia, procurando no causar daños a las plantas en esta actividad. Posteriormente, se sumergían las plántulas completas durante 5 min en una solución preparada con el fungicida Captan[®] 50 PH (captan) a razón de 3 g / lt de agua, con la finalidad de prevenir contaminaciones en las plantas. Esta actividad se realizó a finales del mes de Marzo de 2002.

3.3.5. Transplante a invernadero y aclimatación

A cada charola se le depositó un promedio de 650 g de Peat- Moss[®] esterilizado, el cual se humedecía con agua limpia de pozo profundo para después transplantar las plántulas 35 plántulas por charola, tratando que todas quedaran a la misma distancia. Una vez realizado el transplante en las charolas se prosiguió a dar un ligero riego con la solución de captán. Posteriormente la charola se introdujo y se cubrió totalmente con una bolsa de polietileno simulando un microinvernadero, previa colocación de dos arcos de alambre dispuestos en forma de X y anclados en las esquinas internas de la charola. A los 7 días, conforme las plantas las plantas se fueron adaptando, se le hicieron dos agujeros de 2.5 cm de radio al microinvernadero; y a la siguiente semana otros dos, hasta llegar al grado de destapar completamente las charolas (a la tercera semana), cuando las plantas tuvieron la capacidad de estar en contacto directo con el medio ambiente(Fig. 11). En esta etapa se tuvo una eficiencia de 70% y duro aproximadamente 21 días.



Figura 11. Plantas producidas mediante cultivo de tejidos y aclimatadas en invernadero, listas para ser transplantadas a campo.

Durante este proceso todas las charolas con plántulas se acomodaron en un microtúnel cubierto con Agribon[®] y mallasombra, el cual tenía por encima un sistema de riego presurizado automático por nebulización.

3.3.6. Riegos

Para esta fase se contó con un sistema de riego presurizado diseñado especialmente para mantener las condiciones de humedad relativa alta dentro del invernadero, el cual era accionado por un timer programado para funcionar tres veces al día durante 15 min a las horas de calor más intenso (11:00, 13:00 y 15:00 h); en la fecha de transplante, las temperaturas máximas alcanzaban los 40° C dentro del invernadero. Para regar las plantas contenidas en las charolas dentro del microtúnel, se utilizó una botella adaptada con una aguja hipodérmica, a través de la cual se suministró de agua a las plantas, perforando con la aguja la cubierta del microinvernadero.

3.4. Fase de campo

3.4.1. Transplante

A las tres semanas en promedio las plantas generadas en laboratorio por cultivo de tejidos se aclimataron en invernadero y mostraron buena capacidad de adaptación. Entonces, se les retiró la bolsa de polietileno y días después fueron transplantadas a campo directo. Se proporcionó un riego abundante a la charola e inmediatamente las plantas se transplantaron y se etiquetaron para no perder

la identidad en el campo definitivo, donde se desarrollaron y produjeron en promedio 6 frutos por planta que alcanzaron el grado de madurez fisiológica (Fig. 12). En esta fase se obtuvo una eficiencia del 100%, ya que todas las plantas sobrevivieron al trasplante a campo.



Figura 12. Plantas generadas *in vitro*, transplantadas en campo directo para su multiplicación de semilla botánica. (a) *C. pepo* y (b) *C. moschata*.

3.4.2. Fertilización

Una semana después del trasplante se realizó otro riego y se depositaron 100 g de fertilizante triple 17 para incrementar el vigor de las plantas y minimizar el estrés generado por el cambio de ambiente del laboratorio al invernadero y después al campo definitivo.

3.4.3. Control de malezas

Se realizaron 4 deshierbes manuales para evitar que las plantas crecieran entre la maleza y éstas interfirieran en labores posteriores como la polinización y cosecha.

4. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante el Análisis de varianza y comparación de medias utilizando la prueba de Tukey al 95% de confiabilidad, para las variables estudiadas.

Con excepción del porcentaje de infección a los 15 dds, al análisis de varianza registró diferencias estadísticas entre tratamientos para todas las variables en todas las fechas de registro (Cuadro 10).

4.1. Porcentaje de germinación

Se realizaron tres fechas de evaluación a los 8, 12 y 16 dds. A los 8 dds, el análisis de varianza (Cuadro 10) indicó que existieron diferencias significativas entre tratamientos para esta variable y la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) (Cuadro 11) mostró que en el testigo se obtuvo la media más alta de germinación (74.20%), siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos. Así resultó: para *R. solani* (64.00%); *F. oxysporum* (55.80%); *P. capsici* (52.60%); Mezcla de hongos (33.50%). El tratamiento con menor porcentaje de germinación fue la inoculación con el hongo *P. aphanidermatum* (17.80%), debido principalmente a la muerte preemergente, ya que este hongo causó los mayores daños en las primeras etapas de establecimiento del cultivo,

inmediatamente después de la siembra, situación que no se observó en los demás tratamientos. A los 12 dds hubo diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 10) y la prueba de Tukey (Cuadro 11), indicó que tanto el testigo con 75.60%, *R. solani* (72.80%) y *F. oxysporum* (69.80%) son estadísticamente iguales entre ellos, pero diferentes a *P. capsici* (59.20%) y la Mezcla de hongos (45.63%). El menor porcentaje de germinación fue producido por *P. aphanidermatum* con 27.80% constituyendo un grupo estadístico aparte.

