



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**RESISTENCIA DE HÍBRIDOS Y PROGENITORES DE CHILE
MANZANO A ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS Y
HONGOS**

TESIS DE GRADO

Como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



REGISTRACIÓN ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Presenta:

EFRÉN CÍNTORA PORTUGUEZ

Chapingo, Estado de México, Mayo de 2016.

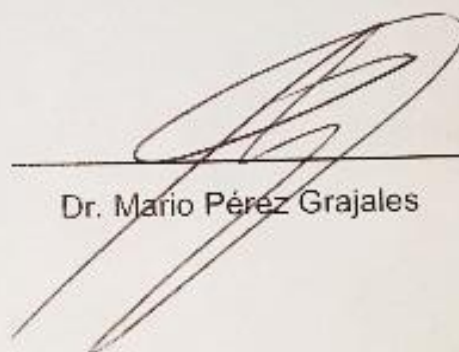


La presente investigación fue realizada por el Ing. Efrén Cíntora Portuguez, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

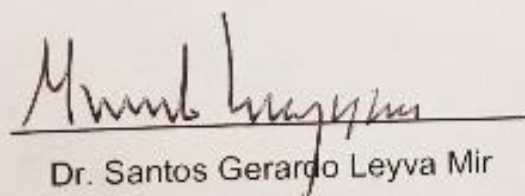
COMITÉ ASESOR

DIRECTOR



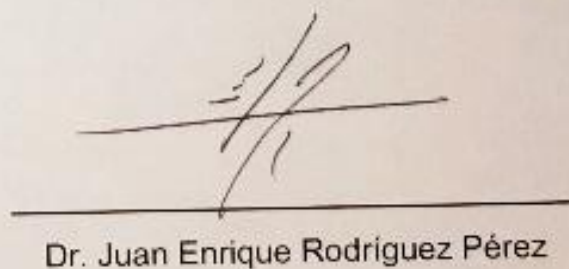
Dr. Mario Pérez Grajales

ASESOR



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR



Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres Rafael y Lidia, quienes con su apoyo, cariño y consejos, no me hubiese sido posible llegar a este punto.

A mis hermanos, por tantos momentos de felicidad y complicidad compartidos.

A Isabel por su amor, apoyo, paciencia y consejos durante todas las etapas de esta investigación

A todos aquellos familiares y amigos, que siempre me apoyaron y confiaron en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

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

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

A todos los profesores que conocí en el posgrado, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencias y consejos.

A Marianita, Juanito, María Elisa y Ricardo, por su amistad y ayuda en las fases de laboratorio de esta investigación.

A mis amigos Yola y Cristhyan, por estar incondicionalmente conmigo y ofrecerme su apoyo. A Aldo, Cristian, Micah, Laura y Caro, gracias por hacer más ameno este camino

DATOS BIOGRÁFICOS

Efrén Cíntora Portuguese nació el 18 de mayo de 1990 en Texcoco, Estado de México, lugar donde realizó estudios de primaria y secundaria. En 2005 ingresó a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En 2008 comenzó sus estudios profesionales en la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola de la UACH y consiguió dicho título en la misma universidad, presentando en el 2013 la tesis “SISTEMA COMPUTACIONAL PARA CALCULAR Y COMPARAR TABLAS DE VIDA” y aprobando por unanimidad. En 2014 inició sus estudios de posgrado en la Maestría en Ciencias en Horticultura del Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

RESISTENCIA DE HÍBRIDOS Y PROGENITORES DE CHILE MANZANO A ENFERMEDADES OCASIONADAS POR HONGOS Y VIRUS

RESISTENCE OF HYBRIDS AND PARENTAL LINES OF MANZANO PEPPER TO DISEASES CAUSED BY FUNGI AND VIRUS

Efrén Cíntora Portuguese¹ y Mario Pérez Grajales²

En México se cultivan 1500 ha de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.), su producción es afectada por distintas enfermedades durante todo su ciclo, las cuales causan pérdidas del 60 hasta del 100 %. Una de las mejores estrategias para el manejo de enfermedades es el uso de variedades resistentes. Por ello el objetivo fue evaluar la resistencia de híbridos y progenitores de chile Manzano a enfermedades causadas por hongos y virus, mediante pruebas de patogenicidad y detección de genes de resistencia, como estrategia en el manejo de enfermedades. Se evaluó la incidencia, severidad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de cinco híbridos de chile Manzano y sus líneas progenitoras, a enfermedades causadas por virus (*Cucumber mosaic virus*, *Tomato Spotted wilt virus*, *Potato virus Y*, *Tobacco etch virus*, *Pepper mild mottle virus*, *Tomato Mosaic* y *Tobacco mosaic virus*) y hongos (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*). También se realizó una detección de genes resistencia a enfermedades, mediante marcadores moleculares. Se realizó comparación de medias de rangos Kruskal-Wallis, (KW, $P \leq 0.05$) en enfermedades víricas y comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) para enfermedades fúngicas. Las enfermedades que obtuvieron ABCPE más altas fueron las causadas por *P. capsici* y PMMoV; mientras que las provocadas por *R. solani*, TEV y TSWV tuvieron las APCPE más bajas. El híbrido "MARUCA" obtuvo la mayor cantidad de ABCPE bajas, seguido por "DALI" y "YOLI". Todos los híbridos presentaron bandas correspondientes al gen de resistencia para TSWV, PVY y *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, incidencia, severidad, Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad, genes de resistencia.

In Mexico 1500 ha are cultivated with Manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.). Over the years, production has been affected by different diseases throughout its growth cycle, which causes losses between 60 and 100 %. One of the best strategies to manage diseases is the use of resistant varieties. Therefore, the objective of the study was to evaluate the resistance of hybrids and parental lines of Manzano pepper to diseases caused by fungi and viruses, using pathogenicity tests and detection of resistance genes as part of disease management. The incidence, severity and Area Under the Curve Disease Progress (AUCDP) of five Manzano pepper hybrids and their parental lines in relation to diseases caused by viruses (*Cucumber mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus*, *Potato virus Y*, *Tobacco etch virus*, *Pepper mild mottle virus*, *Tomato Mosaic* and *Tobacco mosaic virus*) and fungi (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*) were evaluated. Detection of disease resistance genes using molecular markers was also performed. A mean ranks comparison was made using the Kruskal-Wallis test (KW, $P \leq 0.05$) for viral diseases and means comparison (Tukey, $P \leq 0.05$) for fungal diseases. Diseases that obtained higher AUCDP were caused by *P. capsici* and PMMoV, whereas those caused by *R. solani*, TEV and TSWV had the lowest AUCDP. The "MARUCA" hybrid had the highest number of the lowest registered AUCDP, followed by "DALI" and "YOLI". All hybrids showed bands corresponding to the resistance gene for TSWV, PVY and *Fusarium oxysporum*.

Keywords: *Capsicum pubescens*, incidence, severity, Area Under the Curve Disease Progress, resistance genes.

1 Tesista

2 Director

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. RESISTENCIA DE HÍBRIDOS Y PROGENITORES DE CHILE MANZANO A ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS.....	4
2.1. RESUMEN	4
2.2. INTRODUCCIÓN	5
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
2.5. CONCLUSIONES	26
2.6. LITERATURA CITADA.....	27
3. RESISTENCIA DE HÍBRIDOS Y PROGENITORES DE CHILE MANZANO A ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS DE RAÍZ.....	29
3.1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. RESUMEN	30
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
1.4. CONCLUSIONES	46
1.5. LITERATURA CITADA.....	47
2. DISCUSIÓN GENERAL	49
3. CONCLUSIONES GENERALES.....	53
4. LITERARURA CITADA GENERAL	54
5. ANEXO 1	58
6. ANEXO 2	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Escala de severidad de la enfermedad Horsfall y Barrat, 1945.	9
Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la detección de genes.....	13
Cuadro 3. Análisis de rangos de la severidad, ABCPE, incidencia y peso seco, de los genotipos de chile inoculados con virus.....	14
Cuadro 4. Comparación de medias de rangos de la incidencia y severidad de las enfermedades causadas por virus en los genotipos de chile inoculados.....	16
Cuadro 5. Comparación de rangos para las variables de incidencia y severidad en híbridos y progenitores de chile Manzano y chile Criollo Morelos.	18
Cuadro 6. Comparación de medias de rangos de la severidad y ABCPE de genotipos de chile inoculados con virus.....	20
Cuadro 7. Escala decimal para evaluar la severidad de alguna enfermedad.....	33
Cuadro 8. Análisis de varianza de la severidad e incidencia de los Hongos inoculados sobre los Genotipos de chile.....	39
Cuadro 9. Comparación de medias de la severidad e incidencia de las enfermedades causadas por los hongos inoculados.	41
Cuadro 10. Comparación de medias de la severidad de los genotipos inoculados con hongos.	41
Cuadro 11. Comparación de medias de la severidad de los hongos inoculados sobre los diferentes genotipos de chile.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los distintos hongos inoculados a los genotipos de chile Manzano.....	38
Figura 2. Escala visual de síntomas causados por PVY en chile Manzano.....	58
Figura 3. Escala visual de síntomas causadospor CMV en chile Manzano.....	59
Figura 4. Escala visual de síntomas causadospor TMV en chile Manzano.	60
Figura 5. Escala visual de síntomas causadospor PMMoV en chile Manzano.....	61
Figura 6. Escala visual de síntomas causadospor TEV en chile Manzano.....	62
Figura 7. Escala visual de daño mostrando porcentaje de síntomas causados por TSWV en chile Manzano.	63
Figura 8. Escala visual de síntomas causados por <i>Phytophthora capsici</i> en chile Manzano representado por una marchitez	64
Figura9. Escala visual de síntomas causados por <i>Rhizoctonia solani</i> en chile Manzano representado por una marchitez.	64
Figura 10. Escala visual de síntomas causados por <i>Fusarium oxysporum</i> en chile Manzano representado por una marchitez.....	65
Figura 11. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador CSO.	66
Figura 12. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPAC10.....	67
Figura 13. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPAH13.....	68
Figura 14. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPAF16.	69
Figura 15. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPB01..	70
Figura 16. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador SCAC.	71
Figura 17. Electroforesis de gel de agarosa para los iniciadores SNF 20 y TMV- 2262.....	71
Figura 18. Electroforesis de gel de agarosa para los iniciadores TM2 ² -SNP 2494.....	72
Figura 19. Electroforesis de gel de agarosa para los iniciadores TM2-748.	72
Figura 20. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador PMMoV-J..	73
Figura 21.Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OpD04.717.....	73
Figura 22.Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador At2.....	74

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es originario de las partes altas de Perú, Bolivia y Ecuador. En la actualidad se puede encontrar desde Argentina hasta el centro de México, la mayor diversidad genética se localiza en Sudamérica, sin embargo, en México se puede encontrar alta variabilidad en cuanto a tipo de crecimiento de la planta, color y forma de fruto, etc.; estas características son la base para los trabajos de mejoramiento genético (Pérez y Castro, 2012).

El chile Manzano fue introducido a México en el siglo XX y es el único de su especie que se encuentra en altitudes de 1700 a 2500 msnm. Se encuentra distribuido en los estados de Puebla, Michoacán, Veracruz, Estado de México y Chiapas (Pérez y Castro, 2012). Aun cuando el chile es la hortaliza más cultivada en México, con aproximadamente 150,000 ha sembradas, sólo 1,500 ha corresponden a chile Manzano (Pérez y Castro, 2012).

La producción de chiles se afectada por patógenos en todas sus etapas fenológicas, las cuales ocasionan pérdidas del 60 al 100% (Santos, 2004), ya que ocasionan mala presentación en el mercado y disminuyen las posibilidades de un precio favorable (Espinosa *et al.*, 2010). Entre las enfermedades más comunes y problemáticas en chile se encuentran: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Potato Virus Y* (PVY), *Tomato Spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, entre otras de menor importancia. Estas enfermedades son de fácil diseminación y afectan a los frutos, algunas de ellas provocan la muerte de

las plantas ya que las posibilidades de combatirlas con éxito son bajas. No obstante, una de la mejores estrategias es el uso de variedades resistentes (Agrios, 2004).

En particular para Chile Manzano, en 1994 se creó el Programa de Producción y Mejoramiento Genético de Chile Manzano, en la Universidad Autónoma Chapingo en donde el primer paso fue realizar una colecta amplia de material genético existente en México y en Sudamérica (Pérez y Castro, 2012). Las colectas de plantas con caracteres contrastantes fueron seleccionadas en dos ciclos de cultivo, y a través del diseño dialélico de Griffing, método II, se hicieron las cruza interpoblacionales entre seis colectas. Como resultado, en 2002, se obtuvieron 15 híbridos, de los cuales destacó la cruza Zongolica X Puebla. Esta cruza se registró ante el SNICS en 2012, con el nombre de “Grajales St.” No obstante, desde 2002 fueron derivadas del híbrido intervarietal Zongolica X Puebla ocho líneas con características sobresalientes de calidad y rendimiento de fruto. Estas fueron autofecundadas en cinco ciclos de cultivo (1.5 años por ciclo) para homogeneizar el material genético. En 2012 las ocho líneas fueron cruzadas a través del diseño dialélico de Griffing, método II, y se obtuvieron 28 híbridos de cruza simple. De ellos, cinco sobresalieron en características de planta y sobre todo en las de rendimiento y calidad de fruto. Para su registro ante el SNICS fue necesario realizar la caracterización morfológica de cada uno de ellos y también, conocer su resistencia a las principales enfermedades causadas por virus y hongos.

Por ello, en la presente investigación se planteó como objetivo: evaluar la resistencia de cinco híbridos de Chile Manzano (“MARUCA”, “DALI”, “JHOS”, “CLARIS” y “YOLI”) y sus líneas progenitoras (L1, L2, L3, L4, L7 y L8), a seis enfermedades causadas por virus (CMV, TEV, PVY, TSWV, TMV, PMMoV) y a tres provocadas por hongos (*P. capsici*, *F.*

oxysporum y *R. solani*), mediante pruebas de patogenicidad y detección de genes de resistencia, como una estrategia en el manejo de enfermedades y referencia al programa de mejoramiento de chile Manzano de la UACH.

Como referencias se empleó al híbrido intervarietal de chile Manzano “Grajales St.” y la accesión de chile serrano “Criollo Morelos-334”. Para determinar la resistencia o susceptibilidad de los genotipos de chile antes mencionados, fue necesario realizar inoculaciones de los patógenos de estudio, de manera mecánica para el caso de los virus y por exposición a raíz desnuda en el caso de los hongos, semanalmente se evaluó el progreso de la enfermedad, midiendo la incidencia y la severidad, a través de la manifestación de síntomas foliares basados en una escala de porcentaje de daño, esto para calcular el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad. Otra forma de determinar la resistencia de los genotipos de chile Manzano fue mediante la detección de genes de resistencia, con los marcadores moleculares reportados en distintos cultivos de la familia Solanácea. Los resultados se presentan en dos capítulos, el primero para enfermedades causadas por virus y el segundo para enfermedades causadas por hongos, ambos con formato de artículo científico, por lo que derivado de ello se presenta una discusión general y conclusiones generales.

2. RESISTENCIA DE HÍBRIDOS Y PROGENITORES DE CHILE MANZANO A ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

2.1. RESUMEN

En México se cultivan 1,500 ha de chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.), su producción es afectada por enfermedades causadas por virus, las cuales ocasionan pérdidas hasta del 60 %. Actualmente se reportan 13 especies de virus que atacan al género *Capsicum* y destacan: CMV, TSWV, PVY, TEV, PMMoV, ToMV y TMV. Una de las mejores estrategias para el manejo de enfermedades es el uso de variedades resistentes. Por ello el objetivo de esta investigación fue evaluar la resistencia de híbridos y progenitores de chile Manzano a enfermedades causadas por virus, mediante pruebas de patogenicidad y detección de genes de resistencia, como estrategia en el manejo de enfermedades y referencia al programa de mejoramiento genético de chile Manzano de la UACH. Se inoculó mecánicamente una solución vírica a 1×10^7 partículas·mililitro⁻¹ donde se evaluó la incidencia, severidad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de híbridos y progenitores de chile Manzano, a enfermedades causadas por los virus: CMV, TSWV, PVY, TEV, PMMoV, ToMV y TMV. También se hizo una detección de genes de resistencia a enfermedades, con marcadores moleculares. Se realizó comparación de medias de rangos Kruskal-Wallis, (KW, $P \leq 0.05$). La enfermedad que obtuvo la ABCPE estadísticamente más alta fue la causada por PMMoV; mientras que las provocadas por TEV y TSWV tuvieron las APCPE más bajas. El híbrido “DALI” obtuvo la mayor cantidad de ABCPE bajas, seguido por “MARUCA”. Todos los híbridos presentaron bandas correspondientes al gen de resistencia para TSWV y PVY.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, incidencia, severidad, Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad, genes de resistencia.

2.2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades en los cultivos hortícolas representan un reto grande en los diferentes sistemas de producción, debido a que son el principal factor de reducción de rendimientos (Pérez y Rico, 2004), y el reto es aún mayor con patógenos víricos, debido a que no se cuenta con un método curativo para su combate.

Entre las enfermedades más comunes y problemáticas causadas por virus se encuentran: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Potato Virus Y* (PVY), *Tomato Spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Su importancia radica en la fácil diseminación de estas enfermedades y la afectación que presentan en frutos (Robles *et al.*, 2010).

Los virus pueden ser transmitidos por áfidos del género *Mizus* y *Aphis* los cuales son vectores de TEV, CMV, ToMV, TMV y PVY (Reddick, 2003; Pérez y Rico, 2004; Astier, 2006 y Nuez, 2006), y por Trips en los que destacan los géneros *Thrips* y *Frankiniella* siendo los vectores de TSWV (Adkins, 2003). No obstante, existen otros virus que no son transmitidos por vectores y permanecen activos durante varios meses en residuos vegetales como PMMoV (Green, 2003). Entre los síntomas más comunes provocados por enfermedades víricas, se encuentran: acortamiento de entrenudos, moteados, mosaicos, clorosis, necrosis, reducción de lámina foliar y deformación de la misma (Agris, 2004).

Las plantas al convivir constantemente con diversos organismos, como depredadores y parásitos, han generado distintos mecanismos de defensa como la síntesis de metabolitos secundarios como: etileno, ácido jasmónico, fitoalexinas, etc. (Sepúlveda *et*

al., 2004), estos procesos metabólicos son facilitados por la presencia de genes de resistencia (*R*) cuya función es la de reconocer los genes de Avirulencia (*Avr*). El reconocimiento del gen *Avr* provoca una respuesta de la planta en la activación de los mecanismos de defensa, como: la reacción de hipersensibilidad (HR), deposición de lignina, síntesis de metabolitos secundarios, etc. (Madriz, 2002).

En 2012, se generaron cinco híbridos de cruza simple: “MARUCA”, “CLARIS”, “YOLI”, “JHOS” y “DALI”, mediante el programa de mejoramiento genético del chile Manzano de la UACH. Debido a la falta de variedades de chile Manzano con resistencia conocida se planteó el objetivo de evaluar la resistencia de híbridos y progenitores de chile Manzano a enfermedades causadas por virus, mediante pruebas de patogenicidad y detección de genes de resistencia, como una estrategia en el manejo de enfermedades y referencia al programa de mejoramiento genético de chile Manzano.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y periodo de estudio

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada en el municipio de Texcoco, Estado de México, México. La obtención de semillas de los genotipos se realizó durante los meses de marzo-octubre de 2014. Las pruebas de patogenicidad y detección de genes, se realizaron en los meses de abril-julio y septiembre-diciembre de 2015 respectivamente. Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en un módulo de invernaderos con cubierta de vidrio con temperatura media de 20.4 °C, radiación de 470.73 lum·sqf⁻¹y humedad relativa de 44 %.

Genotipos

Se evaluaron 13 genotipos. Seis líneas progenitoras (L1, L2, L3, L4, L7 y L8) y cinco híbridos de cruza simple: “MARUCA” (L1 x L2), “JHOS” (L3 x L4), “DALI” (L1 x L3), “CLARIS” (L3 x L8) y “YOLI” (L7 x L8). Todos los genotipos son resultado del programa de mejoramiento de chile Manzano en la Universidad Autónoma Chapingo.

Diseño de tratamientos y experimental

Los seis virus fitopatógenos se inocularon sobre los 13 genotipos de chile a evaluar, se generaron 78 tratamientos. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de doble entrada 13x6, con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue constituida por cinco plantas.

Material fitopatógenos

Los virus fitopatógenos que se inocularon fueron: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Potato Virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Dichos virus se obtuvieron Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo, los cuales se conservaron en plantas indicadoras para el diagnóstico de virus (tabaco, tomate y *Datura sp.*)

Inoculación de los virus

La siembra se realizó en charolas de poli estireno de 77 cavidades, se utilizó como sustrato turba húmeda, esterilizada con vapor de agua. Las semillas se colocaron a una profundidad de dos centímetros y se cubrieron con vermiculita. La inoculación de los

virus se realizó cuando las plántulas tenían desarrolladas cuatro hojas verdaderas es decir a los 60 días después de la emergencia.

El proceso de infección se realizó con una solución vírica de hojas infectadas de las plantas indicadoras. Para obtener esto, se pesaron dos gramos de hoja infectada y se agregaron 20 ml de solución buffer Dieka con pH de 7 y molaridad de 0.25 previamente preparada. Las hojas se maceraron hasta que el material vegetal quedo completamente triturado. Se asperjó un abrasivo a base de Silicio (Carborundum) de 300 mallas (inch²)⁻¹ en las hojas cotiledonales y la primera hoja basal verdadera. Posteriormente, se tomó la solución vírica con ayuda de hisopos de algodón y se frotaron de la lámina foliar.

Evaluación y análisis estadístico

En las pruebas de patogenicidad se realizaron siete evaluaciones semanales después de la inoculación, donde se midió la incidencia y la severidad. La medición de incidencia se realizó con la cuantificación de plantas enfermas, obteniendo su valor porcentual con la Formula 1.

$$\text{Formula 1: Incidencia} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas inoculadas}} * 100$$

La severidad se evaluó mediante la manifestación de síntomas foliares, para lo cual se realizó una escala específica (ANEXO 1) para cada patógeno con base a la metodología que describen Hosfall y Barrat en 1945 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala de severidad de la enfermedad Horsfall y Barrat, 1945.

Clase	Severidad de la enfermedad (%)	Promedio
0	0	0.00
1	0-03	2.34
2	03-06	4.68
3	06-12	9.37
4	12-25	18.75
5	25-50	37.50
6	50-75	62.50
7	75-87	81.25
8	87-94	90.63
9	94-97	95.31
10	97-100	97.66
11	100	100.00

A los 25 Días Después de la Inoculación (DDI) se tomó una muestra compuesta formada por las 20 plantas inoculadas de cada material. Se recolectó la tercera hoja apical de cada planta para realizar una prueba serológica de identificación de virus (ELISA). Después de las siete mediciones, las plantas fueron cortadas por el cuello y se obtuvo la cantidad de biomasa acumulada (Peso Seco).

Una vez obtenidas las lecturas de severidad, se procedió a calcular el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), por el método de integración de polígonos (Campbell y Madden, 1990) con la Formula 2:

$$\text{Formula 2: } ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

Y_i = porcentaje de severidad en el tiempo i

t_i = días después de la inoculación del tiempo i

$i=1, 2, 3, \dots, n$; n = número de muestreos

Se realizó un análisis de varianza de rangos para un experimento factorial propuesta por Scheirer *et al.* (1976) de las variables: incidencia, severidad, ABCPE, y Peso Seco. Y una comparación de rangos con el método de Kruskal-Wallis (Eskridge, 1945).

Extracción de ADN

La detección de genes se realizó por medio de marcadores moleculares del tipo RAP y CAP (Cuadro 2); se utilizó el protocolo de extracción de CTAB para la obtención de ADN de los genotipos, para lo cual, las plantas se lavaron con etanol al 70 %. Se pesaron 0.3 g de tejido que se colocó en un mortero, al cual se le agregó nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino, que fue transferido a 700 µl de amortiguador de extracción contenidos en un microtubo de 1.5 ml precalentado a 65 °C en un termoblock marca Thomas Scientific®. El microtubo se agitó hasta homogeneizar; enseguida se calentó nuevamente a 65 °C en el termoblock durante 10 minutos y se agregaron 200 µl de acetato de potasio 5 M. La muestra se enfrió en hielo por 60 minutos y se colocó en una centrifuga marca Thermo® durante 20 minutos a 12,000 gravedades.

Se agregaron 600 µl de cloroformo y se centrifugó a 10,000 gravedades por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo con 600 µl de isopropanol preenfriado y se dejó a -20 °C por 60 minutos para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 6,000 gravedades durante 5 minutos y se decantó. Se agregaron 700 µl de solución para disolver la pastilla de ADN, a la cual se adicionaron 4 µl de ARN-asa para finalmente incubar a 37 °C durante una hora.

Posteriormente el ADN fue precipitado durante dos horas con 75 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de isopropanol frío. Después se centrifugó a 8,000 gravedades durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con etanol (grado reactivo) al 70 %. Nuevamente se centrifugó a 8,000 gravedades durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente. Finalmente éste fue disuelto en 50 µl de TE y se almacenó a 4 °C.

Detección de genes de resistencia

Para los iniciadores del tipo CAP'S se realizaron mezclas con volumen de 25 µl de solución, las cuales consistieron de 25 ng de ADN, 1x de amortiguador, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 30 ng de cada iniciador, y 1.5 U de Taq polimerasa. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 3 min a 94°C; después 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a la temperatura de alineamiento para cada iniciador mostrado en el Cuadro 2, y 1 min a 72°C; finalmente una extensión de 10 min a 72°C. Para los iniciadores con una sola secuencia, corresponde a marcadores moleculares del tipo RAP'S, cuya mezcla de reacción fue la siguiente: 25 µl de solución, con contenido de: 40 ng de ADN, 1x de amortiguador, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 30 ng de iniciador, y 1.5 U de Taq polimerasa; se utilizó el siguiente programa de amplificación: 2 min a 94°C; después 38 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de alineamiento para cada iniciador mostrado en el Cuadro 2, y 90 s a 72°C; finalmente una extensión de 2.5 min a 72°C. Se realizó la amplificación en un termociclador marca Techne®. Como controles se utilizaron: la accesión de chile serrano "Criollo Morelos-344" (*Capsicum annuum*), chile habanero (*Capsicum chinense*), chile pimiento (*Capsicum annuum*) var. Yolo Wonder, y

las variedades comerciales de jitomate: Cuauhtémoc, Espartaco, Moctezuma, Aquiles, Cedral y El Cid.

En todos los casos se usaron geles de agarosa al 1.5 %. Para la correcta identificación de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb ladder de Invitrogen®. Se cargaron 10 µl de cada muestra amplificada, los cuales se mezclaron con 3 µl de azul de bromofenol. El gel se sumergió en amortiguador TAE 0.25 X en una cámara de electroforesis a 200 volts durante dos horas. Posteriormente se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio y se procedió a la visualización de los resultados con luz UV y a la documentación del gel.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la detección de genes.

Patógeno	Iniciador	Gen	Secuencia –forward (5'→3')	Secuencia-reverse (5'→3')	Temperatura de alineamiento (°C)
ToMV (Arens, <i>et al.</i> , 2010)	TM2-748	<i>Tm-2</i>	CGG TCT GGG GAA AAC AAC TCT	CTA GCG GTA TAC CTC CAC ATC TCC	60
ToMV(Arens, <i>et al.</i> , 2010)	TM2 ² -SNP 2494	<i>Tm-2</i>	CTC ATC AAG CTT ACT CTA GCC TAC TTT AGT	CTG CCA GTA TAT AAC GGT CTA CCG	60
ToMV(Arens, <i>et al.</i> , 2010)	SCN 20	<i>Tm-2</i>	GGT GCT CCG TCG ATG CAA AGT GCA	GGT GCT CCG TAG ACA TAA AAT CTA	60
ToMV(Arens, <i>et al.</i> , 2010)	TMV-2262	<i>Tm-1</i>	GGG TAT ACT GGG AGT GTC CAA TTC	CCG TGC ACG TTA CTT CAG ACA A	60
PVY (Caranta, <i>et al.</i> , 1999)	CSO	<i>Tm-2</i>	CGA AGA GAG AAG GTC	TCA GGG TAG GTT ATT	58
TSWV (Moury, <i>et al.</i> , 2000)	SCAC	<i>Pvr-4</i>	GTG CCA GAG GAG GAT TTA T	GCG AGG TGG ACA CTG ATA CT	60
TSWV (Moury, <i>et al.</i> , 2000)	OPAC10	<i>Tsw</i>	AGC AGC GAG G		40
TSWV (Moury, <i>et al.</i> , 2000)	OPAH13		TGA GTC CGC A		40
TSWV (Moury, <i>et al.</i> , 2000)	OPAF16		TCC CGG TGA G		40
TSWV (Moury, <i>et al.</i> , 2000)	OPB01		GTT TCG CTC C		40
PMMoV (Tsuda, <i>et al.</i> , 1998)	PMMoV-J	<i>L³</i>	ATC CCC GAG TCT TCT TCG TTT TAA CT	GGG CCC CAA CTT ATT TAT GCC ATC ATG TTT	62

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Postulados de Koch

Antes de realizar las inoculaciones, los virus fitopatógenos se sometieron a una prueba de detección de ELISA, para corroborar la correcta identificación del patógeno y su presencia en las fuentes de inóculo. El CMV y TEV estaban en *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, el PMMoV se encontró en *Nicotiana occidentalis*, PVY en *Nicotiana virginia*, TSWV en *Datura stramonium*, finalmente el TMV en *Solanum lycopersicum*.

Pruebas de patogenicidad

La prueba no paramétrica descrita por Scheirer *et al.* arrojó diferencias significativas en los factores de Virus y Genotipo (Cuadro 3) en todas las variables, excepto en incidencia a los 35 DDI, en el que solo se observa efecto significativo en el factor Genotipo, y a los 42 y 49 DDI no mostró efectos significativos. En la interacción Virus x Genotipo únicamente se observaron efectos significativos en la severidad y ABCPE.

Cuadro 3. Análisis de rangos de la severidad, ABCPE, incidencia y peso seco, de los genotipos de chile inoculados con virus.

FV	GL	Severidad				Hm ABCPE
		Hm 28 DDI	Hm 35 DDI	Hm 42 DDI	Hm 49 DDI	
VIRUS	5	191.81 *	325.64 *	274.21 *	268.35 *	65,975.53 *
GENOTIPO	12	251.28 *	208.77 *	145.23 *	134.32 *	58,282.28 *
INTERACCIÓN	60	81.21 *	84.25 *	87.57 *	83.83 *	68,025.92 *

Cuadro 3. Continuación ...

		Incidencia				
		Hm 28 DDI	Hm 35 DDI	Hm 42 DDI	Hm 49 DDI	Hm PS
VIRUS	5	28.94 *	7.62	0.08	0.08	46.60 *
GENOTIPO	12	91.07 *	32.09 *	0.21	0.21	52.10 *
INTERACCIÓN	60	38.24	33.70	1.17	1.17	40.42

*; Significativo con $P \leq 0.05$; FV: Factor de Variación; GL: Grados de Libertad; Hm: Estadístico de ji-cuadrada; DDI: Días Después de la Inoculación; ABCPE: Rango del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; PS: Peso Seco.

Comparación de medias de rangos

El PMMoV obtuvo el rango más pequeño estadísticamente en la incidencia a los 28 DDI (Cuadro 4), seguido por el CMV, lo cual significa que estos dos fitopatógenos fueron los más virulentos al enfermar una mayor proporción de plantas en menos tiempo que los demás virus. Posteriormente a los 35 DDI la incidencia fue estadísticamente igual en todas las enfermedades, es decir, que a partir de esta fecha todos los virus infectaron las células de los diferentes genotipos de Chile. Probablemente se deba al ciclo de patogenicidad que presentan los virus, el cual consiste en la manipulación de la maquinaria bioquímica responsable de la síntesis de proteínas (Agrios, 2004).

Las enfermedades causadas por TSWV, TEV y PVY obtuvieron los rangos de severidad más altos estadísticamente a los 28 DDI, lo que representa que son las enfermedades menos agresivas a los genotipos de Chile. A partir de los 42 DDI se formaron tres agrupaciones donde los rangos más altos se mostraron en las enfermedades causadas por TSWV y TEV, mientras que el más bajo fue dado por el PMMoV, y se mantuvieron de esta forma hasta el final del experimento.

De acuerdo con el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (Cuadro 4), la agresividad de los virus fitopatógenos se puede clasificar en tres grupos: 1) altamente agresivos (PMMoV), 2) moderadamente agresivos (PVY, CMV, TMV) y 3) ligeramente agresivos (TEV y TSWV). Esta agrupación está relacionada con la acumulación de biomasa, debido a que el PMMoV fue el virus que estadísticamente acumuló la menor cantidad de Peso Seco. Robles *et al.* (2010) mencionan que el PMMoV es uno de los virus más devastadores en diferentes cultivares de Chile, con presencia en campo e invernadero, reduce el vigor de nuevos brotes y el rendimiento de frutos, por lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Cuadro 4. Comparación de medias de rangos de la incidencia y severidad de las enfermedades causadas por virus en los genotipos de Chile inoculados.

Virus	Severidad							
	28 DDI		35 DDI		42 DDI		49 DDI	
PVY	791.30	bc ^z	654.84	b	662.61	b	679.07	b
CMV	664.40	d	615.56	b	693.15	b	710.62	b
TMV	721.25	cd	594.25	b	674.57	b	699.10	b
PMMoV	481.91	e	563.22	b	485.23	c	458.32	c
TEV	899.27	ab	1037.45	a	1040.03	a	1030.28	a
TSWV	958.33	a	1051.15	a	960.55	a	939.06	a
kw	115.11		115.11		115.11		115.11	

	Incidencia					
	ABCPE		28 DDI		PS	
PVY	661.31	b	175.48	a	127.68	b
CMV	638.65	b	130.51	ab	106.62	b
TMV	626.87	b	147.50	a	131.63	b
PMMoV	439.79	c	94.12	b	224.18	a
TEV	1098.96	a	169.72	a	156.03	b
TSWV	1050.87	a	174.21	a	145.39	b
kw	115.11		51.34		51.34	

^zRangos con la misma letra dentro de columnas son iguales (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$); DDI: Días Después de la Inoculación; ABCPE: Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; PS: Peso Seco.

Los rangos de la severidad a los 28 DDI resultaron ser estadísticamente más altos en el híbrido “CLARIS” (Cuadro 5), seguido del Criollo Morelos y Grajales St., lo que significa que la severidad en estos genotipos fue menor, a los 35 DDI solo “CLARIS”, y el Criollo Morelos mostraron los rangos más altos, mientras que los demás genotipos formaron un solo grupo con los rangos más bajos. A los 42 DDI “CLARIS” obtuvo el rango más bajo, donde mostró la mayor susceptibilidad a partir de esta fecha. El chile Criollo Morelos obtuvo el rango más alto a los 42 y 49 DDI, en esta última fecha los rangos de severidad de “JHOS”, “YOLI”, “DALI”, “MARUCA” y el progenitor L1, fueron estadísticamente iguales al del Criollo Morelos. A pesar que el Criollo Morelos fue el genotipo que mostró menor susceptibilidad a las enfermedades víricas, su valor de rango estuvo disminuyendo; esto concuerda nuevamente con lo mencionado por Sepúlveda *et al.* (2004). Los híbridos “YOLI”, “JHOS”, “DALI” y “MARUCA” fueron los genotipos que obtuvieron los rangos más altos en la variable de Peso Seco.

Cuadro 5. Comparación de rangos para las variables de incidencia y severidad en híbridos y progenitores de chile Manzano y chile Criollo Morelos.

GENOTIPO	Severidad							
	28 DDI		35 DDI		42 DDI		49 DDI	
CM	1030.01	b	1080.28	a	1064.68	a	965.12	a
L8	678.53	de	712.85	b	745.85	b	757.08	b
L7	653.53	de	708.31	b	795.90	b	758.56	b
L4	713.80	de	638.48	b	712.28	b	728.15	b
L3	704.52	de	580.73	b	688.78	b	729.99	b
L2	517.28	e	617.30	b	647.57	b	661.36	b
L1	685.57	de	737.53	b	804.19	b	809.04	ab
7*8 ("YOLI")	698.31	de	746.62	b	807.87	b	841.74	ab
3*4 ("JHOS")	770.31	d	664.32	b	766.83	b	789.84	ab
1*3 ("DALI")	656.20	de	746.45	b	842.76	b	855.99	ab
1*2 ("MARUCA")	620.35	de	701.20	b	778.56	b	790.44	ab
3*8 ("CLARIS")	1249.00	a	1171.84	a	416.33	c	368.14	c
Grajales St.	808.23	c	679.75	b	713.43	b	730.20	b
kw	199.98		199.98		199.98		199.98	
CM	1086.37	a	222.54	ab	225.94	ab	229.25	a
L8	740.89	bc	111.13	c	117.56	c	143.00	ab
L7	755.15	bc	138.23	bc	149.04	bc	111.33	b
L4	692.93	bc	164.46	bc	134.46	c	124.58	b
L3	666.10	bc	132.00	c	116.92	c	161.75	ab
L2	616.94	bc	91.71	c	140.19	bc	144.90	ab
L1	790.46	b	119.85	c	141.19	bc	161.96	ab
7*8 ("YOLI")	790.95	b	124.02	c	140.19	bc	127.44	b
3*4 ("JHOS")	758.53	bc	147.17	bc	128.38	c	119.71	b
1*3 ("DALI")	810.12	b	116.48	c	134.10	c	123.38	b
1*2 ("MARUCA")	759.90	bc	106.94	c	129.02	c	101.81	b
3*8 ("CLARIS")	590.44	c	282.31	a	252.69	a	225.46	a
Grajales St.	726.85	bc	174.83	bc	122.00	c	157.10	ab
kw	199.98		89.20		89.20		89.20	

²Rangos con la misma letra dentro de columnas son iguales (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$); CM: Criollo Morelos; DDI: Días Después de la Inoculación; ABCPE: Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; PS: Peso Seco.

Debido a la agrupación mostrada en el Cuadro 4 se consideró que los genotipos de chile fueron susceptibles a PMMoV; en la interacción con PVY, CMV, TMV resultaron ser tolerantes y en la interacción con TEV y TSWV fueron resistentes. No obstante, existen algunas particularidades en diferentes interacciones como lo es la enfermedad causada por TMV con “DALI”, y con uno de sus progenitores (L1), los cuales los rangos del Área Bajo la Curva fueron estadísticamente igual al del Criollo Morelos (Cuadro 6). También fueron negativos a la presencia de este virus en la prueba de ELISA, por lo que se catalogaron como resistentes a TMV.

Para la interacción con el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), sobresalieron los híbridos “DALI” y “MARUCA” ya que sus rangos en el Área Bajo la Curva fue estadísticamente igual al del Criollo Morelos quien fue el genotipo que presentó resistencia a este virus. Sepúlveda *et al.* (2004), mencionan que existen ciertos metabolitos que tienen una función antiviral, como lo son: ácido salicílico, etileno, etc. debido a que “DALI” mostró presencia negativa de TSWV en la prueba de ELISA, mientras que sus dos progenitores (L1 y L3) mostraron presencia positiva, sugiere que “DALI” produjo de manera más eficiente dichas moléculas antivirales obteniéndose de esta manera un efecto positivo en la hibridación.

Dado estos casos especiales se considera que “DALI” y “MARUCA”, junto con los progenitores: L8, L7, L4, L2 y L1 son resistentes a la enfermedad provocada por el TSWV, mientras que “YOLI”, “JHOS” y “CLARIS”, junto con el progenitor L3 resultaron ser tolerantes.

Cuadro 6. Comparación de medias de rangos de la severidad y ABCPE de genotipos de chile inoculados con virus.

	GENOTIPO	Severidad								ABCPE	ELISA	
		28 DDI		35 DDI		42 DDI		49 DDI				
PVY	CM	862.40	ab ^z	1102.93	ab	854.65	a	728.25	a	915.48	a	-
	L8	661.45	b	612.85	bc	728.45	a	783.55	a	702.95	a	-
	L7	708.68	b	628.25	bc	758.30	a	741.40	a	712.98	a	-
	L4	891.58	ab	493.53	c	648.05	a	695.30	a	593.20	a	-
	L3	736.55	ab	480.48	c	541.75	a	568.05	a	548.35	a	-
	L2	505.08	b	455.85	c	572.60	a	584.65	a	513.73	a	-
	L1	840.30	ab	612.83	bc	812.25	a	827.10	a	776.00	a	-
	7*8 ("YOLI")	812.43	ab	693.88	bc	796.15	a	842.20	a	794.50	a	-
	3*4 ("JHOS")	876.68	ab	591.48	bc	653.40	a	675.50	a	673.33	a	-
	1*3 ("DALI")	691.63	b	540.48	c	680.50	a	738.65	a	624.25	a	-
	1*2 ("MARUCA")	535.78	b	543.55	c	675.25	a	683.95	a	618.73	a	-
	3*8 ("CLARIS")	1285.78	a	1305.90	a	407.55	a	427.75	a	649.45	a	-
	TEST	878.60	ab	450.90	c	485.05	a	531.52	a	474.13	a	-
	CM	685.08	b	889.45	ab	882.70	a	757.90	a	856.80	a	-
CMV	L8	682.48	b	558.38	b	668.40	a	666.10	a	641.63	a	-
	L7	664.38	b	623.30	b	831.15	a	811.82	a	741.15	a	-
	L4	640.73	b	445.25	b	650.85	a	690.60	a	557.10	a	-
	L3	631.38	b	400.50	b	639.70	a	642.55	a	570.63	a	-
	L2	434.63	b	446.83	b	644.75	a	724.30	a	527.35	a	-
	L1	492.78	b	568.55	b	734.45	a	791.40	a	630.95	a	-
	7*8 ("YOLI")	551.73	b	578.18	b	793.75	a	857.30	a	680.25	a	-
	3*4 ("JHOS")	728.48	b	494.08	b	755.90	a	789.45	a	658.28	a	-
	1*3 ("DALI")	728.48	b	764.23	ab	782.25	a	785.50	a	778.28	a	-
	1*2 ("MARUCA")	362.83	b	462.95	b	623.75	a	675.50	a	516.23	a	-
	3*8 ("CLARIS")	1307.50	a	1243.05	a	370.20	a	400.30	a	580.18	a	-
	TEST	726.75	b	527.53	b	633.15	a	645.30	a	563.70	a	-

Cuadro 6. Continuación...