Debido a que la germinación fue lenta en algunos tratamientos, se decidió realizar una tercer medición a los 16 dds (Fig. 12), en la cual el análisis de varianza (Cuadro 10) mostró diferencias significativas. Los hongos que permitieron la mayor germinación según la prueba de Tukey (Cuadro 11) son *P. capsici*, (82%), Testigo (76.40%) y *R. solani* (69.80%), siendo estadísticamente iguales entre ellos pero diferentes a los demás tratamientos. *F. oxysporum* y la Mezcla de hongos (61.40 y 47.75%, respectivamente), constituyen una agrupación estadística aparte. *P. aphanidermatum* (30%), en todas las fechas de evaluación mostró el porcentaje más bajo de germinación, habiendo una diferencia de 52% en la germinación, con respecto a *P. capsici* y de 46.4% respecto al Testigo; esto confirma su fuerte agresividad y gran importancia en los almácigos de cualquier hortaliza. En la inoculación de *P. aphanidermatum* se observó que las semillas eran atacadas inmediatamente, al momento de emitir la radícula, causando pudrición de semillas, impidiendo así la germinación.

Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para cuatro variables en la reacción a inoculación controlada en calabaza (*Cucurbita pepo* L.) con hongos del complejo de damping-off. Chapingo, México. 2001.

FV	GL	GERMINACIÓN (%)			INCIDENCIA (%)				
		8 ¹	12 ¹	16 ¹	15 ¹	21 ¹	28 ¹	35 ¹	41 ¹
TRAT	5	2234.6*	1823.4**	1991**	3088.5*	4391.*	5803.6**	6345**	7056.1**
ERROR	27	761.5	443.0	393.8	845.35	621.4	145.2	76.59	27.22
TOTAL	32	991.6	658.7	643.4	1195.8	1210.	1029.33	1056.03	1125.49
4									
CV (%)	--	57.8	36.73	33.0	85.38	63.43	20.84	12.18	6.44
7									
R ²	--	0.35	0.43	0.48	0.40	0.56	0.88	0.94	0.98

Continuación...

MUERTE POSTEMERGENTE (%)					INFECCIÓN (%)				
15 ¹	21 ¹	28 ¹	35 ¹	41 ¹	15 ¹	21 ¹	28 ¹	35 ¹	41 ¹
1247.36	2491.64	4149.23	4207.63	6032.15	1991.36	3348.46	5050.27	5919.25	6864.11
*	*	**	*	**	ns	*	**	**	**
452.69	661.73	235.80	457.56	291.24	815.38	623.19	151.17	110.52	99.30
576.85	947.65	847.30	1043.50	1188.26	999.13	1049.02	916.65	1018.14	1156.30
108.46	98.42	46.60	55.94	27.20	95.36	74.35	25.21	17.61	13.31
0.34	0.41	0.76	0.63	0.79	0.31	0.50	0.86	0.91	0.93

** Altamente significativo con $\alpha \leq 0.05$ ¹= días después de la siembra (dds).

ns: no significativo.

Cuadro 11. Comparación de medias para cuatro variables de la reacción de calabaza (*C. pepo* L.) a la inoculación controlada de hongos causantes de damping-off. Chapingo, México. 2001.

TRAT.	GERMINACIÓN (%)			INCIDENCIA (%)				
	8 ¹	12 ¹	16 ¹	15 ¹	21 ¹	28 ¹	35 ¹	41 ¹
Testigo	74.20a	75.60a	76.40a	0.00b	0.67b	0.00c	4.66c	3.99c
<i>R. solani</i>	64.00ab	69.80a	69.80a	29.33ab	14.00b	48.66b	65.33b	92.66ab
<i>F. oxysporum</i>	52.80ab	59.20ab	61.40ab	31.33ab	35.33ab	49.33b	87.99a	97.99ab
<i>P. capsici</i>	52.60ab	72.80a	82.00a	50.66ab	76.67a	86.66a	96.66a	98.66a
Mezcla	33.50ab	45.63ab	47.75	61.87a	61.87a	88.12a	95.41a	95.41ab
<i>Pythim</i>	17.80b	27.80b	30.0b	14.43ab	33.73ab	55.98b	67.02b	88.57b
DMS	51.77	39.49	37.23	54.55	46.77	22.60	16.42	9.79

Continuación...

MUERTE POSTEMERGENTE (%)					INFECCIÓN (%)				
15 ¹	21 ¹	28 ¹	35 ¹	41 ¹	15 ¹	21 ¹	28 ¹	35 ¹	41 ¹
0.00a	0.00b	0.00c	0.00b	0.00c	0.00a	0.13c	0.00c	0.93e	0.79c
6.66a	12.66ab	17.33c	16.00b	44.66b	23.60a	13.73bc	34.53b	41.06d	73.99b
16.00a	12.00ab	13.99c	32.66ab	82.00a	24.26a	24.66abc	38.26b	68.66bc	93.73a
27.33a	52.66a	51.99ab	64.66a	84.66a	44.80a	65.46a	74.93a	85.59ab	95.86a
39.21a	46.87ab	68.54a	68.33a	86.67a	51.54a	54.87ab	80.95a	88.75a	93.41a
16.75a	20.19ab	24.53bc	29.73ab	64.08ab	22.51a	29.82abc	44.66b	55.58cd	80.34ab
39.9	48.26	28.81	40.13	32.02	53.33	46.83	23.07	19.72	18.69

Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) ¹ = días después de la siembra (dds).