GENOTIPO		Severidad								ABCPE		ELISA
		28 DDI		35 DDI		42 DDI		49 DDI				
TMV	CM	1004.43	ab	1102.75	a	1264.65	a	1123.35	a	1264.05	a	-
	L8	650.53	bc	557.15	ab	720.90	ab	710.40	abc	627.88	b	-
	L7	490.63	bc	375.13	b	584.85	b	642.55	abc	455.63	b	-
	L4	678.43	bc	405.98	b	587.40	b	660.40	abc	506.48	b	-
	L3	609.23	bc	429.53	b	554.80	b	599.20	abc	495.95	b	-
	L2	453.35	c	328.83	b	426.20	b	400.30	bc	316.63	b	-
	L1	674.18	bc	632.28	ab	786.90	ab	824.35	abc	734.78	ab	-
	7*8 ("YOLI")	716.98	bc	567.70	ab	757.25	ab	824.35	abc	688.90	b	-
	3*4 ("JHOS")	722.50	bc	482.15	b	620.05	b	646.05	abc	568.70	b	-
	1*3 ("DALI")	645.43	bc	613.10	ab	816.55	ab	890.25	ab	746.25	ab	-
	1*2 ("MARUCA")	537.03	bc	478.98	b	555.20	b	624.70	abc	486.50	b	-
	3*8 ("CLARIS")	1307.50	a	1046.15	a	293.30	b	333.20	c	463.15	b	-
	TEST	886.05	abc	705.55	ab	801.40	ab	809.25	abc	794.48	ab	-
	CM	1034.90	ab	592.10	ab	432.90	a	433.25	a	476.30	a	+
	PMMoV	L8	394.78	c	497.60	ab	383.75	a	371.30	a	357.38	a
L7		193.23	c	406.35	b	413.40	a	322.05	a	270.35	a	+
L4		229.50	c	406.35	b	356.65	a	341.10	a	275.83	a	+
L3		526.83	abc	594.30	ab	684.40	a	677.45	a	587.63	a	+
L2		186.40	c	346.80	b	255.50	a	258.32	a	195.88	a	+
L1		394.78	c	562.43	ab	453.30	a	393.60	a	398.43	a	+
7*8 ("YOLI")		457.38	c	670.63	ab	568.20	a	530.55	a	552.95	a	+
3*4 ("JHOS")		496.35	abc	624.90	ab	647.15	a	676.25	a	609.90	a	+
1*3 ("DALI")		272.33	c	553.73	ab	677.55	a	644.50	a	520.85	a	+
1*2 ("MARUCA")		504.63	abc	641.93	ab	666.40	a	614.30	a	651.00	a	+
3*8 ("CLARIS")		1121.15	a	957.13	a	291.05	a	270.67	a	405.95	a	+
TEST		452.55	c	467.60	ab	477.80	a	424.85	a	414.88	a	+

Cuadro 6. Continuación...

	GENOTIPO	Severidad										ELISA
		28 DDI		35 DDI		42 DDI		49 DDI		ABCPE		
TEV	CM	1285.78	a	1352.53	a	1459.20	a	1399.55	a	1496.23	a	-
	L8	805.75	ab	1067.65	a	1033.20	abc	1055.00	a	1104.05	ab	-
	L7	815.35	ab	1104.60	a	1059.65	abc	989.10	a	1130.40	ab	-
	L4	964.20	ab	1052.70	a	1101.60	abc	1077.37	a	1186.05	ab	-
	L3	884.98	ab	819.95	a	882.70	bc	989.10	a	934.65	b	-
	L2	772.98	ab	1045.23	a	973.90	abc	989.10	a	1064.50	ab	-
	L1	814.50	ab	1026.05	a	1078.80	abc	1099.75	a	1152.23	ab	-
	7*8 ("YOLI")	817.50	ab	948.43	a	1078.80	abc	1055.00	a	1074.08	ab	-
	3*4 ("JHOS")	943.55	ab	990.95	a	1129.65	abc	1099.75	a	1187.90	ab	-
	1*3 ("DALI")	700.35	b	944.20	a	987.60	abc	1055.00	a	1012.63	ab	-
	1*2 ("MARUCA")	777.43	ab	1072.80	a	1147.20	ab	1122.125	a	1175.43	ab	-
	3*8 ("CLARIS")	1186.33	ab	1200.65	a	579.35	c	396.00	b	707.18	b	-
	TEST	921.83	ab	861.08	a	1008.80	abc	1066.80	a	1061.13	ab	-
	CM	1307.50	a	1441.90	a	1493.95	a	1348.425	a	1509.38	a	-
TSWV	L8	876.23	ab	983.48	ab	940.40	bc	956.15	a	1011.48	ab	-
	L7	1048.95	ab	1112.25	ab	1128.05	ab	1044.42	a	1220.43	ab	-
	L4	878.38	ab	1027.10	ab	929.10	bc	904.15	ab	1038.93	ab	+
	L3	838.15	ab	759.65	b	829.35	bc	903.575	ab	859.43	b	+
	L2	751.25	b	1080.28	ab	1012.45	abc	1011.47	a	1083.58	ab	-
	L1	896.88	ab	1023.05	ab	959.45	abc	918.05	ab	1050.40	ab	+
	7*8 ("YOLI")	833.85	ab	1020.90	ab	853.05	bc	941.05	a	955.03	b	+
	3*4 ("JHOS")	854.30	ab	802.35	b	794.80	bc	852.05	ab	853.08	b	+
	1*3 ("DALI")	899.03	ab	1062.95	ab	1112.10	ab	1022.05	a	1178.48	ab	-
	1*2 ("MARUCA")	1004.43	ab	1007.00	ab	1003.55	abc	1022.05	a	1111.55	ab	-
	3*8 ("CLARIS")	1285.78	ab	1278.15	ab	556.55	c	380.90	b	736.75	b	-
	TEST	983.63	ab	1065.85	ab	874.40	bc	903.45	ab	1052.80	ab	+
	kw	550.56		550.56		550.56		550.56		550.56		

²Rangos con la misma letra dentro de columnas son iguales (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$); CM: Criollo Morelos; DDI: Días Después de la Inoculación; ABCPE: Rango del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad.

Detección de genes de resistencia

Se realizó la detección de cuatro genes de resistencia a los virus fitopatógenos (PVY, ToMV, TSWV, PMMoV) en los híbridos y progenitores de chile manzano y derivado de ello se encontraron diversas resistencias en los genotipos de chile manzano evaluados.

El alelo *Pvr4* confiere resistencia para todos los patotipos del virus Y de la papa; amplificado por el iniciador CSO, que muestra una banda de 458 pb (Caranta *et al.*, 1999). En la figura 11(ANEXO 2) se observó que tanto híbridos y líneas progenitoras de chile Manzano presentaron dicha banda. Este resultado, indica la presencia del gen *Pvr4* en los híbridos y progenitores de chile manzano, por lo que demuestra que son resistentes a PVY.

Sin embargo, aunque los progenitores (L8, L7, L4, L3, L2 y L1) y los híbridos (“MARUCA”, “JHOS”, “DALI”, “CLARIS” y “YOLI”) demostraron tener el gen *Pvr4*, el PVY provocó una enfermedad moderadamente agresiva (Cuadro 4), de igual manera las ABCPE fueron estadísticamente iguales en todos los híbridos y progenitores (Cuadro 6), lo cual señala que aunque los genotipos de chile manzano cuentan con el gen (*R*) para PVY se enfermaron, esta situación es explicada por Madriz (2002) ya que señala que la presencia de un gen de resistencia actúa principalmente como un activador de diferentes mecanismos de defensa, además las pruebas de ELISA mostraron presencia negativa del virus

El alelo responsable de la resistencia al virus de la marchitez manchada del tomate es conocido como *Tsw*, para este alelo se utilizaron cuatro iniciadores de tipo RAP's y uno del tipo CAP (Cuadro 2), los RAP's: OPAC10, OPAH13, OPAF16 y OPB01 (Figuras 12,

13, 14 y 15, respectivamente; ANEXO 2), presentan una banda de aproximadamente 593, 800, 250 y 750 pb, respectivamente, en acoplamiento con el alelo *Tsw*, excepto al iniciador OPB01, al cual lo reportan en repulsión a dicho alelo. El iniciador SCAC (CAP) presenta una banda de 568 pb (Figura 16, ANEXO2) aproximadamente con un comportamiento Codominante (Moury *et al.*, 2000). En los genotipos de chile Manzano solo se presentan las bandas reportadas con los iniciadores: OPAC 10, OPAF 13 y SCAC 568, en todos los híbridos y líneas progenitoras. La presencia de estas bandas indica que los híbridos y progenitores de chile Manzano evaluados presentan resistencia al TSWV.

Los resultados del Cuadro 4, mostraron que el ataque de TSWV se clasificó como ligeramente agresivo. No obstante, en el Cuadro 6 se observa que los híbridos “YOLI” y “JHOS” fueron que obtuvieron los rangos estadísticamente más bajos en la ABCPE. Madriz (2002), explica que el gen R, en este caso el gen *Tsw*, desencadena la activación de diversos genes responsables de la producción de diferentes moléculas de defensa como ácido salicílico, ácido jasmónico, compuestos fenólicos, etc. por lo que “YOLI” y “JHOS” probablemente la comunicación entre *Tsw* y los demás genes no se dio a tiempo y el virus invadió las células de las plantas. Por otra parte García (2003) indica que la resistencia de chile a este patógeno es fácilmente superada, lo que también explica el por qué “YOLI”, “JHOS” y los progenitores L1, L3 y L4 tuvieron presencia positiva del virus en la prueba de ELISA.

Se utilizaron cuatro iniciadores asociados a genes que confieren resistencia a ToMV (Cuadro 2): SCN 20: asociado al gen *Tm-1* con la característica de ser Dominante; TMV-2262 y TM2-748: que se relaciona con los genes *Tm2* y *Tm2²* con una acción

Codominante. Al iniciador TM2²-SNP 2494 que aún no se le ha encontrado asociación alguna con los genes (Figura 18, ANEXO 2) antes mencionados (Arens *et al.*, 2010). Tanto en los híbridos como en las líneas progenitoras de chile Manzano no se encontró banda de resistencia (1400 pb) para el gen *Tm-1*. Pero si presentaron banda de resistencia correspondiente al alelo *Tm-2*² (214pb) y una de susceptibilidad para *Tm-2* (Figuras 17 y 19, ANEXO 2) y debido a que este par de alelos tienen una relación codominante, es de esperarse que el ToMV provoque síntomas típicos de una enfermedad vírica (prueba no realizada) sin que estos lleguen a afectar en gran medida a los genotipos de chile Manzano como lo explican Ohomori *et al.* (1996). Por lo tanto, se puede considerar que híbridos y líneas progenitoras de chile Manzano son tolerantes a este virus.

Lanfermeijer *et al.* (2003) mencionan que debido a que el ToMV y TMV pertenecen a la familia de los Tobamovirus, existe la posibilidad de que los genes encargados de conferir la resistencia a ToMV, de algún modo sirvan en contra de TMV. Además, de acuerdo con los resultados mostrados en el Cuadros 4, al TMV se le catalogó como moderadamente agresivo y en las pruebas de ELISA (Cuadro 6) arrojaron un resultado negativo a la presencia de este virus, de esta manera se corroboró la resistencia de todos los genotipos de chile Manzano a TMV.

Se el iniciador PMMoV-J (Cuadro 2) que se encuentra asociado al gen *L*³, el cual es el responsable de conferir resistencia a PMMoV (Tsuda *et al.*, 1998). Este gen muestra una banda de 717 pb, la cual no se encontró en ningún genotipo de chile evaluado (Figura 10, ANEXO 2), por lo que se determinó que los híbridos y sus progenitores de chile Manzano son susceptibles a este virus.

2.5. CONCLUSIONES

El híbrido “DALI” y la línea progenitora L1 presentaron resistencia a la enfermedad provocada por TMV; mientras que los híbridos “MARUCA”, “JHOS”, “CLARIS” y “YOLI” así como las líneas progenitoras (L2, L3, L4, L7 y L8) presentaron tolerancia.

Los híbridos “DALI” Y “MARUCA” y los progenitores L1, L2, L4, L7 y L8 son resistentes a TSWV, y los demás genotipos (“JHOS”, “CLARIS”“YOLI” y L3) presentaron tolerancia.

Los híbridos “MARUCA”, “DALI”, “JHOS”, “YOLI” y “CLARIS”, junto con sus líneas progenitoras L2, L3, L4, L7 Y L8 de chile Manzano son resistentes a TEV; y tolerantes a PVY y CMV. Pero susceptibles a la enfermedad causada por el PMMoV.

Los cinco híbridos de chile Manzano evaluados (“MARUCA”, “DALI”, “JHOS”, “CLARIS” y “YOLI”) y las líneas progenitoras (L1, L2, L3, L4, L7 Y L8), presentaron bandas de resistencia para PVY, TSWV y TMoV; en el caso del PMMoV no se presentó banda alguna.

2.6. LITERATURA CITADA

Adkins, S. 2003. *Tomato spotted wilt virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS. pp. 39-40

Agrios, G. N. 2004. Fitopatología. Traductor: Manuel Guzmán Ortiz. Segunda Edición. LIMUSA. 838 p.

Arens, P.; C. Mansilla; D. Deinum; L. Cavellini; A. Moretti; S. Rolland; H. van der Schoot; D. Calvache; F. Ponz; C. Collonnier; R. Mathis; D. Smilde; C. Caranta and B. Vosman. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *TheorAppl Genet.* 120: 655-664.

Astier, S., J. Albouuy, Y. Maury, C. Robaglia and H. Lecoc. 2006. Principles of plant virology; genome pathogenicity, virus ecology. First Edition. Science Publishers. 472 p.

Campbell, C. L. and V. Madden, L. 1990. Introduction of Plant Diseases Epidemiology. Jhon Willey and Sons Inc. 532 p.

Caranta, C., A. Thabuis and Palloix. 1999. Development of a CAPS marker for the Pvr4 locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in Pepper. *Genome.* 42:1111-1116.

Eskridge, K. M. 1995. Statistical Analysis of Disease Reaction Data Using Nonparametric Methods. *HortScience.* 30(3): 478-480.

García, A. F. and Bruce A. McDonald. 2003. An Analisis of the Durability of Resistance to Plant Virus. *Phytopathology-* 93(8):941-9523

Green, S. K. 2003. *Pepper mild mottle virus*. Compendium of Pepper diseases. APS PRESS. pp. 32-33

Horsfall, J. C., and S. Barrat R. 1945. An Improved trading system for measuring plant disease. *Phytopathology* 35:655.

Lanfermeijer, F. C., Dijkhuid, J., Sturre, M. J. C., de Hann, P. and Hille Jacques. 2003. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology.* 52:1037-1049.

Madriz K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 3:22-32.

Moury, B., S. Pflieger, V. Blattes, V. Lefebvre and A. Palloix, 2000. A CAPS marker to assist selection of tomato Spotted Wilt virus (TSWV) resistance in Pepper. *Genome.* 43:137-142.

Nuez, V. F., R. Gil, O. y J. Costa, G. 1996. El cultivo de pimientos chiles y ajíes: Enfermedades Producidas por virus y micoplasmas. Mundi Prensa. pp. 249-313.

Ohmori, T., Murata M. and Motoyoshi F. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. *TheorAppl Genet.* 92:151-156.

Pérez, M. L. y E. Rico J. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el Estado de Guanajuato. Universidad de Guanajuato. 143 p.

Reddick, B. B. 2003. *Tobacco etch virus*. Compendium of Pepper diseases. APS PRESS. p 38.

Robles, H. L., A. C. González F., E. M. Gill L., L. Pérez, M. y J. C. López D. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *TECNOCENCIA Chihuahua.* 2:IV. pp. 72-86.

Scheirer, C. J., S. Ray, W. and N. Hare. 1976. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. *Biometrics* 21:429-434.

Sepúlveda, J. G., H. Porta, D. y M. Rocha, S. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 31(03):355-363.

Tsuda, S., M. Kirita, and Y. Watanabe. 1998. Characterization of a Pepper Mild Mottle Tobamovirus Strain Capable of overcoming the L3 Gene-Mediated Resistance, Distinct from the Resistance-Breaking Italian Insolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 11(4): 327-331.

3. RESISTENCIA DE HÍBRIDOS Y PROGENITORES DE CHILE MANZANO A ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS DE RAÍZ

3.1. INTRODUCCIÓN

En los cultivares de chile una de las principales limitantes es la presencia de fitopatógenos que causan las pudriciones de raíz (Velásquez *et al.*, 2001), entre los organismos comúnmente relacionado a este tipo de enfermedades se encuentran: *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian (González *et al.*, 2004).

Phytophthora capsici Leonian es uno de los patógenos más severos, ya que causa pérdidas que van del 60 al 100% (Anaya *et al.*, 2011), generalmente este hongo está asociado con *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* Kühn (Rico *et al.*, 2003). El patosistema causado por *P. capsici* ha sido ampliamente estudiado, sin embargo la solución a este problema es difícil de lograr, debido a la alta variabilidad genética del patógeno (Castro *et al.*, 2012).

En la actualidad no existe alguna variedad comercial de chile resistente a *P. capsici*. Sin embargo se cuenta con el chile Criollo Morelos 334 (García *et al.*, 2010 y Sarath *et al.*, 2011) que es resistente a *P. capsici* y se emplea como portainjerto. Por otra parte, se tienen registros que *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se encuentran asociados con *P. capsici* (Rahim y Sharif, 1985).

En 2012, en el programa de mejoramiento genético del chile Manzano de la UACH, se generaron cinco híbridos de cruce simple: MARUCA, CLARIS, YOLI, JHOS y DALI; de las cuales no se cuenta con información acerca de su resistencia o susceptibilidad al

ataque de los hongos antes mencionados. Por ello el objetivo de esta investigación fue evaluar la resistencia de híbridos y progenitores de chile Manzano a enfermedades causadas por hongos, mediante pruebas de patogenicidad y detección de genes de resistencia, como una estrategia en el manejo de enfermedades y referencia al programa de mejoramiento genético de chile Manzano de la UACH.

1.1. RESUMEN

En México se cultivan 1500 ha de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.), las pudriciones de raíz causadas por *Phytophthora capsici*, *Fusarium spp.* y *Rhizoctonia solani*, son las principales limitantes en los sistemas de producción de chile Manzano, ya que causan pérdidas hasta del 100 %. El uso de variedades resistentes reduce dichas pérdidas. Por ello el objetivo de esta investigación fue evaluar la resistencia de híbridos y progenitores de chile Manzano a enfermedades causadas por hongos, mediante pruebas de patogenicidad y detección de genes de resistencia, como estrategia en el manejo de enfermedades y referencia al programa de mejoramiento genético de chile Manzano de la UACH. Se inoculó una solución fúngica con concentración de 1×10^6 esporas·mililitro⁻¹; la raíz se expuso a esa solución. Se evaluó la incidencia, severidad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de cinco híbridos de chile Manzano (“MARUCA”, “CLARIS”, “YOLI”, “DALI” y “JHOS”) y sus líneas progenitoras a enfermedades causadas por hongos (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*). También se hizo una detección de genes de resistencia a dichas enfermedades mediante marcadores moleculares. Se realizó comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$). La enfermedad que obtuvo la ABCPE más alta fue la causada por *P. capsici*. Los híbridos “YOLI”, “DALI” y “MARUCA” tuvieron ABCPE bajas y mostraron resistencia a *F. oxysporum*. Todos los híbridos tuvieron ABCPE bajas y mostraron resistencia a *R. solani*, además presentaron bandas correspondientes al gen de resistencia para *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, incidencia, severidad, Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad, genes de resistencia.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y periodo de estudio

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada en el municipio de Texcoco, Estado de México, México. Las cruces y obtención de semillas de los genotipos a evaluar se realizaron en el periodo de marzo-octubre de 2014. Las pruebas de patogenicidad y detección de genes se realizaron en los meses de mayo-julio y septiembre-diciembre de 2015. Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en un módulo de invernaderos con cubierta de vidrio con temperatura promedio de 20.4 °C, radiación de 470.73 lum·sqf⁻¹ y humedad relativa de 44 %.

Genotipos

Se evaluaron 13 genotipos: seis líneas progenitoras (L1, L2, L3, L4, L7 y L8) y cinco híbridos de cruza simple: “MARUCA” (L1xL2), “JHOS” (L3xL4), “DALI” (L1xL3), “CLARIS” (L3xL8) y “YOLI” (L7xL8). Todos los genotipos son resultado del programa de mejoramiento de chile Manzano en la Universidad Autónoma Chapingo.

Diseño experimental y tratamientos

Los tres hongos fitopatógenos se inocularon sobre los 13 genotipos de chile a evaluar, se generaron 39 tratamientos. El experimento se estableció en un diseño con bloques completamente al azar con arreglo factorial de doble entrada 13x3, con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue constituida por cinco plantas.

Material Fitopatógeno

Los hongos evaluados fueron: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian. Dichos hongos fueron obtenidos del Departamento de Parasitología Agrícola, los cuales se conservaban en tubos de ensayo con Papa Dextrosa Agar (PDA) cubiertos con aceite mineral.

Inoculación de los hongos

La siembra se realizó en charolas de poli estireno de 200 cavidades, se utilizó como sustrato turba húmeda, esterilizada con vapor de agua. Las semillas se colocaron a una profundidad de dos centímetros y se cubrieron con vermiculita, posteriormente a los 70 días después de la siembra, se trasplantó en macetas de poliestireno de 300 ml.