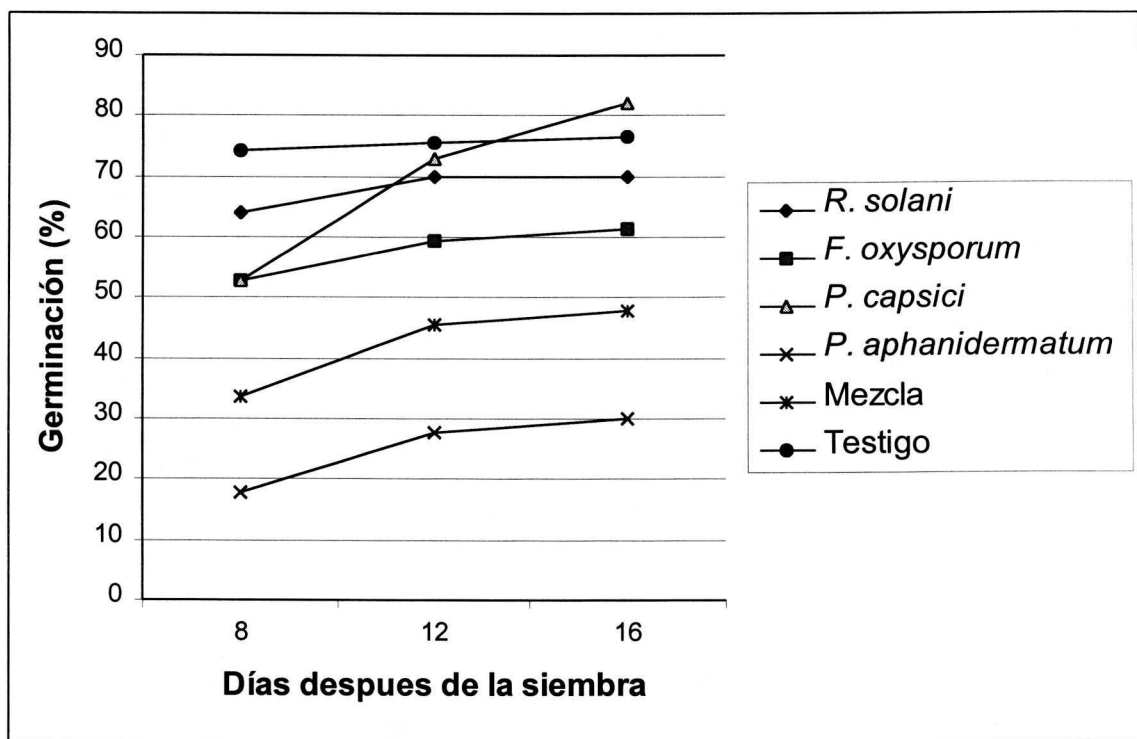


Figura 13. Porcentaje de germinación en calabaza (*C. pepo* L.) permitido por diferentes hongos inoculados para selección por resistencia a damping-off. Chapingo, Mex. 2001.

4.2. Incidencia

De esta variable se realizaron cinco fechas de evaluación: a los 15, 21, 28, 36 y 41 dds (Fig. 14). Pero el análisis estadístico sólo se realizó en tres fechas indicativas de como se distribuyó la enfermedad en el tiempo. Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 10), mostraron diferencias significativas entre los tratamientos para todas las evaluaciones y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Cuadro 11) indicó que la Mezcla de hongos y *Phytophthora capsici* mostraron la mayor incidencia en todas las fechas de evaluación; sin embargo, fue *P. capsici* quien alcanzó en la última evaluación la incidencia más alta (98.66%) lo que lo calificó como uno de los hongos más agresivos. Diferente a *Pythium*

aphanidermatum cuya mayor agresividad la demuestra en la germinación. Inesperadamente, en el testigo se presentaron síntomas, pero al hacer el aislamiento del patógeno, se determinó que una bacteria del género *Pseudomonas* spp fue la responsable de causar dichos síntomas.

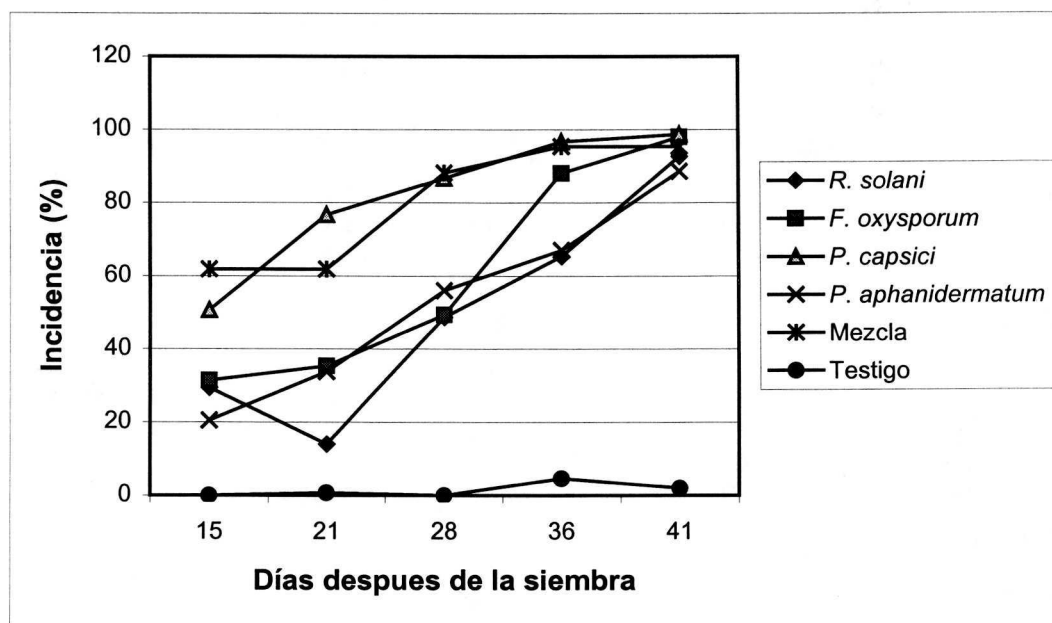


Figura 14. Porcentaje de incidencia de diferentes hongos fitopatógenos causantes de damping-off inoculados en calabaza (*C. pepo* L.), para selección por resistencia. Chapingo, México, 2001.

En la figura 14 se observan dos grupo en las primeras fechas; el primero formado por *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium*, probablemente influenciado por las condiciones de temperatura y la edad de las plantas a la que generalmente causan daños. El segundo grupo formado *Phytophthora* y la Mezcla de hongos, definiéndose como los más agresivos en cuanto al parámetro incidencia.