La inoculación de los hongos se realizó cuando las plantas tenían desarrolladas ocho hojas y sucedió a los 90 días después de la emergencia. El proceso de infección fue mediante una solución de partículas infectivas la cual se realizó a través de crecimiento fúngico en medios nutritivos de cultivo mezclándolo con agua destilada y dos gotas de Tween 20. La solución se utilizó a una concentración de 1×10^6 esporas·ml⁻¹ (Apodaca *et al.*, 2004). Las plantas de los diferentes genotipos fueron expuestas a raíz desnuda en la solución fúngica 24 horas. Posteriormente, se trasplantaron en macetas de 300 ml y se acondicionó una cámara húmeda para favorecer la expresión de síntomas.

Evaluación y análisis estadístico

Para las pruebas de patogenicidad se realizaron tres evaluaciones, la primera a los siete Días Después de la Inoculación (DDI), y las siguientes dos con frecuencia de 15 días; donde se midió la incidencia y la severidad. La evaluación de la incidencia se

realizó con la cuantificación de plantas enfermas y obteniendo su valor porcentual con la Fórmula 1.

$$\text{Fórmula 1: Incidencia} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas inoculadas}} * 100$$

La severidad se evaluó mediante la manifestación de síntomas en la parte aérea, empleando una escala decimal (Cuadro 7) para lo cual se realizó una escala específica (ANEXO 1) para cada patógeno.

Cuadro 7. Escala decimal para evaluar la severidad de alguna enfermedad.

Clase	Severidad de la enfermedad (%)
1	0
2	20
3	40
4	60
5	80
6	100

Una vez terminadas las evaluaciones se obtuvo una muestra compuesta para realizar los postulados de Koch y así corroborar que los síntomas observados fueron por efecto de los patógenos inoculados, a dichos aislamientos se les caracterizó morfológica y molecularmente.

Con las lecturas de severidad tomadas se procedió a calcular el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) por el método de integración de polígonos (Campbell y Madden, 1990) con la Fórmula 2.

$$\text{Fórmula 2: } ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

Y_i = porcentaje de daño en el tiempo i

t_i = días después de la inoculación del tiempo i

$i=1, 2, 3, \dots, n$; n = número de muestreos

Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) con, en las variables de incidencia, severidad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad.

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción de CTAB para la obtención de ADN de los genotipos, en el cual las plantas de 30 días de edad, se lavaron con etanol al 70 %. Se pesaron 0.3 g de tejido, mismo que se colocó en un mortero al cual se le agregó nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino, posteriormente se transfirió a 700 μ l de amortiguador de extracción contenidos en un microtubo de 1.5 ml precalentado a 65 °C en un termoblock marca Thomas Scientific®. El microtubo se agitó hasta homogeneizar; enseguida se calentó nuevamente a 65 °C en el termoblock durante 10 minutos y se agregaron 200 μ l de acetato de potasio 5 M. La muestra se enfrió en hielo durante 60 minutos y se colocó en una centrifuga marca Thermo® durante 20 minutos a 12,000 gravedades.

Se agregaron 600 μ l de cloroformo y se centrifugó a 10,000 gravedades por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo con 600 μ l de isopropanol preenfriado y se dejó a -20 °C por 60 minutos para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 6,000 gravedades durante 5 minutos y se decantó. Se agregaron 700 μ l de solución

para disolver la pastilla de ADN a la cual se adicionaron 4 µl de ARN-asa y se incubó a 37 °C durante una hora.

Posteriormente el ADN se precipito durante dos horas con 75 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de isopropanol frio. Después se centrifugó a 8,000 gravedades durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con etanol (grado reactivo) al 70 %. Nuevamente se centrifugó a 8,000 gravedades durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente. Finalmente éste fue disuelto en 50 µl de TE y se almacenó a 4 °C.

Detección de genes de resistencia

La detección de genes se realizó por medio de marcadores moleculares del tipo CAP. Se realizaron mezclas con volumen de 25 µl de solución, las cuales consistieron de 25 ng de ADN, 1 x de amortiguador, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 30 ng de cada iniciador y 1.5 U de Taq polimerasa. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 3 min a 94 °C; después 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a la temperatura de acoplamiento para cada iniciador y 1 min a 72 °C; finalmente una extensión de 10 min a 72 °C.

Los marcadores usados en el caso de *Fusarium* fueron: At2-F (5'-d CGA ATC TGT ATA TTA CAT CCG TCGT) y At2-R (5'-d GGT GAA TAC CGA TCA TAG TCG AG), a una temperatura de acoplamiento de 55 °C (Arens *et al.*, 2010); y para el caso de *Phytophthora capsici* los iniciadores fueron: OpD04.717-F (5' d CCA TAA GGG TTG GTA AAT TTA CAA AG) y OpD04.717-R (5'-d TCG AGA GAT AAT TCA GAT AGT ATA ATC) a una temperatura de acoplamiento de 60 °C (Quirin *et al.*, 1998). Para el caso de

Rhizoctonia solani no fue posible realizar un estudio de detección de genes, puesto que la secuencia que amplifica la zona responsable de la resistencia no se consiguió.

En todos los casos se usaron geles de agarosa al 1.5 %. Para la correcta identificación de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb ladder de Invitrogen®. Se cargaron 10 µl de cada muestra amplificada, los cuales se mezclaron con 3 µl de azul de bromofenol. El gel se sumergió en amortiguador TAE 0.25 X en una cámara de electroforesis a 200 volts durante dos horas. Posteriormente se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio y se procedió a la visualización de los resultados con luz UV y a la documentación del gel.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Postulados de Koch

En el caso de *Phytophthora capsici* se observaron estructuras morfológicas, tales como anteridio anfiginio (debajo del oogonio cercano al micelio) junto con su respectivo oogonio de forma esférica (Figura 1-A), también se observaron esporangios ovoides de una a dos papilas (Figura 1-B), dichas estructuras son descritas por Gallegly y Hong en 2008. En lo que respecta a *Rhizoctonia solani*, se observó el micelio típico del género, es decir, septado y con bifurcaciones de 90° (Figura 1-C), en el lugar donde se forma la bifurcación se notó una pequeña constricción lo cual coincide a lo reportado por Giovannini *et al.* (2005). Finalmente se observaron clamidosporas de forma redonda Figura 1-D, pertenecientes al hongo *Fusarium oxysporum* así como microconidios de forma elíptica, sin septas (Figura 1-E), estas estructuras concuerdan con lo descrito por Nelson (1990).

El síntoma causado por *P. capsici* consistió en la pérdida de la turgencia de los peciolo de las hojas el cual coincide con lo descrito por Castro (2012), también se aprecia una marchitez general en la planta, tal como lo menciona Fernández (1983), así como desecación de la planta, en la cual las hojas se quedaron adheridas al tallo. Estos síntomas coincide con lo descrito por Fernández en 1983 al mencionar que la planta afectada por este patógeno permanece verde por algunos días y cuando ocurre la muerte está permanece erecta con las hojas muertas adheridas.

El principal síntoma causado por *Rhizoctonia solani* consistió en el marchitamiento tal como lo mencionan Sharma *et al.* (2005), para el caso particular del chile Manzano la enfermedad que provocó *R. solani*, intensificó el marchitamiento de la planta y posteriormente ocurrió la muerte, esta última fue similar a la muerte causada por *P. capsici* ya que dejó las hojas secas adheridas al tallo.

Las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum*, mostraron una ligera flacidez del tejido, así como amarillamiento y pérdida de hojas. Dichos síntomas coinciden con los descritos por González (2012).

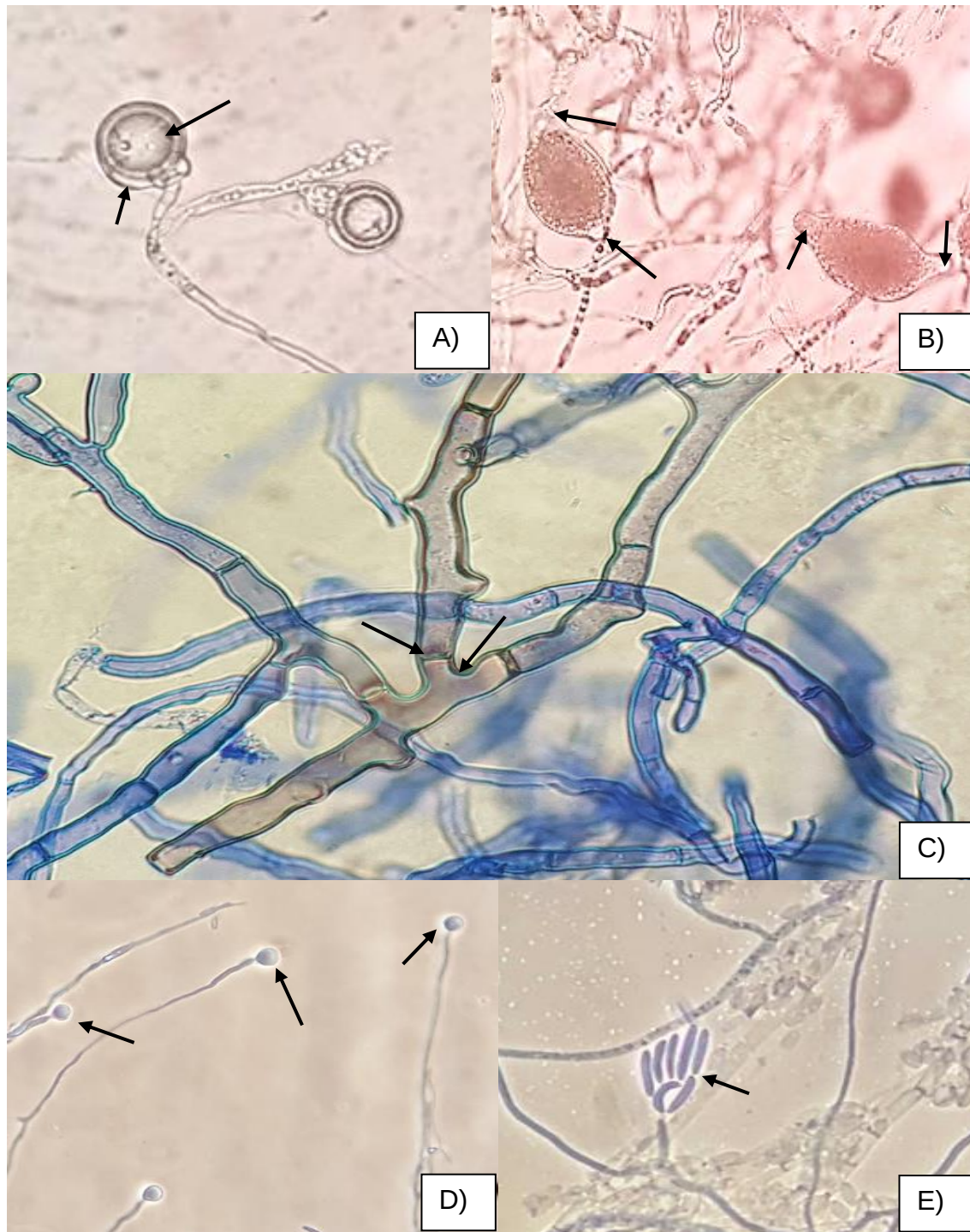


Figura 1. Estructuras de los distintos hongos inoculados a los genotipos de Chile Manzano. A). Oogonio y anteridio de *P. capsici*; B) Esporangios papilados de *P. capsici*; C) Micelio bifurcado de *R. solani*; D) Clamidosporas terminales de *F. oxysporum*; E) Microconidios de *F. oxysporum*.

Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza para los factores de Genotipo y Hongos (Cuadro 7) muestran efectos significativos en todas las variables, excepto en la Incidencia a los 7 DDI ya que solo se observó en el factor Hongo. Para la interacción Hongo x Genotipo únicamente se observó la presencia de efectos significativos en las variables de Severidad a los 7, 21 y 35 DDI y ABCPE; para las demás variables no se mostraron efectos significativos.

Cuadro 8. Análisis de varianza de la severidad e incidencia de los Hongos inoculados sobre los Genotipos de Chile.

FV	GL	Severidad		
		7 DDI	21 DDI	35 DDI
BLOQUE: HONGO	9	800.28	279.87	167.37
PLANTA: HONGO*GENOTIPO	156	377.69	187.95	158.97
HONGO	2	60612.20 *	278966.33 *	322135.59 *
GENOTIPO	12	11695.49 *	12628.36 *	13440.18 *
HONGO*GENOTIPO	24	3767.63 *	9254.41 *	9812.20 *
Error	571	365.03	264.07	173.37
Total	774			
CV %		44.82	29.42	24.23

		Incidencia		
		ABCPE	7 DDI	21 DDI
BLOQUE: HONGO	9	199789.80	40.38	10.26
PLANTA: HONGO*GENOTIPO	156	170879.60	.	.
HONGO	2	216404731.70 *	780.86 *	10.21
GENOTIPO	12	9857514.80 *	85.52	10.25
HONGO*GENOTIPO	24	6357860.10 *	73.33	10.25
Error	571	172627.20	70.43	10.35
Total	774			
CV %		24.37	8.60	3.23

*: Significativo a una $P \leq 0.05$; FV: Fuentes de Variación; GL: Grados de Libertad; ABCPE: Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; DDI: Días Después de la Inoculación; CV: Coeficiente de Variación.

Comparación de medias

La virulencia y agresividad mostrada hacia los genotipos de chile Manzano (Cuadro 9) por los tres hongos evaluados (*Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*), muestra una clara diferenciación en cuanto a la agresividad mostrada en ABCPE, agrupándose en tres clases: 1) altamente agresivo (*Phytophthora capsici*), 2) moderadamente agresivo (*Fusarium oxysporum*) y 3) ligeramente agresivo (*Rhizoctonia solani*). La Incidencia a los 7 DDI de *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, fue estadísticamente igual y superior a la de *Rhizoctonia solani*.

La consideración de que *Phytophthora capsici* fue altamente agresivo se debió a que la evolución de la severidad (Cuadro 9) en las plantas de chile alcanzo niveles altos en menor tiempo. En contraste, la severidad de *Fusarium oxysporum* no alcanzo niveles tan altos, sin embargo, está aumenta de manera paulatina debido a las barreras que debe superar al momento de colonizar la raíz de la planta, como lo señala Nelson (1981). En el caso de *Rhizoctonia solani* la severidad a los 35 DDI mostró una disminución, lo que sugiere que los mecanismos de defensa de las plantas expuestas a *Rhizoctonia* actúan de manera eficiente y hasta podrían limitar la colonización de este hongo en las raíces de los genotipos de chile evaluados.

Los híbridos “JHOS” y “CLARIS”, junto con el Criollo Morelos (Cuadro 10) obtuvieron los niveles estadísticamente más bajos de severidad a los 7 DDI. No obstante, a los 21 DDI, la severidad en “JHOS” aumentó y los híbridos “YOLI”, “DALI” y “MARUCA” mostraron una severidad estadísticamente baja al ataque de los hongos.

Cuadro 9. Comparación de medias de la severidad e incidencia de las enfermedades causadas por los hongos inoculados.

HONGO	Severidad			ABCPE	Incidencia	
	7 DDI	21 DDI	35 DDI		7 DDI	
Pc	60.00 a ^z	92.62 a	94.08 a	2754.81 a	100.00 a	
Fo	36.69 b	42.35 b	42.43 b	1294.31 b	99.61 a	
Rs	30.98 c	30.46 c	26.31 c	1057.85 c	93.08 b	
DMSH	3.95	3.36	2.72	85.91	3.92	

^zMedias con la misma letra dentro de columnas son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$); Pc: *Phytophthora capsici*; Fo: *Fusarium oxysporum*; Rs: *Rhizoctonia solani*; ABCPE: Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; DDI: Días Después de la Inoculación.

Cuadro 10. Comparación de medias de la severidad de los genotipos inoculados con hongos.

GENOTIPO	Severidad			ABCPE	
	7 DDI	21 DDI	35 DDI		
CM	20.67 f ^z	20.67 e	21.00 e	694.83 f	
L8	63.33 a	61.67 bc	56.33 c	2044.17 b	
L7	47.33 bc	67.00 b	68.00 b	2035.67 b	
L4	48.67 b	54.33 cd	50.00 cd	1725.33 cd	
L3	24.33 ef	70.67 ab	71.00 ab	1860.17 bc	
L2	49.00 b	49.00 d	47.00 d	1626.50 c-e	
L1	36.33 cd	49.67 d	51.67 cd	1532.17 ed	
7*8 ("YOLI")	54.00 ab	50.33 d	48.00 d	1709.00 cd	
3*4 ("JHOS")	23.33 ef	65.67 b	71.67 ab	1779.17 cd	
3*8 ("CLARIS")	64.73 a	80.00 a	78.18 a	2498.36 a	
1*3 ("DALI")	33.33 de	47.00 d	48.00 d	1431.67 e	
1*2 ("MARUCA")	45.67 bc	51.33 d	49.33 cd	1642.33 c-e	
Grajales St.	45.33 bc	52.67 cd	48.33 cd	1651.17 c-e	
DMSH	11.65	9.90	8.03	253.25	

^zMedias con la misma letra dentro de columnas son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$); CM: Criollo Morelos; ABCPE: Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; DDI: Días Después de la Inoculación.

Como se observa en el Cuadro 11 el genotipo: chile serrano “Criollo Morelos” demostró las bondades de ésta accesión, descritas en muchos trabajos de investigación ante la interacción con *Phytophthora capsici* (Oelke *et al.*, 2003 y Glosier *et al.*, 2008), ya que la severidad a los 21 DDI en todos los genotipos de chile Manzano alcanzaron más del 90 %, dicha diferencia también se nota en el ABCPE, Estos resultados se deben a que por una parte el gen de Avirulencia de *P. capsici*, no es reconocido por los genotipos de chile Manzano, lo que conlleva a la susceptibilidad de éste como lo menciona Madriz (2002).

En los genotipos expuestos a *Fusarium oxysporum* la severidad a los 7 DDI mostrada fue estadísticamente igual en todos los genotipos, esto debido a que probablemente el hongo se encontraba en la fase de romper la banda de caspari como lo menciona González *et al.* (2012). A partir de los 21 DDI y en el ABCPE, “YOLI”, “DALI” y “MARUCA” junto con los progenitores: L8, L4, L2 y L1, presentaron una disminución en la severidad, la cual fue estadísticamente igual a la del Criollo Morelos y superior a la de los demás genotipos. Este efecto de disminución tal vez fue provocado porque la invasión de *Fusarium* al tejido vascular de estos organismos fue detenida por la obstrucción del mismo, a través de geles como lo mencionan Garcés *et al.* (2001) y González *et al.* (2012).

En el caso de *Rhizoctonia solani* aunque todos los híbridos mostraron una severidad estadísticamente igual a los 7, 21 y 35 DDI; en el ABCPE, “JHOS” supera ligeramente a los demás híbridos, junto con los progenitores: L7 y L3. Similar a *Fusarium oxysporum*, la mayoría de los genotipos presentaron una disminución en el porcentaje de daño causado por *Rhizoctonia solani*, esto probablemente se debe a que los signos de esta

enfermedad se localizan en la unión de la raíz principal con las raíces secundarias, dicha situación podría provocar el estímulo de producir nuevas raíces como acción de defensa, tal como lo menciona Velázquez *et al.* (2001).

Cuadro 11. Comparación de medias de la severidad de los hongos inoculados sobre los diferentes genotipos de Chile.

HONGO	GENOTIPO	Severidad							
		7 DDI		21 DDI		35 DDI		ABCPE	
Pc	CM	20.00	c ^z	24.00	b	23.00	b	752.50	b
	L8	84.00	a	100.00	a	100.00	a	3174.00	a
	L7	90.00	a	100.00	a	100.00	a	3240.00	a
	L4	63.00	a-c	100.00	a	100.00	a	2943.00	a
	L3	22.00	c	100.00	a	100.00	a	2492.00	a
	L2	78.00	a	100.00	a	100.00	a	3108.00	a
	L1	50.00	a-c	98.00	a	100.00	a	2770.00	a
	7*8 ("YOLI")	85.00	a	98.00	a	100.00	a	3155.00	a
	3*4 ("JHOS")	23.00	bc	92.00	a	100.00	a	2383.00	a
	3*8 ("CLARIS")	90.00	a	100.00	a	100.00	a	3240.00	a
	1*3 ("DALI")	43.00	a-c	93.00	a	100.00	a	2618.00	a
	1*2 ("MARUCA")	75.00	ab	99.00	a	100.00	a	3060.00	a
	Grajales ST	57.00	a-c	100.00	a	100.00	a	2877.00	a
	CM	20.00	a	20.00	b	20.00	b	670.00	c
	Fo	L8	37.00	a	27.00	b	22.00	b	977.00
L7		22.00	a	81.00	a	84.00	a	2087.00	ab
L4		34.00	a	23.00	b	25.00	b	906.50	c
L3		32.00	a	92.00	a	93.00	a	2429.50	a
L2		32.00	a	22.00	b	20.00	b	832.00	c
L1		32.00	a	23.00	b	24.00	b	877.00	c
7*8 ("YOLI")		29.00	a	21.00	b	21.00	b	791.50	c
3*4 ("JHOS")		30.00	a	84.00	a	93.00	a	2287.50	a
3*8 ("CLARIS")		41.33	a	100.00	a	100.00	a	2704.67	a
1*3 ("DALI")		31.00	a	21.00	b	20.00	b	806.00	c
1*2 ("MARUCA")		29.00	a	21.00	b	20.00	b	784.00	c
Grajales ST	36.00	a	30.00	b	24.00	b	1026.00	bc	

Cuadro 11 Continuación ...

	CM	22.00	a	18.00	a	20.00	a	662.00	b
	L8	69.00	a	58.00	a	47.00	a	1981.50	a
	L7	30.00	a	20.00	a	20.00	a	780.00	b
	L4	49.00	a	40.00	a	25.00	a	1326.50	ab
	L3	19.00	a	20.00	a	20.00	a	659.00	b
	L2	37.00	a	25.00	a	21.00	a	939.50	ab
	L1	27.00	a	28.00	a	31.00	a	949.50	ab
Rs	7*8 ("YOLI")	48.00	a	32.00	a	23.00	a	1180.50	ab
	3*4 ("JHOS")	17.00	a	21.00	a	22.00	a	667.00	b
	3*8 ("CLARIS")	57.00	a	45.00	a	40.00	a	1602.00	ab
	1*3 ("DALI")	26.00	a	27.00	a	24.00	a	871.00	ab
	1*2 ("MARUCA")	33.00	a	34.00	a	28.00	a	1083.00	ab
	Grajales ST	43.00	a	28.00	a	21.00	a	1050.50	ab
	DMSH	52.35		44.53		36.08		1138.53	

²Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$); CM: Criollo Morelos; Pc: *Phytophthora capsici*; Fo: *Fusarium oxysporum*; Rs: *Rhizoctonia solani*; ABCPE: Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad.

Genes de resistencia

El iniciador OpD04.717 indica la región del gen de resistencia *Phyto 5.2* contra el patógeno *Phytophthora capsici*, el cual muestra una banda de 717 pb aproximadamente (Quirin *et al.*, 1998), dicha banda solo se puede apreciar en los chiles: habanero y Criollo Morelos-344 (Figura 21, ANEXO 2), este resultado concuerda con lo observado en los Cuadros 9 y 11, en donde se muestra que este patógeno fue el más severo, y tuvo la capacidad de matar a los genotipos de chile Manzano, donde el Criollo Morelos fue el único sobreviviente. Castro *et al.* (2012) mencionan que *Phytophthora capsici* es el hongo más letal en cultivares del género *Capsicum* y que sólo la accesión

conocida como Criollo Morelos es el único chile que ha presentado resistencia hacia este patógeno.

Los marcadores At2, los cuales se encuentran asociados al alelo *I*, (responsable de conferir la resistencia a *Fusarium oxysporum* (Raza 0 y 1) muestra una región génica de 130 pb aproximadamente (Arens *et al.*, 2010). Como se puede observar en la Figura 22 (ANEXO 2), tanto híbridos y líneas progenitoras de chile Manzano presentan esta banda, sin embargo en el Cuadro 9 a *F. oxysporum* se le catalogó como moderadamente agresivo, por otra parte en el Cuadro 11 se mostró que la severidad disminuye a través del tiempo en algunos genotipos (“YOLI”, “DALI”, “MARUCA”, L8, L4, L2 y L1); a pesar de que los híbridos “JHOS” y “CLARIS” y los progenitores L7 y L3 presentan la banda, la cantidad de enfermedad acumulada (ABCPE) es estadísticamente mayor con respecto a “YOLI”, “DALI”, “MARUCA”, L8, L4, L2 y L1; y su comportamiento durante la evaluación de patogenicidad los catalogó como susceptibles.

1.4. CONCLUSIONES

Los híbridos y progenitores de chile Manzano, no obtuvieron el gen *Phyto 5.2* y mostraron susceptibilidad a *Phytophthora capsici*.

Todos los genotipos de chile Manzano mostraron tener el gen *I*; y los híbridos “YOLI”, “DALI” Y “MARUCA” presentaron resistencia al ataque de *F. oxysporum*, en contraste “CLARIS” Y “JHOS” que fueron susceptibles.

Todos los híbridos y progenitores de chile Manzano presentaron resistencia a *R. solani*.

1.5. LITERATURA CITADA

Anaya L., J. L., M. M. González C., E. Villordo P., R. Rodríguez G., R. Rodríguez M., R. G. Guevara G., L. Guevara O., V. Montero T. e I. Torres P. 2011. Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*. 2(3): 373-383.

Apodaca S., M. A., E. Zavaleta, M., S. Osada K., R. García E. y J. G. Venezuela U. 2004. Pudrición de la Corona del Chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(1):22-29.

Arens P., C. Mansilla, D. Deinum, L. Cavellini, A. Moretti, S. Rolland, H. van der Schoot, D. Calvache, F. Ponz, C. Collonnier, R. Mathis, D. Smilde, C. Caranta, and B. Vosman. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *TheorAppl Genet*. 120:655-664.

Campbell C., L. and L. V. Madden. 1990. *Introduction of Plant Diseases Epidemiology*. Jhon Willey and Sons Inc. 532 p.

Castro R., A.; S. P. Fernandez P. y P. Osuna A. 2012. Mecanismos de Defensa del Chile en el Patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA* 30:49-65.

Fernández M., C. 1983. *Phytophthora capsici* causante de la marchitez en pimiento (*Capsicum annum*) en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)*, 43(2):91-93.

Gallegly, M. and C. Hong. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathological Society. USA. 168p.

Garcés G., E., M. Orozco A., G. Rocío B., y H. Valencia. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*. 6(1):7-25.

García R., Ma. R., E. Chiquito A., P. D. Loeza L., H. Godoy H., E. Villordo P., J. L. Pons H., M. M. González C. y J. L. Anaya L. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre Criollo Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44: 701-709.

Giovannini C., N. Andrade, E. Valenzuela, I. Castro y A. Contreras. 2005. Caracterización morfológica y patogénica de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) provenientes de diferentes predios de la región X de Chile. *IDESIA (Chile)*. 23(1):13-18.

Glosier B., E. Ogundiwin, G. Sidhu, D. Sischo and J. Prince 2008. A differential series of Pepper (*Capsicum annum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica*. 162:23-30.

González I., Y. Arias, y B. Peteira. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*-tomate. *Rev. Protección Veg.* 27(1):1-7.

González P., E., M. J. Yañes M., V. Santiago S. y A. Montero, P. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzano, el verde, Puebla. Agrociencia. 38:635-661.

Madriz K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 3:22-32.

Nelson, P. E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M.E. Mace, A. A. Bell and C. H. Beckman (eds.). Fungal Wilt diseases of plants. Academic Press. New York. Pp. 51-80.

Nelson P., E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. In R. C. Ploetz (eds.). American Phytopathological Society Press. St. Paul. 37-35 pp.

Oelke L., P. Bosland and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annum*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 128:213-218.

Quirin E., A., A. E. Ogundiwin, P. J. Prince, M. O. Mazourek, M. Briggs, T. S. Chlanda, K. T. Kim, M. Falise, B. C. Kang and M. M. Jahn. 2005. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of *Phyto.5.2*, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in Pepper. TheorAppl Genet. 110:605-612.

Rahim A., A., and M. Sharif F. 1985. A study of Pepper Wilt in northeast Iraq. In: Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, MN, USA. 358p.

Rico G., L., S. Medina R., C. I. Muñoz S., L. Guevara, O., R. G. Guevara G., B. Z. Guerrero A., I. Torres P., R. Rodríguez G. y M. M. González C. 2003. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA 22(1): 1-6.

Sarath B., B., S. R. Pandrava, R. D. V. J. Prasada Rao, K. Anitha, S. K. Chakrabarty, and K. S. Varaprasad. 2011. Global sources of Pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. Crop Protection 30:389-400.

Sharma M., S. K. Gupta and T. R. Sharma. 2005. Characterization of Variability in *Rhizoctonia solani* by Using Morphological and Molecular Markers. J. Phytopathology. 153:449-456.

Velásquez V., R., M. M. Medina A. y J.J. Luna R. 2001. Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA 19(2): 175-181.

2. DISCUSIÓN GENERAL

Pruebas de patogenicidad

La agresividad mostrada hacia los genotipos de chile Manzano por los virus, muestra una elevada variabilidad en la incidencia y severidad. De acuerdo con el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad, la agresividad de los virus fitopatógenos se puede clasificar en tres grupos: 1) altamente agresivos (PMMoV), 2) moderadamente agresivos (PVY, CMV, TMV) y 3) ligeramente agresivos (TEV y TSWV). Esta agrupación difiere un poco con los reportes de Robles (2010) en donde menciona que cada uno de estos virus provoca daños y pérdidas del 60 al 100% en diferentes cultivares de *Capsicum annuum*. Debido a la agrupación mostrada se puede considerar que los genotipos de chiles en la interacción de PMMoV son susceptibles; a la interacción con PVY, CMV, TMV resultan ser tolerantes y en la interacción con TEV y TSWV son resistentes.

No obstante, existen algunas particularidades en diferentes interacciones como: “DALI”, junto con uno de sus progenitores (L1) los cuales presentaron una ABCPE y también fueron negativos a la presencia de este virus en la prueba de ELISA, por lo que se catalogan como resistentes a TMV.

Para la interacción con el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), sobresalen los híbridos “DALI” y “MARUCA” ya que su ABCPE es inferior a la de los demás híbridos (“YOLI”, “CLARIS” y “JHOS”); “DALI” y “MARUCA”, junto con los progenitores L8, L7, L4, L2 y L1 son resistentes a la enfermedad provocada por el TSWV, mientras que “YOLI”, “JHOS”, “CLARIS” y el progenitor L3 resultan ser tolerantes.

La agresividad mostrada por los tres hongos, según sus ABCPE muestra tres agrupaciones: 1) altamente agresivos (*Phytophthora capsici*), 2) moderadamente agresivo (*Fusarium oxysporum*) y 3) ligeramente agresivo (*Rhizoctonia solani*).

Phytophthora capsici fue altamente agresivo en los genotipos de chile Manzano, fue la más rápida en alcanzar un alto nivel de enfermedad, e incluso tuvo la capacidad de provocar la muerte de dichos genotipos. Probablemente se deba a que el gen de Avirulencia de *P. capsici*, no es reconocido por los genotipos de chile Manzano lo que conlleva a la susceptibilidad (Madriz, 2002).

La severidad de *Fusarium oxysporum* aumenta de manera paulatina debido a las barreras que debe superar al momento de colonizar la raíz de la planta. “YOLI”, “DALI” y “MARUCA” junto con los progenitores L8, L4, L2 y L1, presentaron una reducción de daño, catalogándoseles como resistentes. Este efecto de disminución tal vez fue provocado porque la invasión de *Fusarium* al tejido vascular (Nelson, 1990) fue detenida por la obstrucción de este mismo sistema a través de geles (Garcés *et al.*, 2001; González *et al.*, 2012).

Para el caso de *Rhizoctonia solani* la mayoría de los genotipos presentaron una disminución en el porcentaje de daño causado, probablemente se debe a que los signos de esta enfermedad se localizan en la unión de la raíz principal con las raíces secundarias, dicha situación pudiese provocar el estímulo de producir nuevas raíces como acción de defensa (Velázquez *et al.*, 2001).

Genes de resistencia

Los iniciadores con clave CSO amplifican para el alelo *Pvr4* y se considera que confiere resistencia para todos los patotipos del Virus Y de la Papa; este iniciador muestra una banda de 458 pb aproximadamente (Caranta *et al.*, 1999). Dicha banda se encuentra presente en las líneas progenitoras (L8, L7, L4, L3, L2 y L1) y en los cinco híbridos estudiados de Chile Manzano (“MARUCA”, “JHOS”, “DALI”, “CLARIS” y “YOLI”) por lo que se consideran genotipos tolerantes al ataque de PVY.

El alelo responsable de la resistencia al virus de la marchitez manchada del tomate es conocido como *Tsw*, para este alelo se utilizaron cuatro iniciadores: OPAC10, OPAH13, OPAF16 y OPB01, y presentaron una banda de aproximadamente 593, 800, 250 y 750 pb, respectivamente. El iniciador SCAC568 presenta una banda de 568pb aproximadamente, con un comportamiento codominante (Moury *et al.*, 2000). En los genotipos de Chile Manzano sólo se presentan las bandas reportadas con los iniciadores: OPAC 10, OPAF 13 y SCAC 568. Sin embargo, el híbrido “CLARIS” (L3XL8) no muestra la banda correspondiente de OPAC10; el cual está directamente asociado al gen *Tsw* (Moury *et al.*, 2000). Aunque “YOLI” y “JHOS” presentaron las bandas de los marcadores de gen de resistencia, cuentan con la presencia de TSWV positiva y fueron los que mayor cantidad de enfermedad acumularon. Este efecto puede ser explicado por una lenta respuesta del gen de resistencia o una inhibición de éste (Madriz, 2002).

Los genes que confieren resistencia al virus mosaico de tomate (ToMV) son conocidas como *Tm-1*, *Tm-2* y *Tm-2²* (Ohmori *et al.*, 1996). Tanto en los híbridos (“MARUCA”, “JHOS”, “DALI”, “CLARIS” y “YOLI”) como en las líneas progenitoras (L8, L7, L4, L3, L2

y L1) de chile Manzano no se encontró banda de resistencia (1400 pb) para el gen *Tm-1*. Pero sí presentan una banda de resistencia para el alelo *Tm-2²* (214pb) y una de susceptibilidad para *Tm-2* y debido a que este par de alelos tienen una relación codominante, es de esperarse que el virus en la planta provoque síntomas típicos de una enfermedad vírica (prueba no realizada), sin que éstos lleguen a afectar en gran medida a los genotipos de chile Manzano. Por otra parte debido a la asociación que existe entre el ToMV y TMV, cabe la posibilidad de que los genes encargados de conferir la resistencia a ToMV sirven en contra de TMV (Lanfermeijer *et al.*, 2003).

Para el caso del virus moteado suave del chile (PMMoV) se tiene un registro de un gen responsable de la resistencia hacia este virus, el cual fue identificado como L³ (Tsuda *et al.*, 1998). Este iniciador muestra una banda con 717 pb, la cual no se encontró en ningún genotipo de chile evaluado, por lo que son susceptibles a este virus.

El iniciador OpD04.717 indica la región del gen de resistencia (*Phyto 5.2*) contra el patógeno *Phytophthora capsici*, el cual muestra una banda de 717 pb aproximadamente (Quirin *et al.*, 1998), dicha banda resulta ausente en los genotipos de chile Manzano.

Los marcadores At2, los cuales se encuentran asociados a la resistencia a *Fusarium oxysporum* (Raza 0 y 1), los cuales muestran una banda de 130 pb aproximadamente (Arens *et al.*, 2010), dicha banda está presente tanto en híbridos (“MARUCA”, “JHOS”, “DALI”, “CLARIS” y “YOLI”) y líneas progenitoras (L8, L7, L4, L3, L2 y L1) de chile Manzano.

3. CONCLUSIONES GENERALES

El híbrido “DALI” y la línea progenitora L1 presentaron resistencia a la enfermedad provocada por TMV; mientras que los híbridos “MARUCA”, “JHOS”, “CLARIS” y “YOLI” así como las líneas progenitoras (L2, L3, L4, L7 y L8) presentaron tolerancia.

Los híbridos “DALI” Y “MARUCA” y los progenitores L1, L2, L4, L7 y L8 son resistentes a TSWV, y los demás genotipos (“JHOS”, “CLARIS”“YOLI” y L3) presentaron tolerancia.

Los híbridos “MARUCA”, “DALI”, “JHOS”, “YOLI” y “CLARIS”, junto con sus líneas progenitoras L2, L3, L4, L7 Y L8 de chile Manzano son resistentes a TEV; y tolerantes a PVY y CMV. Pero susceptibles a la enfermedad causada por el PMMoV.

Los cinco híbridos de chile Manzano evaluados (“MARUCA”, “DALI”, “JHOS”, “CLARIS” y “YOLI”) y las líneas progenitoras (L1, L2, L3, L4, L7 Y L8), presentaron bandas de resistencia para PVY, TSWV y TMoV; en el caso del PMMoV no se presentó banda alguna.

Los híbridos y progenitores de chile Manzano, no obtuvieron el gen *Phyto 5.2* y mostraron susceptibilidad a *Phytophthora capsici*.

Todos los genotipos de chile Manzano mostraron tener el gen *I*; y los híbridos “YOLI”, “DALI” Y “MARUCA” presentaron resistencia al ataque de *F. oxysporum*, en contraste “CLARIS” Y “JHOS” que fueron susceptibles.

Todos los híbridos y progenitores de chile Manzano presentaron resistencia a *R. solani*.

4. LITERARURA CITADA GENERAL

Adkins, S. 2003. *Tomato spotted wilt virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS. pp. 39-40

Agrios, G. N. 2004. Fitopatología. Traductor: Manuel Guzmán Ortiz. Segunda Edición. LIMUSA. 838 p.

Anaya L., J. L., M. M. González C., E. Villordo P., R. Rodríguez G., R. Rodríguez M., R. G. Guevara G., L. Guevara O., V. Montero T. e I. Torres P. 2011. Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. Revista Mexicana Ciencias Agrícolas. 2(3): 373-383.

Apodaca S., M. A., E. Zavaleta, M., S. Osada K., R. García E. y J. G. Venezuela U. 2004. Pudrición de la Corona del Chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 22(1):22-29.

Arens, P.; C. Mansilla; D. Deinum; L. Cavellini; A. Moretti; S. Rolland; H. van der Schoot; D. Calvache; F. Ponz; C. Collonnier; R. Mathis; D. Smilde; C. Caranta and B. Vosman. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. TheorAppl Genet. 120: 655-664.

Astier, S., J. Albouuy, Y. Maury, C. Robaglia and H. Lecoc. 2006. Principles of plant virology; genome pathogenicity, virus ecology. First Edition. Science Publishers. 472 p.

Campbell, C. L. and V. Madden, L. 1990. Introduction of Plant Diseases Epidemiology. Jhon Willey and Sons Inc. 532 p.

Caranta, C., A. Thabuis and Palloix. 1999. Development of a CAPS marker for the Pvr4 locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in Pepper. Genome. 42:1111-1116.

Castro R., A.; S. P. Fernandez P. y P. Osuna A. 2012. Mecanismos de Defensa del Chile en el Pato sistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA 30:49-65.

Eskridge, K. M. 1995. Statistical Analysis of Disease Reaction Data Using Nonparametric Methods. HortScience. 30(3): 478-480.

Espinosa, T. L. E., M. Pérez G., M. T. Martínez D., R. Castro B. y G. Barrios P. 2010. "Efecto de empaques y temperaturas de almacenamiento de chile Manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz y Pavón)". Revista Chapingo Serie Horticultura. 16(2). pp. 115-121.

Fernández M., C. 1983. *Phytophthora capsici* causante de la marchitez en pimiento (*Capsicum annum*) en Chile. Agricultura Técnica (Chile), 43(2):91-93.

Gallegly, M. and C. Hong. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathological Society. USA. 168p.

Garcés G., E., M. Orozco A., G. Rocío B., y H. Valencia. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana. 6(1):7-25.

García R., Ma. R., E. Chiquito A., P. D. Loeza L., H. Godoy H., E. Villordo P., J. L. Pons H., M. M. González C. y J. L. Anaya L. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre Criollo Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. Agrociencia 44: 701-709.

García, A. F. and Bruce A. McDonald. 2003. An Analysis of the Durability of Resistance to Plant Virus. Phytopathology- 93(8):941-9523

Giovannini C., N. Andrade, E. Valenzuela, I. Castro y A. Contreras. 2005. Caracterización morfológica y patogénica de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) provenientes de diferentes predios de la región X de Chile. IDESIA (Chile). 23(1):13-18.

Glosier B., E. Ogundiwin, G. Sidhu, D. Sischo and J. Prince 2008. A differential series of Pepper (*Capsicum annum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica. 162:23-30.

González I., Y. Arias, y B. Peteira. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*-tomate. Rev. Protección Veg. 27(1):1-7.

González P., E., M. J. Yañes M., V. Santiago S. y A. Montero, P. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzano, el verde, Puebla. Agrociencia. 38:635-661.

Green, S. K. 2003. *Pepper mild mottle virus*. Compendium of Pepper diseases. APS PRESS. pp. 32-33

Horsfall, J. C., and S. Barrat R. 1945. An Improved trading system for measuring plant disease. Phytopathology 35:655.

Lanfermeijer, F. C., Dijkhuij, J., Sturre, M. J. C., de Hann, P. and Hille Jacques. 2003. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2² from *Lycopersicon esculentum*. Plant Molecular Biology. 52:1037-1049.

Madriz K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 3:22-32.

Moury, B., S. Pflieger, V. Blattes, V. Lefebvre and A. Palloix, 2000. A CAPS marker to assist selection of tomato Spotted Wilt virus (TSWV) resistance in Pepper. Genome. 43:137-142.

Nelson, P. E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M.E. Mace, A. A. Bell and C. H. Beckman (eds.). Fungal Wilt diseases of plants. Academic Press. New York. Pp. 51-80.

Nelson, P. E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. In R. C. Ploetz (eds.). American Phytopathological Society Press. St. Paul. 37-35 pp.

Nuez, V. F., R. Gil, O. y J. Costa, G. 1996. El cultivo de pimientos chiles y ajies: Enfermedades Producidas por virus y micoplasmas. Mundi Prensa. pp. 249-313.

Oelke L., P. Bosland and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annum*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 128:213-218.

Ohmori, T., Murata M. and Motoyoshi F. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. TheorAppl Genet. 92:151-156.

Pérez, G. M. y R. Castro B. 2012. El chile manzano. Segunda reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. P. 128.

Pérez, M. L. y E. Rico J. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el Estado de Guanajuato. Universidad de Guanajuato. 143 p.