Al final de las evaluaciones, todos los tratamientos tendieron a comportarse de una forma similar. Es decir, que los hongos a medida que pasa el tiempo, incrementan su patogenicidad; lo cual coincide con lo reportado en la literatura; por ejemplo, *Fusarium* manifiesta su mayor agresividad poco antes de la floración y hasta la etapa de fructificación.

4.3. Severidad como porcentaje de infección

En cinco evaluaciones, los datos obtenidos para la severidad de la enfermedad se convirtieron a porcentaje de infección (Fig. 15), mediante la fórmula de Townsend y Heuberger (1943).

Para fines prácticos, sólo se reportan los análisis estadísticos en tres fechas de evaluación, las cuales muestran claramente el progreso de la enfermedad en el tiempo, aunque la Figura 15 muestra las cinco.

En la primer fecha de evaluación (15 dds), el análisis de varianza indicó que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos (Cuadro 10), mientras que la prueba de comparación de medias por Tukey (Cuadro 11), no muestra diferencias entre ellos. Esto es debido a que si bien ambas pruebas son robustas, son pruebas de diferente naturaleza.

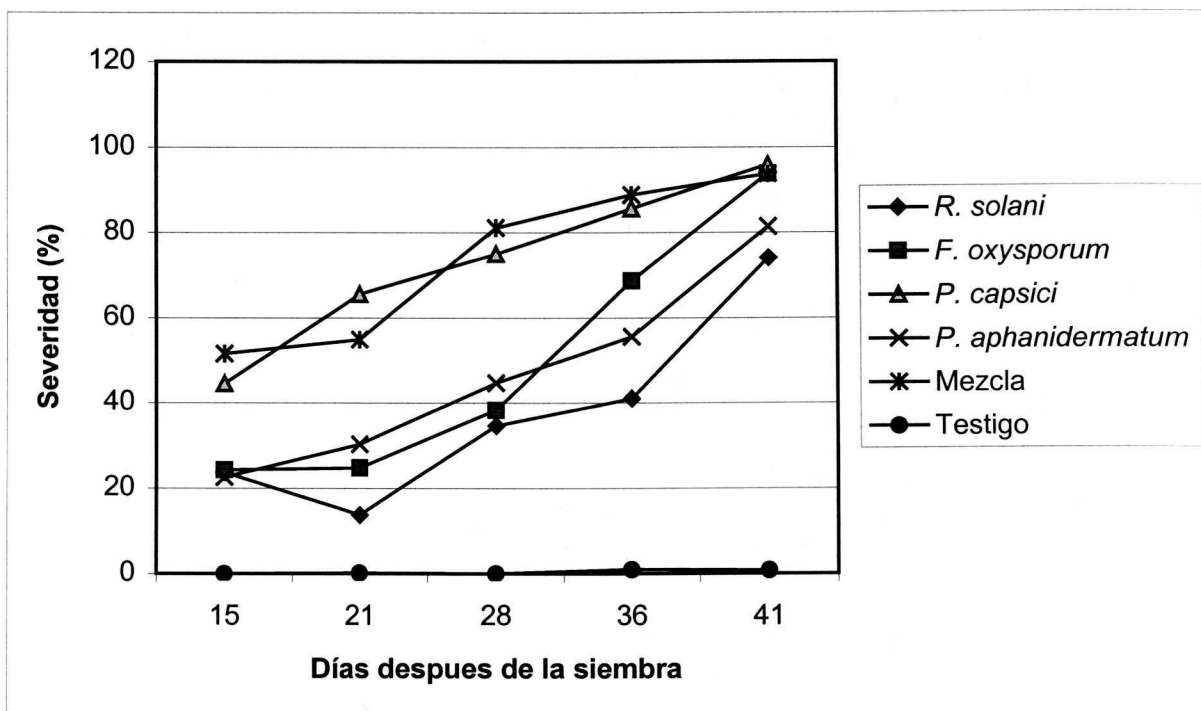


Figura 15. Porcentaje de infección de diferentes hongos fitopatógenos causantes de damping-off inoculados en calabaza (*C. pepo* L.), para selección por resistencia. Chapingo, México, 2001.

A los 28 dds, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 10); y la prueba de Tukey (Cuadro 11) mostró a la Mezcla de hongos (80.95%) y *P. capsici* (74.93%) como los tratamientos con mayor grado de enfermedad, lo cual indica que estos patógenos van desarrollando su agresividad a través del tiempo y no al inicio como *P. aphanidermatum*.

A los 41 dds, el análisis de varianza indicó que hay diferencias significativas (Cuadro 10) y la prueba de comparación de medias de Tukey (Cuadro 11) mostró a *P. capsici* (95.86%), *F. oxysporum* (93.73%) y a la Mezcla de hongos

(93.41%) como los tratamientos con mayor porcentaje de infección. Correspondiendo a lo observado en campo, ya que los mayores problemas los presenta cuando la planta está cercana a la etapa de floración y / o fructificación. Probablemente el tratamiento con *R. solani* (73.99%), no se mostró tan agresivo debido a que las temperaturas del invernadero superaban los 35° C en promedio, y este hongo requiere de temperaturas más frescas para desarrollar su infección.

4.4. Muerte postemergente

Al igual que para las variables anteriores, se realizaron cinco fechas de evaluación. Sólo se discutirán los análisis estadísticos en tres de ellas, en la fase inicial (15 dds), intermedia (28 dds) y final (41 dds) de desarrollo de la enfermedad.

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos a los 15 dds (Cuadro 10) pero la prueba de Tukey (Cuadro 11) indica que todos los tratamientos son estadísticamente iguales; mientras que en la tercer evaluación (28 dds), la prueba de Tukey (Cuadro 11) indicó que la Mezcla de hongos (68.54%) es la que presentó mayor cantidad de plantas muertas, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos. El tratamiento que más se le acercó en valor fue *P. capsici* con 51.99 % de plantas muertas en esta fecha. Como era de esperarse, en el testigo no se tuvieron plantas muertas (Fig. 16).

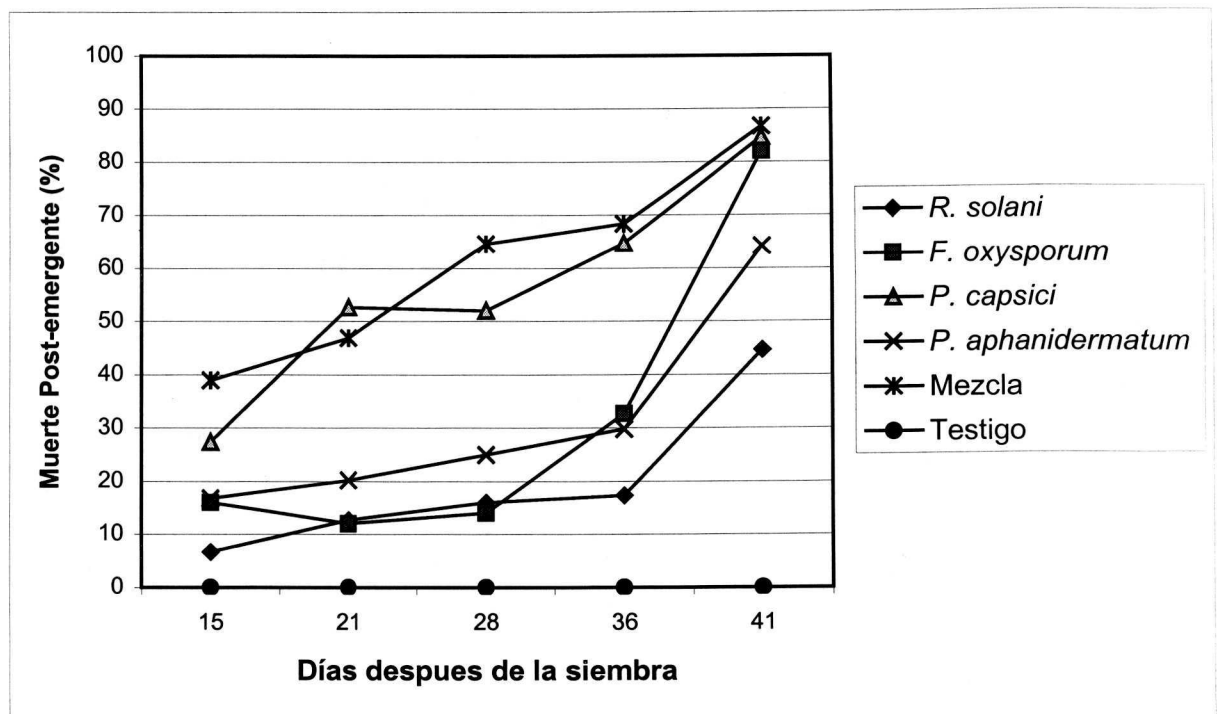


Figura 16. Porcentaje de muerte post-emergente por diferentes hongos fitopatógenos causantes de Damping-off inoculados en calabaza (*C. pepo* L.), para selección por resistencia. Chapingo, México, 2001.

Finalmente, a los 41 dds el análisis de varianza registró diferencias significativas (Cuadro 10) y la prueba de Tukey (Cuadro 11) indicó que los tratamientos con mayor porcentaje de plantas muertas fueron: la Mezcla de hongos, *P. capsici* y *F. oxysporum* con 86.67, 84.66 y 82.00%, respectivamente; siendo estadísticamente diferentes a los demás tratamientos. En la figura 16 se observa un efecto similar al de las figuras 14 y 15; destacando dos grupos similares en cuanto a comportamiento, sólo que en la última evaluación no tienden a conjuntarse debido a que *R. solani* muestra la media más baja de muerte postemergente (44.66%), mientras que la Mezcla lo supera por casi el doble del valor. Probablemente, en evaluaciones posteriores a los 41 dds, el

comportamiento de esta variable, hubiera mostrado una tendencia a la unión, si la tendencia se mantiene similar.

4.5. Porcentaje de plantas resistentes

Cuadro 12. Porcentaje de plantas resistentes de calabaza (*C. pepo* L.) a diferentes hongos causantes de damping – off en condiciones de invernadero. Chapingo, Méx. 2001.

Tratamiento	Semillas inoculadas	Semillas germinadas	Plantas resistentes	(%) de plantas resistentes
<i>R. solani</i>	500	349	5	1.43
<i>F. oxysporum</i>	500	307	1	0.32
<i>P. capsici</i>	500	410	1	0.24
<i>P. aphanidermatum</i>	500	150	10	6.66
Mezcla	800	382	9	2.35
Testigo	500	382	----	----

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran diferencias en cuanto a proporción de plantas resistentes obtenidas por Sánchez y Velásquez en 1999, pero existe similitud en cuanto a la frecuencia de plantas resistentes de *C. pepo* L para cada patógeno, así como para la mezcla.

4.6. Multiplicación *in vitro* de plantas resistentes

Utilizando el medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962) (Cuadro 9) más 3% de sacarosa, además de 1 mL de benciladenina por litro de medio de cultivo. Las condiciones en las cuales se mantuvieron las plántulas, 16 horas luz y 8 de oscuridad, así como una temperatura promedio de 26° C, influyeron en la obtención de plántulas vigorosas provenientes de las plantas resistentes.

Por cada explante (punta de guía) sembrado se obtuvieron en promedio 8 brotes diferenciados, que posteriormente dieron lugar a plantas enteras. El tiempo transcurrido entre la siembra del explante y el primer subcultivo corresponde a un mes, tiempo en el cual pueden observarse plántulas diferenciadas y en proceso de diferenciación. En esta fase, la eficiencia fue de un 98% ya que los problemas de contaminación fueron casi nulos. En un periodo no mayor a tres meses se lograron obtener más de 1 500 plantas resistentes a los diferentes hongos probados, así como al complejo.