Quirin E., A., A. E. Ogundiwin, P. J. Prince, M. O. Mazourek, M. Briggs, T. S. Chlanda, K. T. Kim, M. Falise, B. C. Kang and M. M. Jahn. 2005. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of *Phyto.5.2*, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in Pepper. TheorAppl Genet. 110:605-612.

Rahim A., A., and M. Sharif F. 1985. A study of Pepper Wilt in northeast Iraq. In: Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, MN, USA. 358p.

Reddick, B. B. 2003. *Tobacco etch virus*. Compendium of Pepper diseases. APS PRESS. p 38.

Rico G., L., S. Medina R., C. I. Muñoz S., L. Guevara, O., R. G. Guevara G., B. Z. Guerrero A., I. Torres P., R. Rodríguez G. y M. M. González C. 2003. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA 22(1): 1-6.

Robles, H. L., A. C. González F., E. M. Gill L., L. Pérez, M. y J. C. López D. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. TECNOCENCIA Chihuahua. 2:IV. pp. 72-86.

Santos, H. A. e R. Goto. 2004. Exertia em plantas de pimentão no controle da murcha de fitófтора em ambiente protegido. Hort. Bras. 22:45-49.

Sarath B., B., S. R. Pandrava, R. D. V. J. Prasada Rao, K. Anitha, S. K. Chakrabarty, and K. S. Varaprasad. 2011. Global sources of Pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. Crop Protection 30:389-400.

Scheirer, C. J., S. Ray, W. and N. Hare. 1976. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. Biometrics 21:429-434.

Sepúlveda, J. G., H. Porta, D. y M. Rocha, S. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 31(03):355-363.

Sharma M., S. K. Gupta and T. R. Sharma. 2005. Characterization of Variability in *Rhizoctonia solani* by Using Morphological and Molecular Markers. J. Phytopathology. 153:449-456.

Tsuda, S., M. Kirita, and Y. Watanabe. 1998. Characterization of a Pepper Mild Mottle Tobamovirus Strain Capable of overcoming the L3 Gene-Mediated Resistance, Distinct from the Resistance-Breaking Italian Insolate. Molecular Plant-Microbe Interactions. 11(4): 327-331.

Velásquez V., R., M. M. Medina A. y J.J. Luna R. 2001. Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA 19(2): 175-181.

5. ANEXO 1

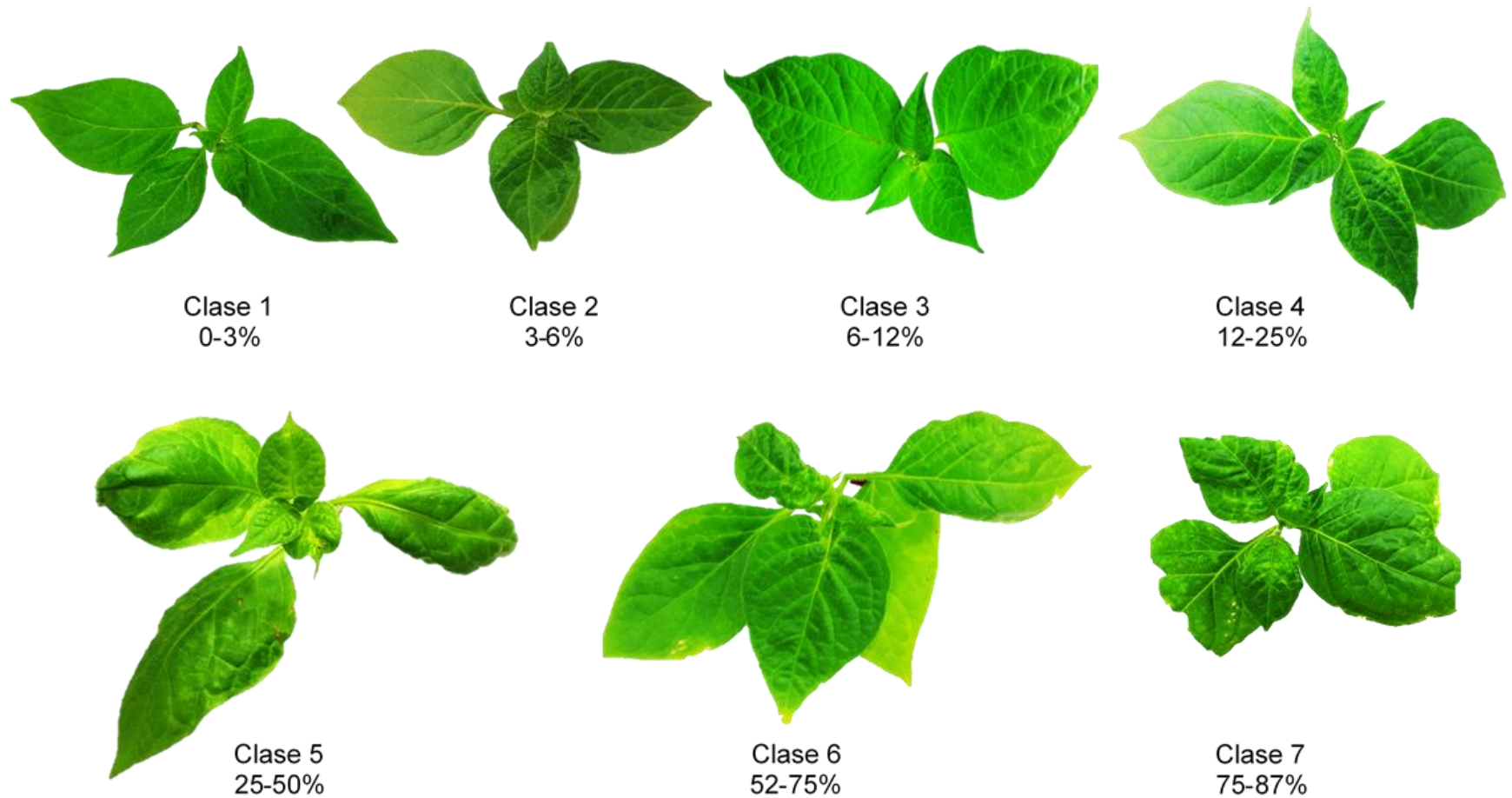


Figura 2. Escala visual de síntomas causados por PVY en chile Manzano.

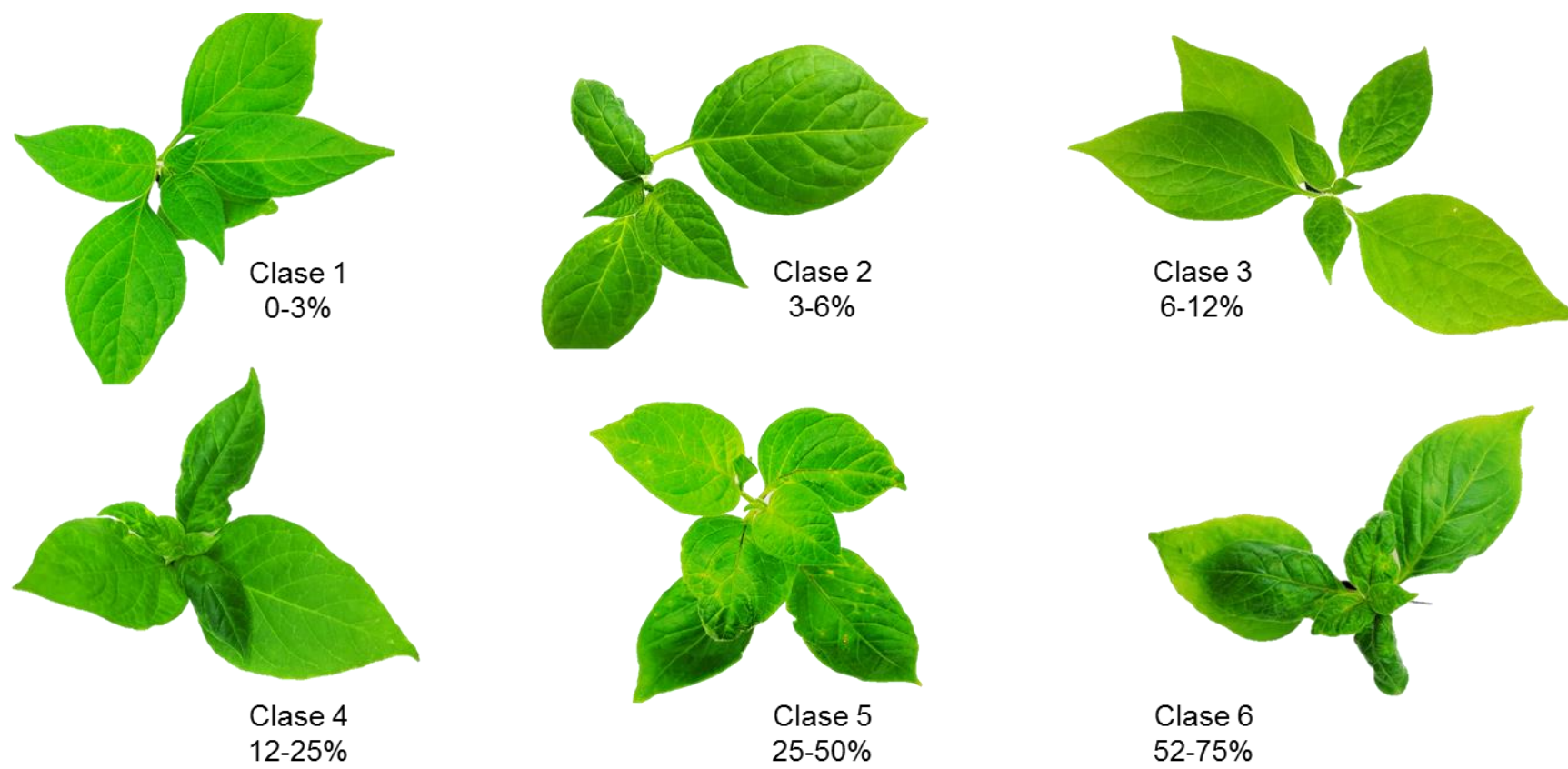


Figura 3. Escala visual de síntomas **causados por** CMV en chile Manzano.

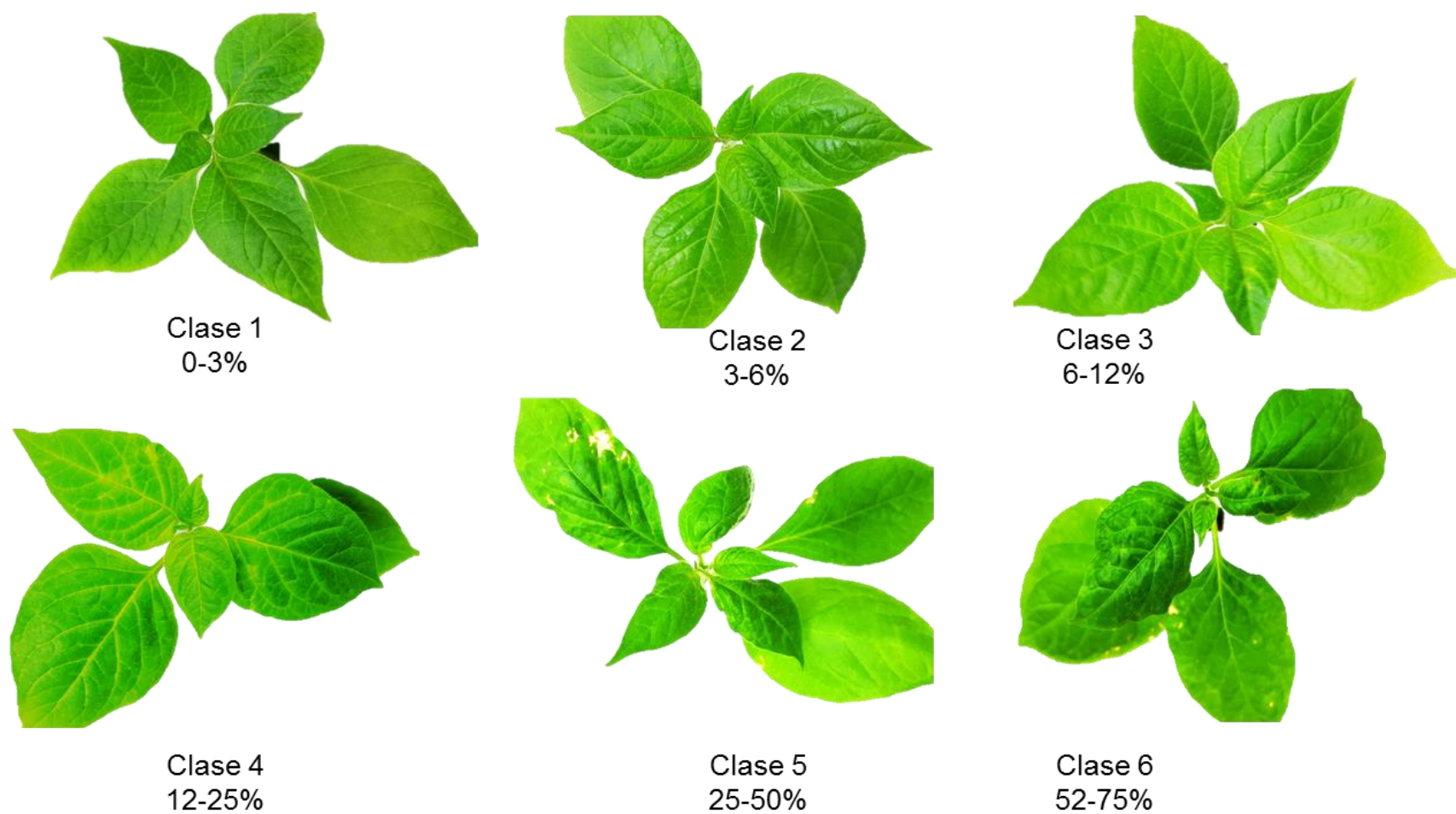


Figura 4. Escala visual de síntomas **causados por** TMV en chile Manzano.

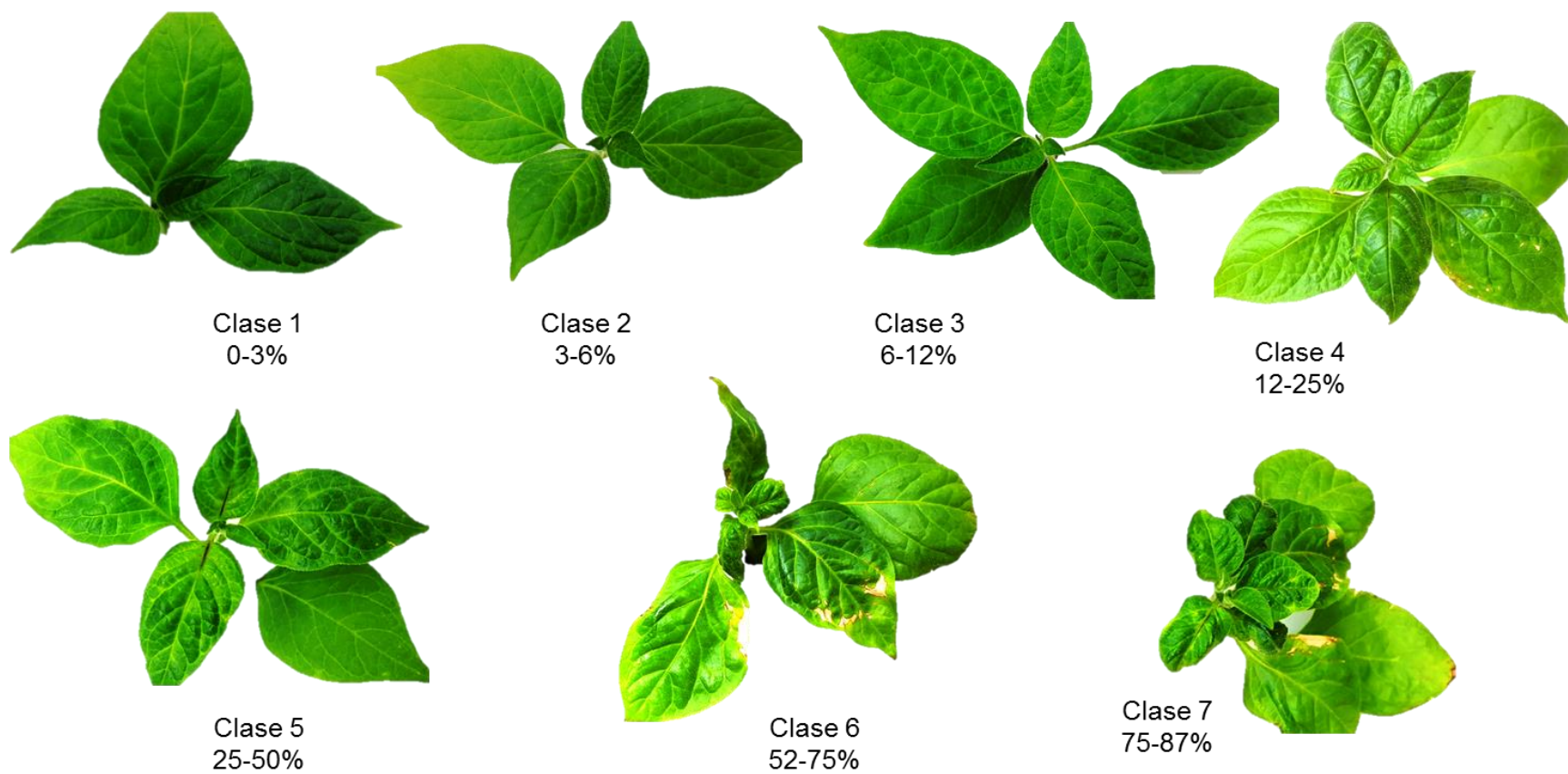
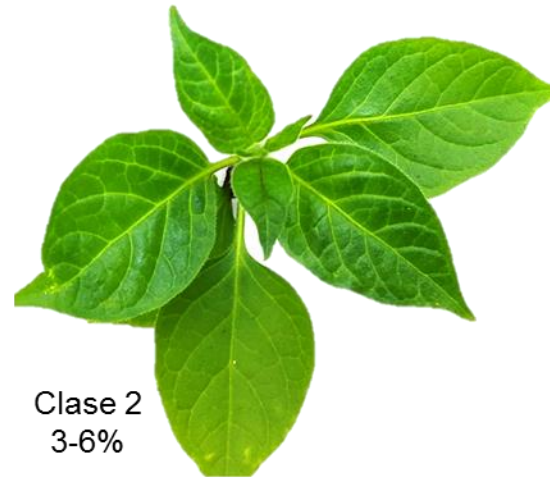


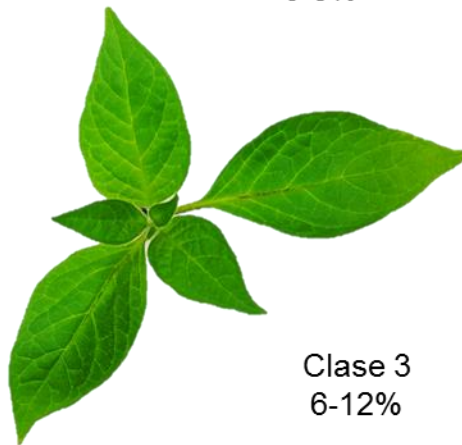
Figura 5. Escala visual de síntomas **causados por** PMMoV en Chile Manzano.



Clase 1
0-3%



Clase 2
3-6%



Clase 3
6-12%



Clase 4
12-25%

Figura 6. Escala visual de síntomas **causadospor** TEV en chile Manzano.