Para el proceso de elongación sólo debe utilizarse el medio de cultivo MS, con todo sus componentes, excepto BA. El periodo entre subcultivos corresponde a 3 semanas en promedio. Pueden realizarse el número de subcultivos en función de la cantidad de plantas requeridas, pero después de 16 meses de manipulación continua, sin pasar nuevamente por medio de cultivo con hormonas (BA), se observa un ligero decremento en la calidad de las plantas producidas, por lo que se recomienda volver a establecer en medio de cultivo MS adicionado con BA, para inducir una nueva multiplicación de brotes.

Una diferencia muy importante y que es interesante comentar con respecto a las investigaciones reportadas en donde se hace uso de la técnica de cultivo de tejidos en calabazas, es que aquí se utilizaron explantes cosechados de plantas establecidas en invernadero rustico de plástico, las cuales estaban expuestas a condiciones ambientales diversas, como la presencia de plagas y enfermedades. Comparadas con la literatura en donde se germinan *in vitro* las semillas desinfectadas y bajo condiciones de laboratorio, donde se hacen crecer las plántulas libres de patógenos y los explantes son segmentos del hipocótilo a la semana de haber germinado la plántula. En contraste con lo realizado en esta investigación en donde los explantes se cosecharon de plantas de 50 días de edad.

4.7. Adaptación de plántulas reproducidas *in vitro*

Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar Peat- Moss[®] esterilizado como sustrato, sin ninguna mezcla, el porcentaje de plantas adaptadas fue superior al 70% en invernadero y 100% en campo directo. El tiempo total que tardó todo este proceso fue de 21 días, distribuidos de la siguiente manera: los primeros 5 días en microinvernadero completamente cerrado, a los 10 días se hicieron dos orificios en la cubierta del microinvernadero, a los 15 días se hicieron cuatro orificios, a los 19 días se destaparon completamente y a los 21 días se llevaron al campo para su transplante.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, fue posible seleccionar plantas de calabaza (*C. pepo* L.) resistentes a las especies de hongos, así se obtuvieron para *R. solani* (1.43%), *F. oxysporum* (0.32), *P. capsici* (0.24%), *P. aphanidermatum* (6.66%) Mezcla (2.35%) de plantas resistentes que se llevaron a producción de frutos en invernadero en el 2001. Estos resultados refuerzan las hipótesis planteadas al inicio de esta investigación, en cuanto a que era posible llegar a obtener plantas resistentes o con tolerancia a este grupo de patógenos del suelo.

La metodología utilizada en la micropropagación fue la adecuada para obtener más de 1 500 plántulas en total, de las cuales 300 pertenecieron a *R. solani*, *F. oxysporum* (150), *P. capsici* (200), *P. aphanidermatum* (450) y Mezcla (400) , aproximadamente. Provenientes 5, 1, 1, 10, 9 plantas resistentes a los hongos inoculados, respectivamente. Es importante mencionar que los explantes se cosecharon de plantas que se encontraban en invernadero, expuestas tanto factores abióticos como bióticos, comparado con las investigaciones reportadas en la literatura en donde se ponen a germinar semillas previamente tratadas con desinfectantes y mantenidas en condiciones de alta asepsia para así obtener los explantes.

La metodología empleada en la aclimatación de plántulas provenientes de cultivo de tejidos, permitió obtener porcentajes superiores al 70% de sobrevivencia en condiciones de invernadero. El período de aclimatación en invernadero duró tres semanas en promedio. De las plantas aclimatadas, que posteriormente se transplantaron a condiciones de campo para su reproducción, el 100% lograron establecerse y el 95% llegó a la etapa reproductiva, el resto sufrió una infección viral, lo que limitó las posibilidades de reproducción.

Como prueba adicional, todas las plantas reproducidas *in vitro* y que fueron aclimatadas para su transplante, se establecieron en una parcela donde se sabe está presente la enfermedad ya que se han tenido pérdidas de plantas en ese lugar debido a enfermedades de la raíz. Ninguna planta mostró síntomas a los causados por estos patógenos, lo cual indica que los materiales propagados tienen altos niveles de resistencia a estos patógenos.

6.- LITERATURA CITADA

1. **Agrios, G. N.** 1996. Fitopatología. 2da. Edición. Ed. Limusa. México, D.F. 838 p.
2. **Ainsworth, G. C and Sussman, A. S.** 1965. The Fungi: an Advanced Treatise. Vol. 1: The Fungal cell. Academic- Press Inc. New York, USA. 748 p.
3. **Ammirato, P. V., Evans, D. R., Sharp, W. R., and Bajaj, Y. P. S.** 1990. Handbook of plant cell culture, vol. 5: ornamental species. McGraw-Hill. New York, USA. 833 p.
4. **Andrade, R. M.** 1998. Cultivo *in vitro* de tomate de cáscara. Tesis de Maestría en Ciencias en Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 163 p.

5. **Ayala, E. J. A.** 2002. Cambios ocasionados en los parámetros genéticos por la selección participativa en una variedad local de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) tipo 'round zucchini'. Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura. Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México. 156 p.
6. **Benson, D. M.** And Baker, R. 1974. Epidemiology of *Rhizoctonia solani* preemergence damping-off of radish: Inoculum potential and disease potential interaction. *Phytopathology* 64: 957-962.
7. **Biles, C. L.,** and Martyn, R. D. 1989. Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 79:856-860.
8. **Blancard, D.;** H. Q. Lecoq y M. Pitrat. 1991. Enfermedades de las Cucurbitáceas. Mundi Prensa. Madrid, España. 301 p.
9. **Caperton, C. M.,** Martyn, R. D., and Starr, J. L. 1986. Effects of *Fusarium* inoculum density and root-knot nematodes on wilt resistance in summer squash. *Plant Disease*, 70:207-209.
10. **Chatterjee, M.** and T. A. More. 1991. Interspecific hybridization in *Cucumis* spp. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 14: 69-70.

11. **Cohen, Y.** and Eyal, H. 1987. Downy mildew, powdery mildew and fusarium wilt resistant muskmelon breeding line PI-124111F. *Phytoparasitica* 15 (3): 187-195.
12. **Cruz, O. J.;** E. R. García y F. A. Carrillo. 1998. Enfermedades de las Hortalizas. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa. México. 255 p.
13. **De Cal, A.,** Garcia-Lepe, R., and Melgarejo, P. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology* 90:260-268.
14. **Duijff, B. J.,** Recorbet, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J. E., and Lemanceau, P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* 89:1073-1079.
15. **El Ghaouth, A.,** Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A., and Bélanger, R. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology* 84: 313-320.

16. **Erwin**, C. D. And **Ribeiro**, K. O. 1996. *Phytophthora*: Diseases worldwide. American Phytopathological Society. APS- PRESS. St. Paul, Minesota. United States of America. 562 p.
17. **Esquinas- Alcázar**, J. T. 1983. Genetic resources of Cucurbitaceae a global report. International Board for plant genetic resource. Rome, Italy. 101 p.
18. **Fanh**, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic- Press Inc. New York, United States of America. 302 p.
19. **Freeman**, S., and **Rodríguez**, R. J. 1993. A rapid inoculation technique for assessing pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f sp. *niveum* and *F.o melonis* on cucurbits. Plant Dis. 77: 1198-1201.
20. **García**, M. E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 219 p.
21. **García**, V. A. 1988. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 196 p.

22. **Guenkov**, Guenko. 1974. Fundamentos de horticultura cubana. Instituto Cubano del Libro. La Habana, Cuba.
23. **Hall**, J. L., Flowers, T. J. And Roberts, R. M. 1976. Plant Cell Structure and Metabolism. 2nd. Edition. Logman. New York, United States. 543 p.
24. **Henz**, G. P. and Lima, M. F. 1994. Evaluation of factors affecting the reaction of *Cucurbita* spp to *Phytophthora capsici*. Fitopatología Brasileira, 19: (4), 560-565.
25. **Hoe Tae**, Kim. 1997. Characteristics of *Cucurbita* spp for use as cucumber rootstock. Journal of Horticulture Science. 39: 2, 8-14 p.
26. **Hopkins**, D. L., Lobinske, R. J., and Larkin, R. P. 1992. Selection for *Fusarium oxysporum* f sp. *niveum* race 2 in monocultures of watermelon cultivars resistant to Fusarium wilt. Phytopathology 82:290-293.
27. **Ichielevich-Auster**, M., Sneh, B., Koltin, Y., and Barash, I. 1985. Pathogenicity, host specifity and anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. Isolated from soils in Isreal. Phytoparasitica 13(2): 103-112.
28. **Jelaska**, S. 1972. Embryoid formation by fragments of cotyledons and hypocotyls in *Cucurbita pepo*. Planta (Berl.), 103: 278- 280.

29. _____, 1974. Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiol. Plant.*, 31: 257-261.
30. _____, Magnus, V., Seretin, M and Lacan, G. 1985. Introduction of embryogenic callus in *Cucurbita pepo* hypocotyl explants by indole- 3-ethanol and its sugar conjugates. *Physiol. Plant.*, 64: 237-242.
31. **Jones**, D. G. 1987. Plant pathology. Principles and practice. Prentice – Hall. USA. 191 p.
32. **Kistler**, H.C., Alabouvette, C., Baayen, R. P., Bentley, S., Brayford, A., Coddington, A., Correl, J., Daboussi, M.J., Elias, K., Fernandez, D., Gordon, T.R., Katan, T., Kim, H.G., Leslie, J.F., Martyn, R.D., Migheli, Q., Moore, N.Y., O'Donnell, K., Ploetz, R.C., Rutherford, M.A., Summerell, B., Waalwijk, C., and Woo, S. 1998. Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. The American Phytopathological Society. Vol. 88, (1): 30-32.
33. **Lamour**, K. H., and Hausbeck, M. K. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90:396-400.
34. **Larkin**, R. P., Hopkins, D. L., and Martin, F. N. 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and

- other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathology* 86: 812-819.
35. **Leach, J. G** and Currence, T. M. 1938. *Fusarium* wilt of muskmelons in Minesota. University of Minesota. United States of America. 32 p.
36. **Lee, C. W.** and Thomas, J. C. 1985. Tissue culture propagation of buffalo gourd. *HortScience*, 20: 218-219.
37. **Lira, S. R.** 1995. Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica. Instituto de Biología, UNAM. México. 281 p.
38. **Manners, J. G.** 1993. Principles of plant pathology. Cambridge University. Press. Great Britain. 343 p.
39. **Margara, J.** 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*; los meristemas y la organogénesis. Ed. Mundi- Prensa. Madrid, España. 232 p.
40. **Martín, F.** and Hancock, J. 1987. The use of *Pythium oligandrum* for biological control of preemergence damping-off caused by *P. ultimum*. *Phytopathology* 77(7):1013-1020.