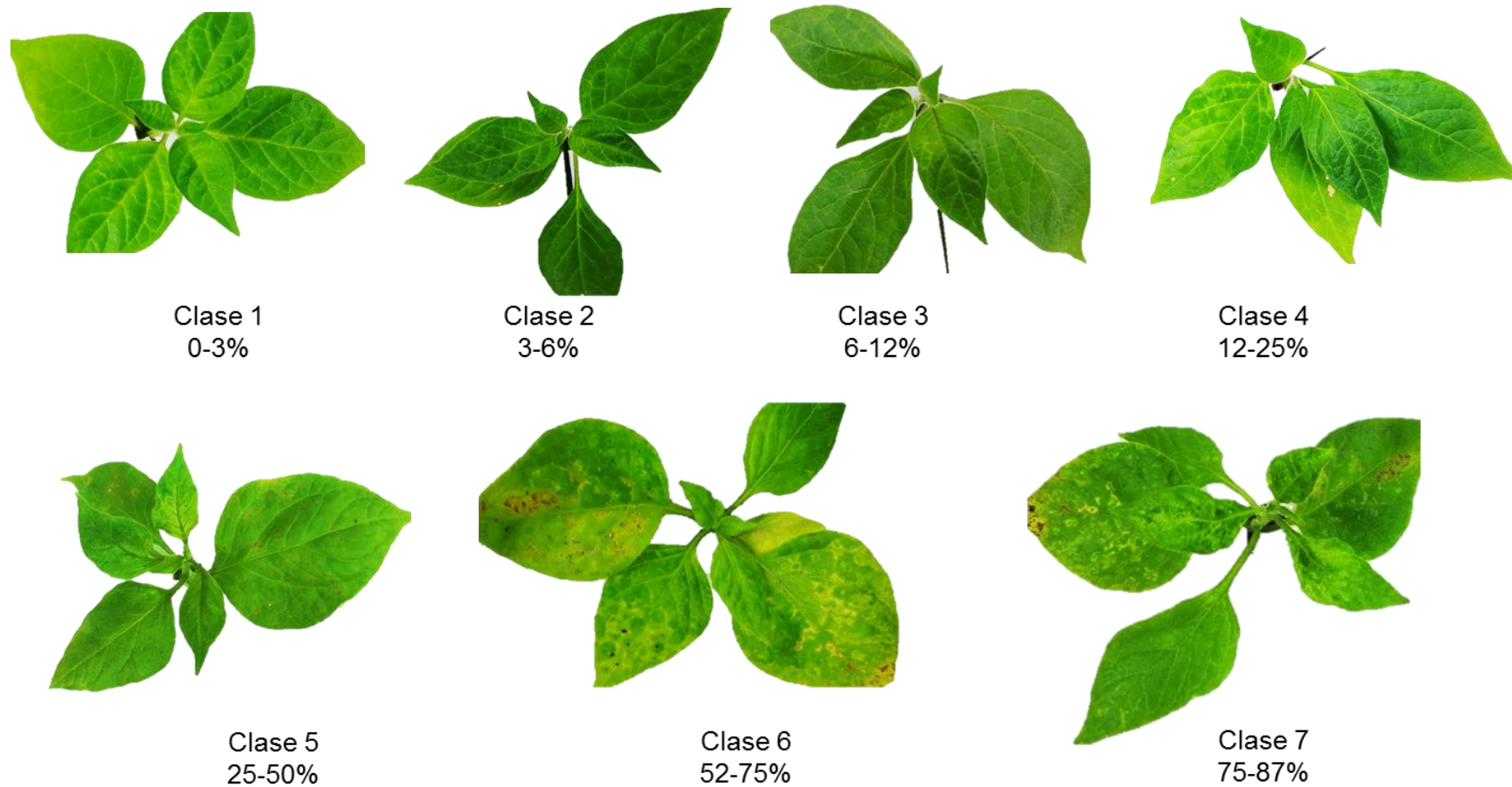


Figura 7. Escala visual de daño mostrando porcentaje de síntomas causados por TSWV en chile Manzano.

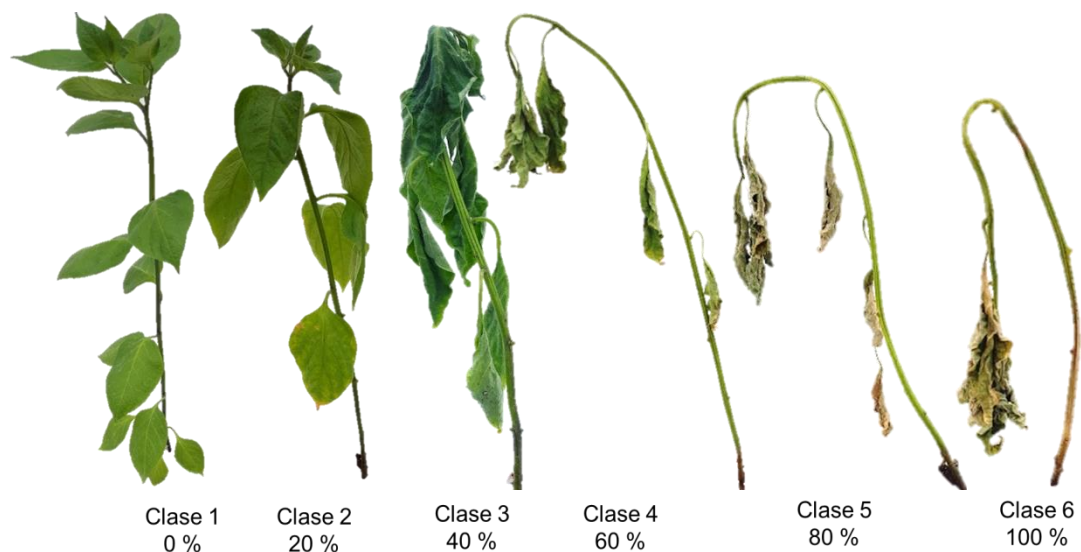


Figura 8. Escala visual de síntomas causados por *Phytophthora capsici* en Chile. Manzano representado por una marchitez.

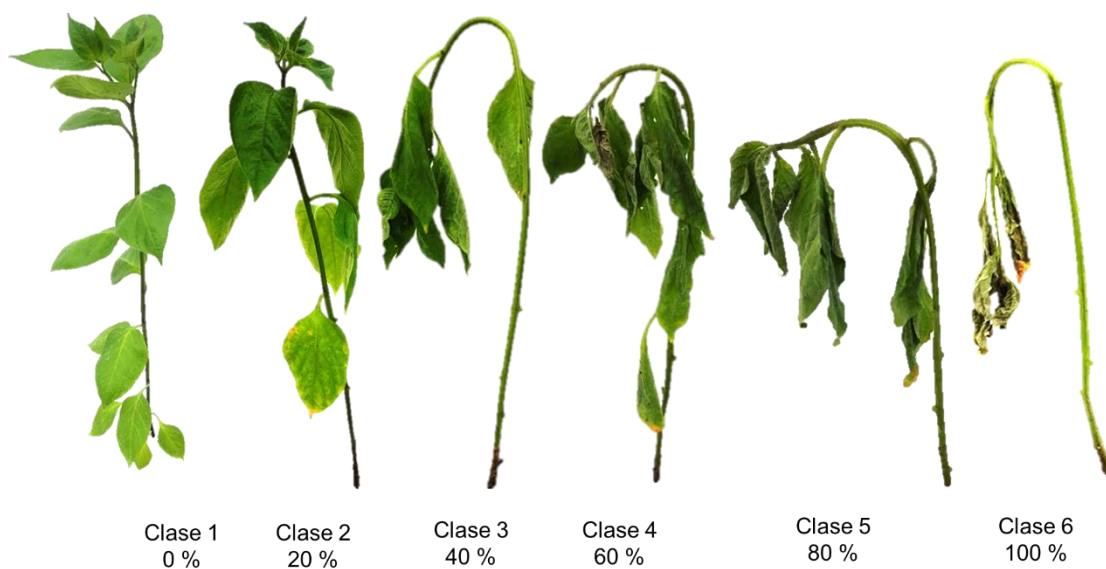


Figura 9. Escala visual de síntomas causados por *Rhizoctonia solani* en Chile. Manzano representado por una marchitez.

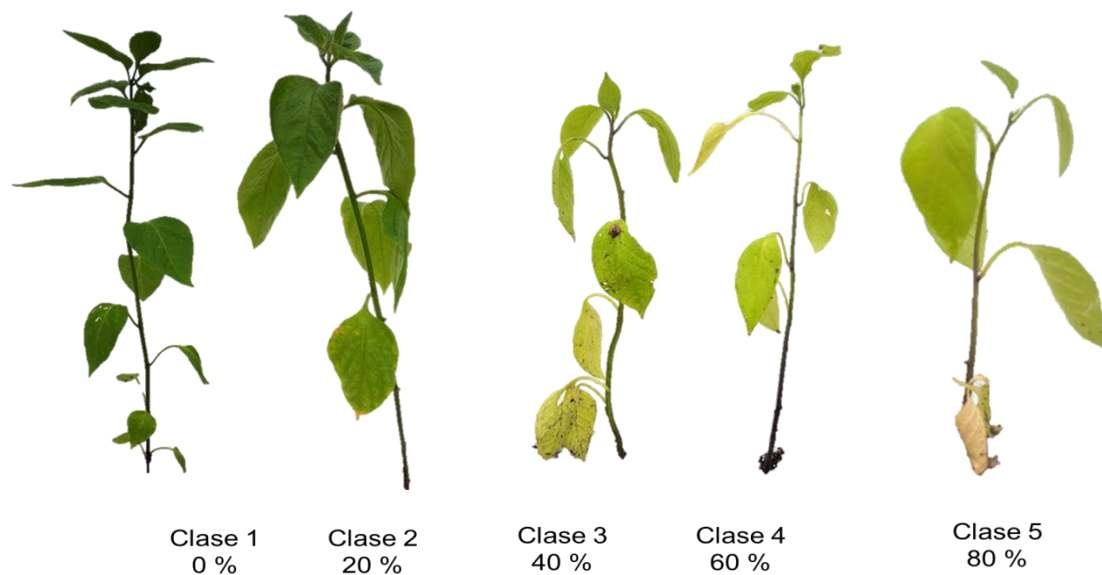


Figura 10. Escala visual de síntomas causados por *Fusarium oxysporum* en chile Manzano representado por una marchitez.

6. ANEXO 2

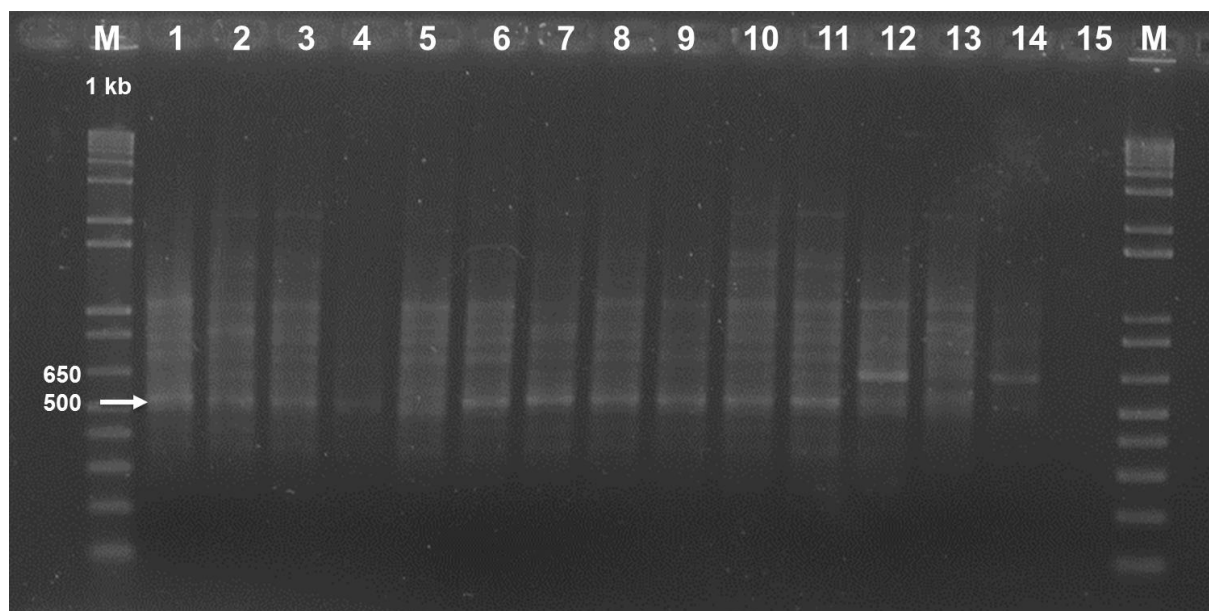


Figura 11. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador CSO. Flecha indica la banda amplificada de importancia (458 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

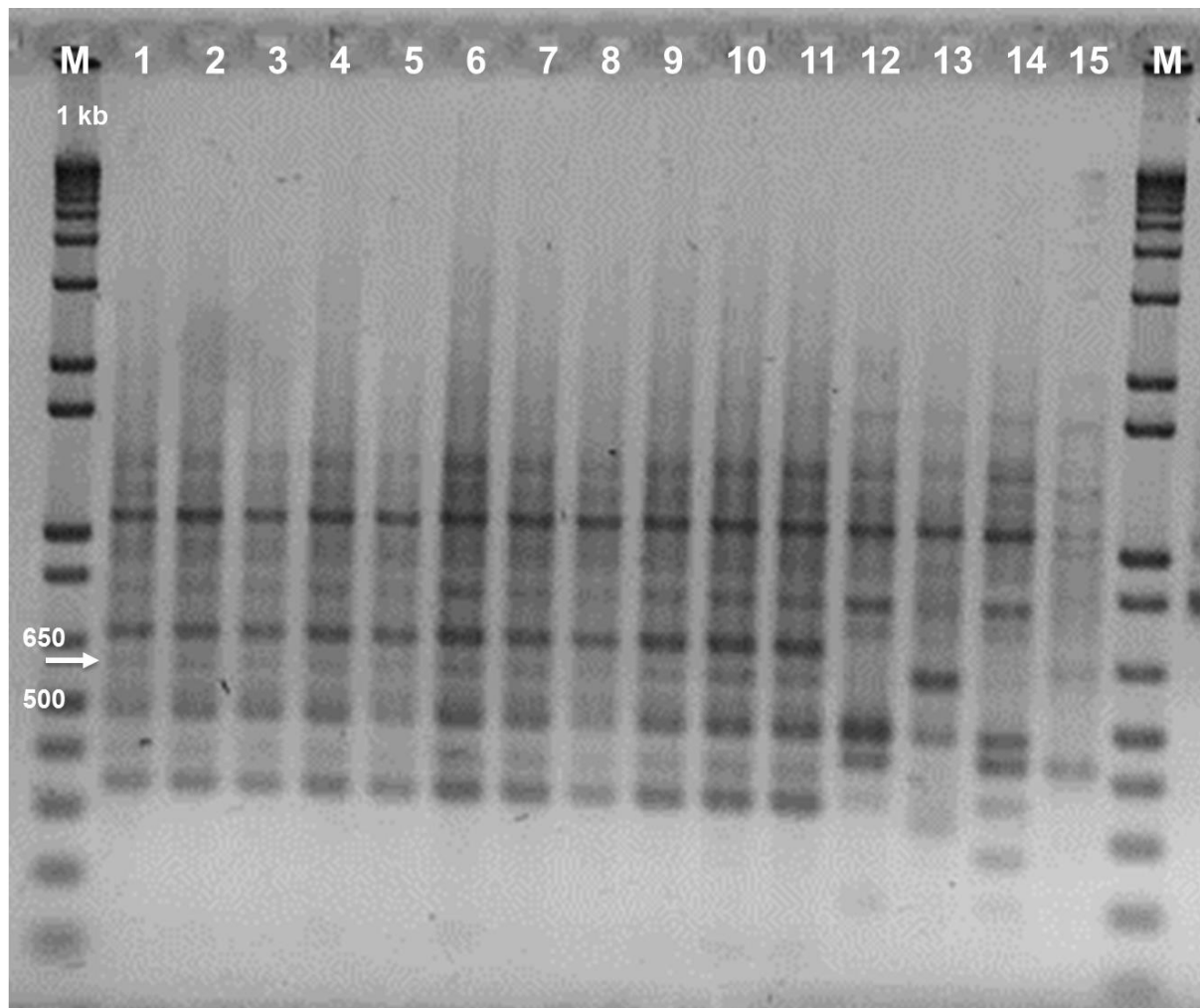


Figura 12. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPAC10. Flecha indica la banda amplificada de importancia (593 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

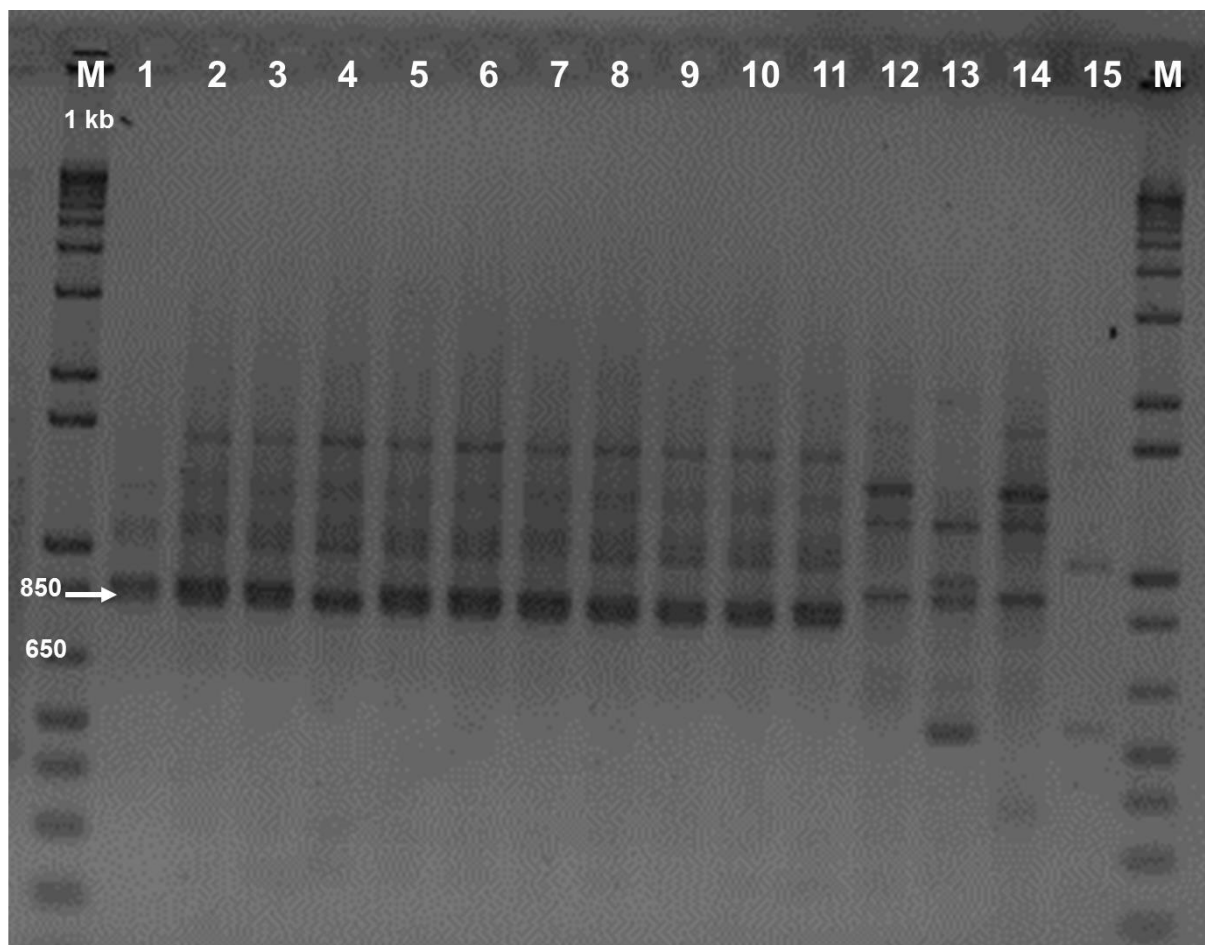


Figura 13. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPAH13. Flecha indica la banda amplificada de importancia (800 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

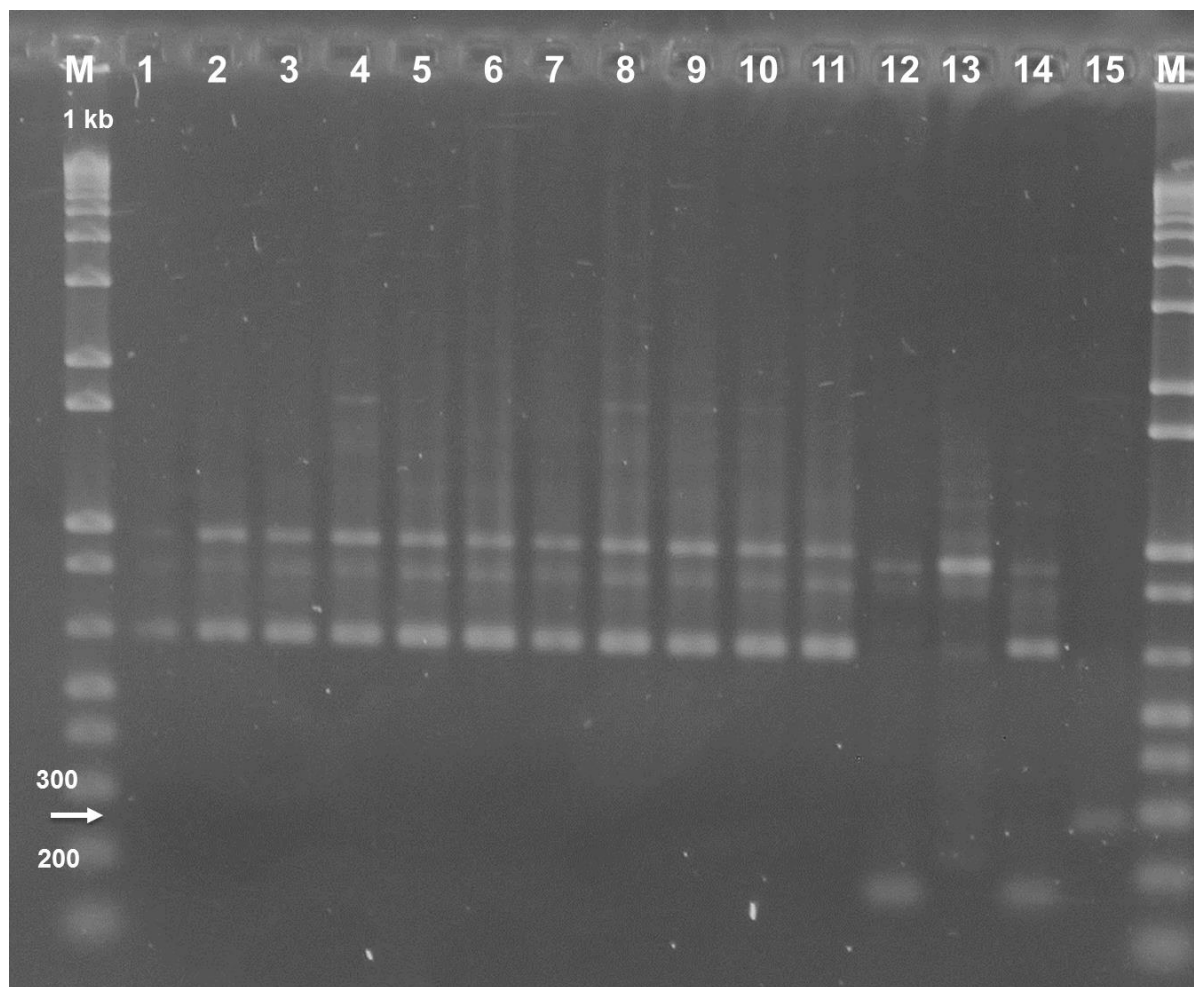


Figura 14. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPAF16. Flecha indica la banda amplificada de importancia (250 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