41. **Martyn**, R. D., Biles, C. L., and Dillard, E. A. 1991. Induced resistance to *Fusarium* wilt of watermelon under simulated field conditions. *Plant Dis.* 75: 874-877.
42. **Mendoza**, Z. C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 85 p.
43. **Migheli**, Q., Steinberg, C., Daviere, J. M., Olivian, C., Gerlinger, C., Gautheron, N., Alabouvette, C., and Daboussi, M. J. 2000. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *Impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*, 90: 1279-1284.
44. **Miller**, S. A., Bhat, R. G., and Schmitthenner, A. F. 1994. Detection of *Phytophthora capsici* in pepper and cucurbit crops in Ohio with two commercial immunoassay kits. *Plant Dis.* 78:1042-1046.
45. **Montoya**, H. L. M. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 77 p.
46. **Moreno**, A., and Alférez, A. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* on cucumber in Spain. *Plant Dis.* 85:1206.
47. **Murashige**, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

48. _____. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
49. **Murillo**, R. E y Gil, V. I. 2002. Manual de prácticas de la materia Introducción a la Biotecnología Vegetal. Depto. de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 17 p.
50. **Ortiz**, A. S. E. 1986. Caracterización agromorfológica y bromatológica de 26 cultivares de Chilacayote (*C. ficifolia*) nativos en el valle de la Ermita, Guatemala. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos, Guatemala.
51. **Pan**, R. S. and T.A. More. 1996. Screening of melon (*Cucumis melo* L.) germoplasm for multiple disease resistance. Euphytica 88: 125-128.
52. **Pérez**, G. M; Márquez, S. F y Peña, L. A. 1997. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. México. 380 p.
53. **Pierik** R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
54. **Pink**, D. A. C and Walkey, D. G. A. 1984. Rapid propagation of *Cucurbita pepo* L. By culture of meristem tips. Sci. Hortic. (Amst.), 24: 107-114.

55. **Plader**, W., Malepszy, S., Burza, W and Rusinowski, Z. 1998. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 103: 9-15.
56. **Postma**, J., Willemsen-de Klein, M. J. E. I. M., and van Elsas, J. D. 2000. Effect of the indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. *Phytopathology* 90: 125-133.
57. **Quintana**, T. J. M. 1988. La aplicación potencial del cultivo de tejidos vegetales en algunos cultivos del Estado de Puebla. Tesis Profesional. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. México. 66 p.
58. **Ristaino**, J. B., Hord, M. J., and Gumpertz, M. L. 1992. Population densities of *Phytophthora capsici* in field soils in relation to drip irrigation, rainfall, and disease incidence. *Plant Dis.* 76: 1017-1024.
59. **Robinson**, R. A. 1996. Retorno a la resistencia: fitomejoramiento para depender menos de los plaguicidas. (Traducción por Romero, R. F. 2000). IFIT. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 292 p.
60. **Robles**, G. M. M. 1993. Propagación de banano por cultivo de tejidos. CIPAC- INIFAP- SARH. México.

61. **Rodríguez, R. G.** 1998. Fertilización nitrogenada para reducir daños por enfermedades radicales en el cultivo de calabacita (*Cucurbita pepo*) variedad 'Zucchini Gray'. Tesis Profesional. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 108 p.
62. **Romero, C. S.** 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347 p.
63. **Sanders, P. L., Coffey, M. D., Greer, G. D., and Soika, M. D.** 1990. Laboratory-induced resistance to fosetyl-Al in a metalaxil-resistant field isolate of *Pythium aphanidermatum*. Plant Dis. 74: 690-692.
64. **Sánchez, H. E. y Velásquez, E. M. C.** 1999. Selección de Germoplasma de Calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y Chilacayote (*C. ficifolia* Bouché) para resistencia al Damping-Off. Tesis Profesional. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 71 p.
65. **Schroeder, C. A.** 1968. Adventive embryogenesis in fruit pericarp tissue in vitro. Bot. Gaz. 129: 374-376.
66. **Segura, M. A.** 1989. La Biotecnología aplicada a vegetales en Japón. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 18 p.

67. **Shankar**, G and Nariani, T. K. 1973. Cultivation of pumpkin mosaic virus (PMV) in tissue culture. Indian Phytopathol., 26: 756-757.
68. **SIAP**, 2002. Avances de Siembras y Cosechas. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México.
69. **Sujkowski**, L. S., Parra, G. R., Gumpertz, M. L., and Ristaino, J. B. 2000. Temporal dynamics of *Phytophthora* blight on bell pepper in relation to the mechanisms of dispersal of primary inoculum of *Phytophthora capsici* in soil. Phytopathology 90:148-156.
70. **Taubenhaus**, J. J. 1920. Wilts of the watermelon and related crops: *Fusarium* wilts of Cucurbits. Bulletin No. 260. College Station, Brazos County, Texas. USA. 50 p.
71. **Uchneat**, M. S. 1997. Correlation of damping – off with belly rot resistance in cucumber. Report Cucurbit Genetics Cooperative. 20: 16-17.
72. **Vakalounakis**, D. J., and Fragkiadakis, G. A. 1998. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. Phytopathology 89:161-168.

73. **Vanderplank**, J. E. 1963. Plant Diseases; Epidemics and Control. Academic Press. New York, USA. 349 p.
74. **Vasil**, I. K., and Thorpe, T. A. 1994. Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 593 p.
75. **Villatoro**, L. J. C. 1996. Cultivo *in vitro* de yemas axilares para la micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) var. Rendidora. Tesis Profesional. Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México. 72 p.
76. **Walker**, M. N. 1941. *Fusarium* wilts of watermelons. University of Florida. Gainesville, Florida. USA. 29 p.
77. **Wall**, J. R. 1954. Interspecific hybrids of *Cucurbita* obtained by embryo culture. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 63: 427- 430.
78. **Wehner**, T. C. and Locy, R. D. 1981. In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. HortScience 16: 759-760.
79. **Zhang**, W., W. A. Dick., and H. A. Hortink. 1996. Compost induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. Phytopathology, 86: (10), 1066-1070.

80. **Zhou, T.**, and Paulitz, T. C. 1993. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria-treated cucumber roots. *Phytopathology* 83: 872-876.
81. **Zink, F. W.**, and Gubler, W. D. 1986. Inheritance of resistance to races 0 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in a gynoeocious muskmelon. *Plant Disease* 70: 676-678.
82. _____. 1991. Origin of *Fusarium* wilt resistance in Texas AES muskmelon cultivars. *Plant Dis.* 75: 24-26.
83. _____. 1992. Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0 and 2 in muskmelon cultivars Honey Dew, Iroquois, and Delicious 51. *Plant Dis.* 76: 162-166.