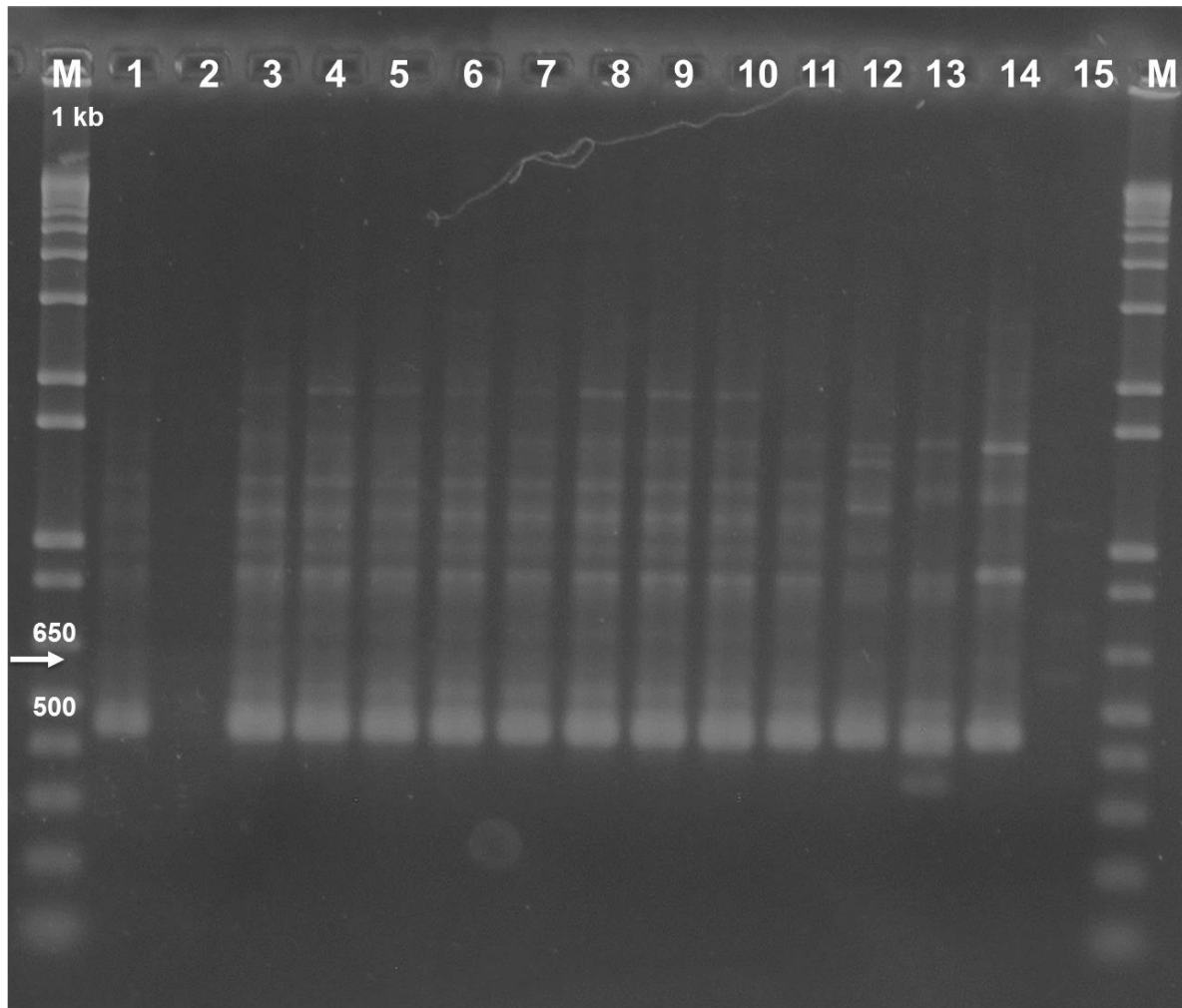


Figura 15. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OPB01. Flecha indica la banda amplificada de importancia (750 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

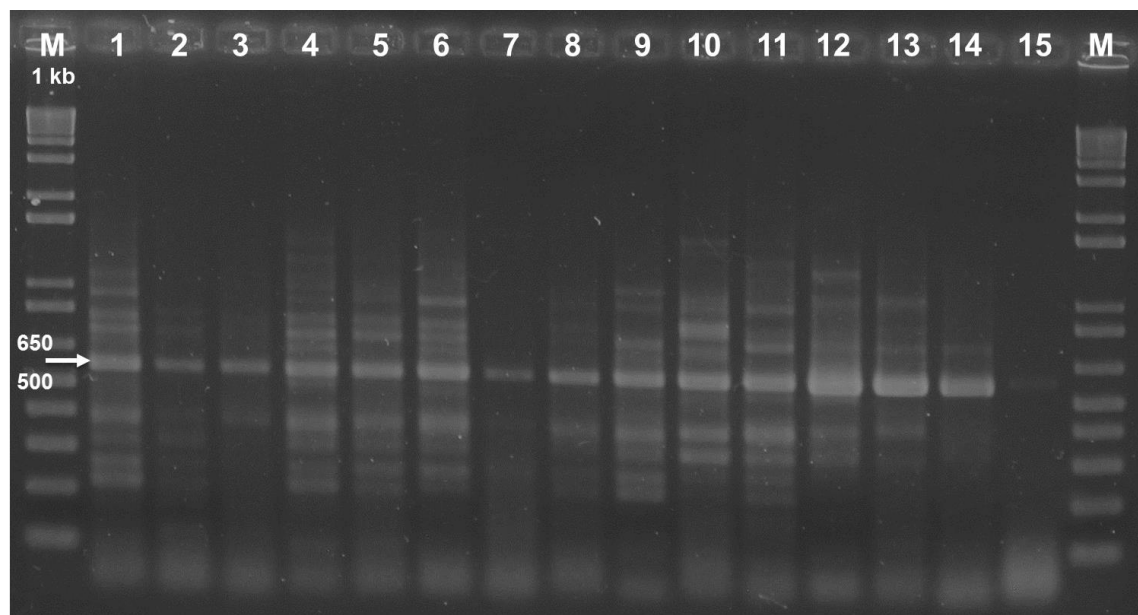


Figura 16. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador SCAC. Flecha indica la banda amplificada de importancia (750 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

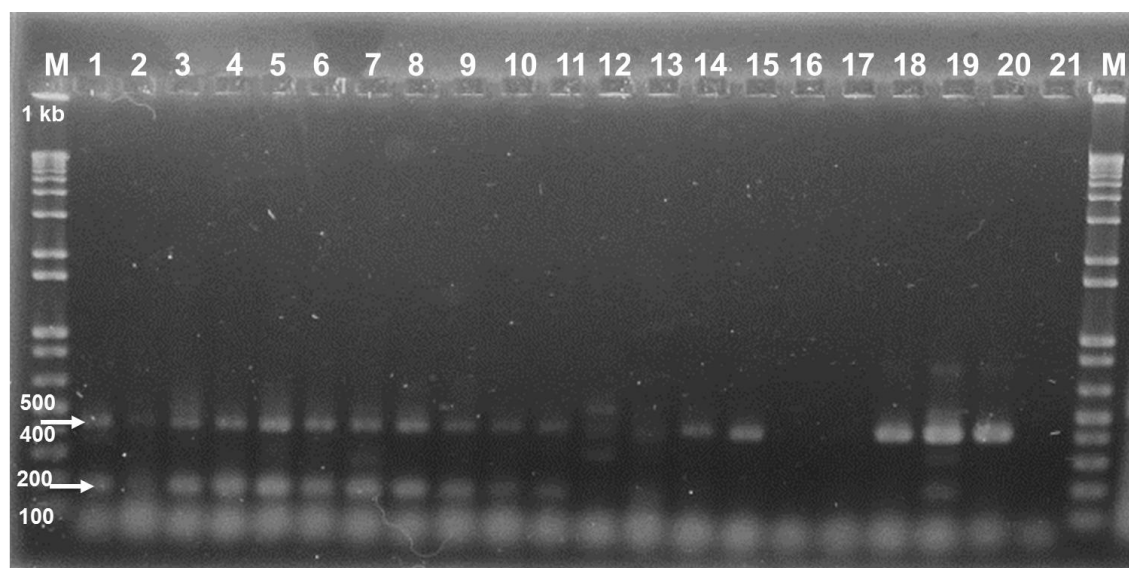


Figura 17. Electroforesis de gel de agarosa para los iniciadores SNF 20 y TMV-2262. Flechas indican las bandas amplificadas de importancia (417 y 214 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: Cuauhtémoc, 16: Espartaco, 17: Moctezuma, 18: Aquiles, 19: Mermaid, 20: El Cid, T21: BLANCO.

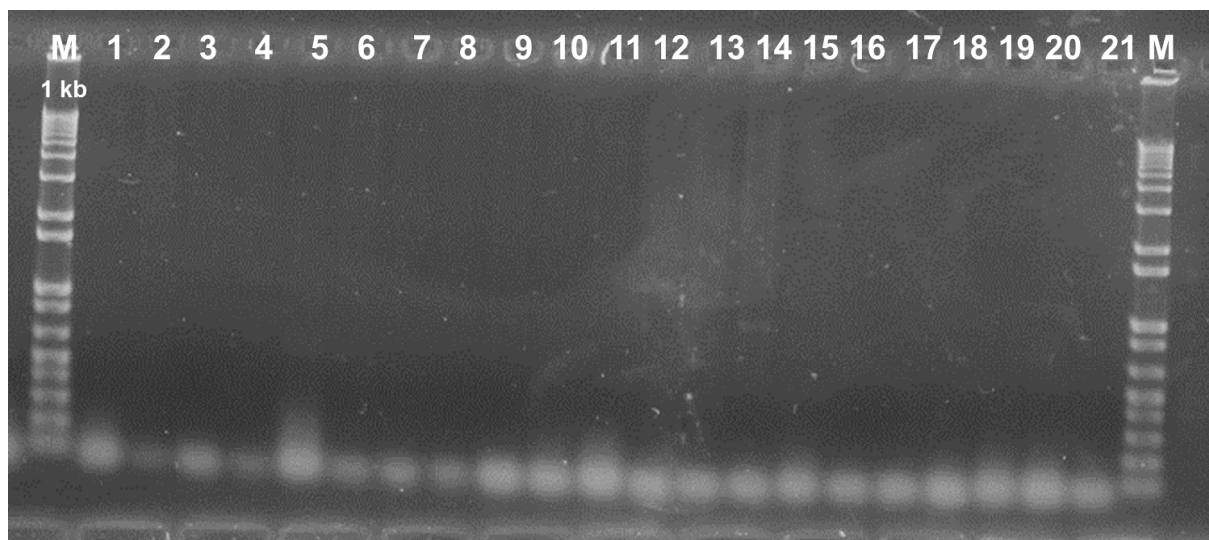


Figura 18. Electroforesis de gel de agarosa para los iniciadores TM2²-SNP 2494. Banda no encontrada. 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: Cuauhtémoc, 16: Espartaco, 17: Moctezuma, 18: Aquiles, 19: Mermaid, 20: El Cid, T21: BLANCO.

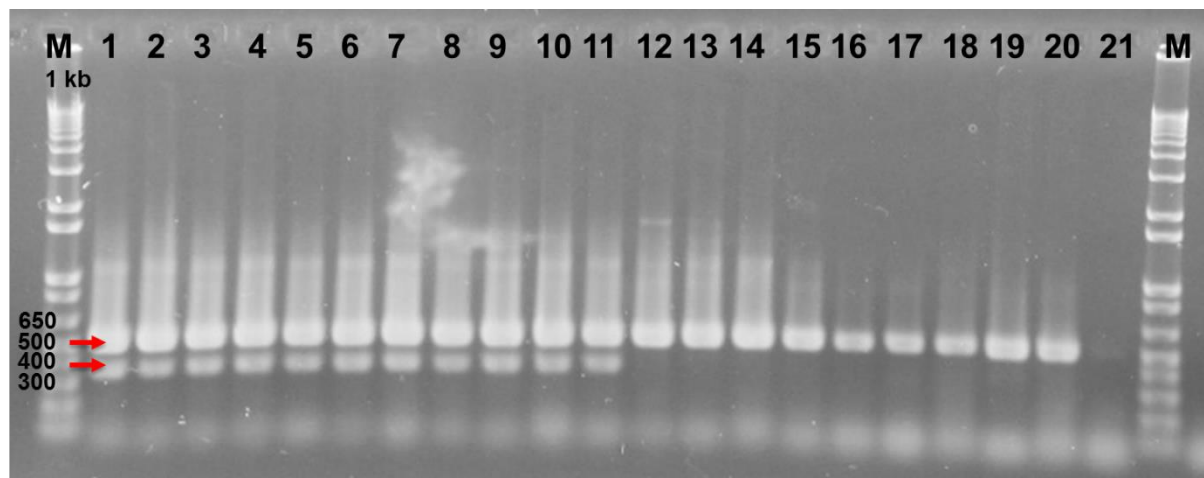


Figura 19. Electroforesis de gel de agarosa para los iniciadores TM2-748. Flechas indican las bandas amplificadas de importancia (509 y 382 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: Cuauhtémoc, 16: Espartaco, 17: Moctezuma, 18: Aquiles, 19: Mermaid, 20: El Cid, T21: BLANCO.

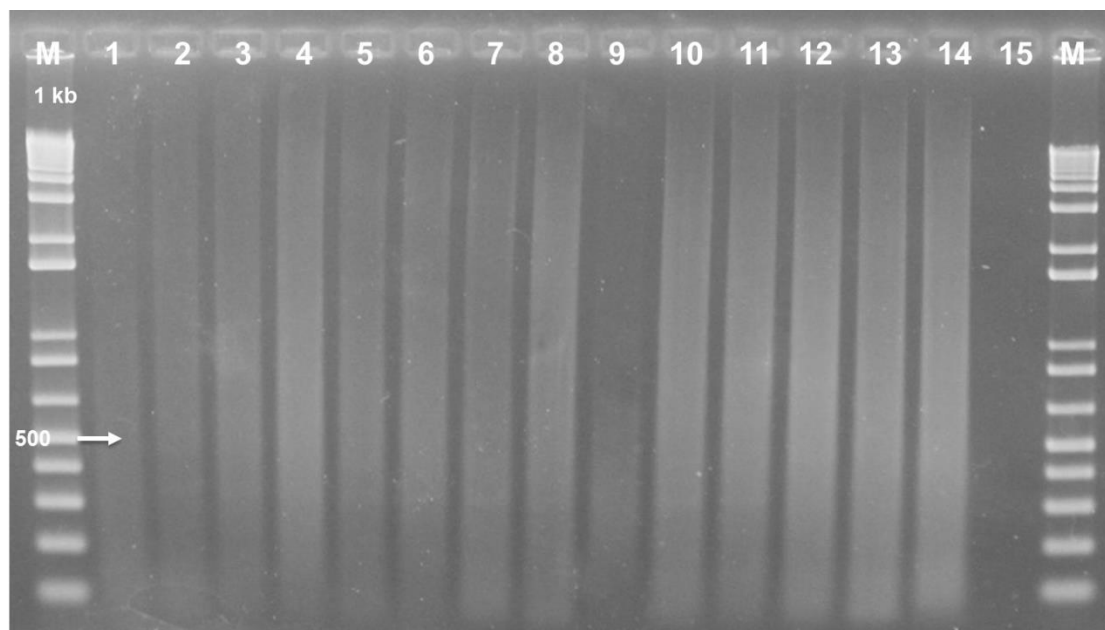


Figura 20. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador PMMoV-J. Flecha indica la posición de la banda esperada (500 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

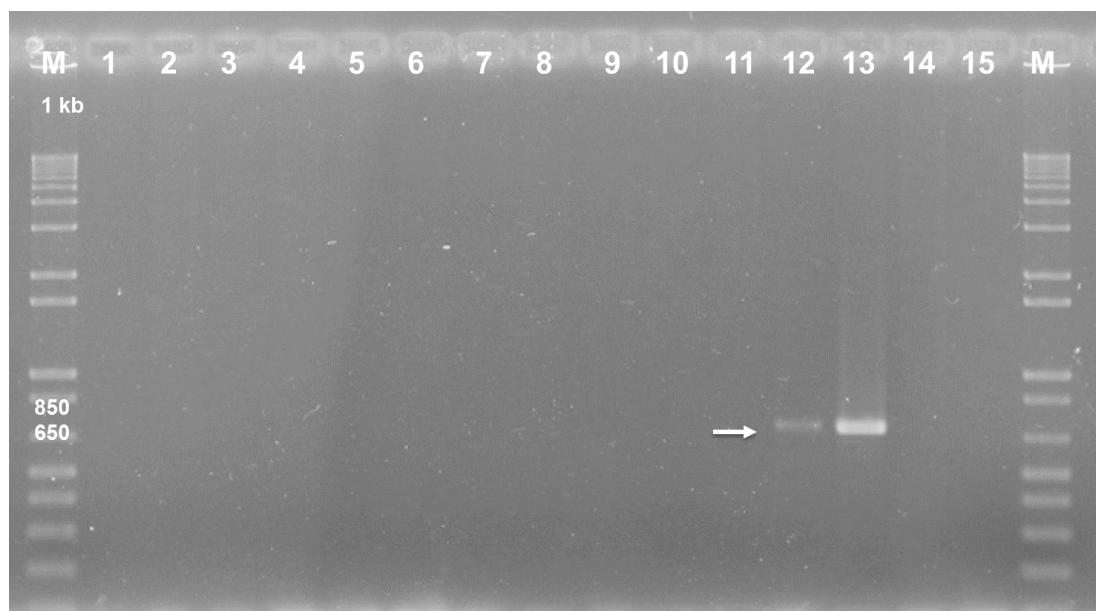


Figura 21. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador OpD04.717. Flecha indica la banda amplificada de importancia (717 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: BLANCO.

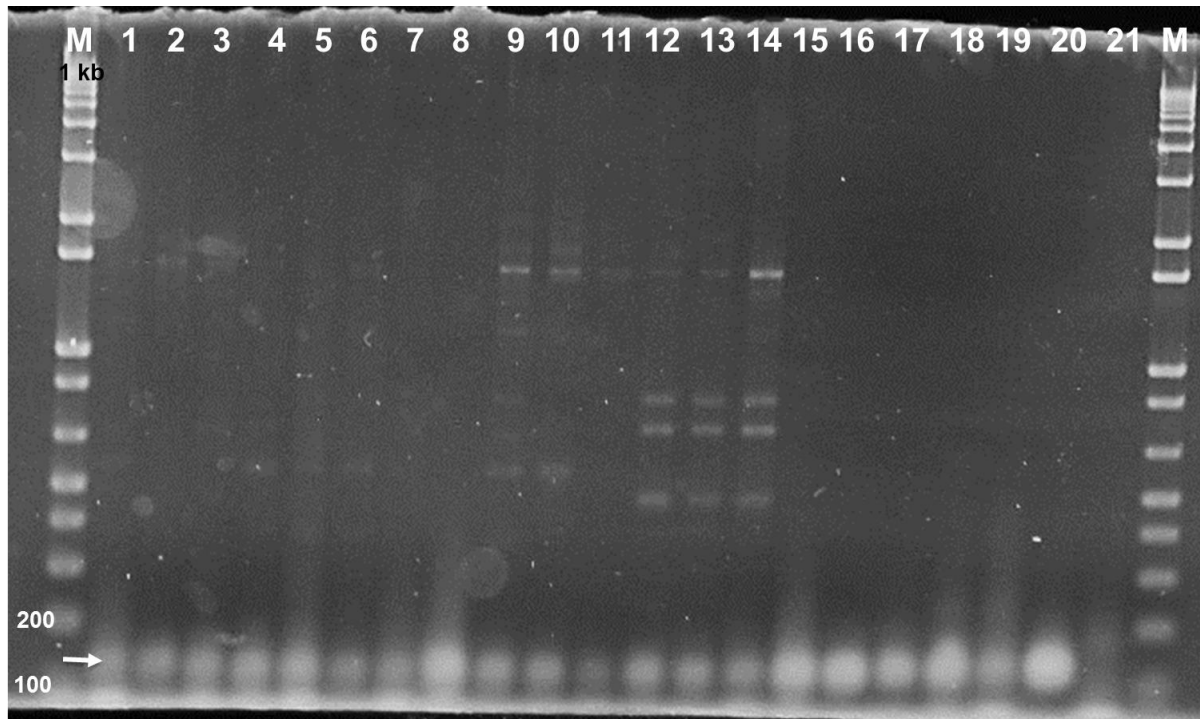


Figura 22. Electroforesis de gel de agarosa para el iniciador At2. Flecha indica la banda amplificada de importancia (130 pb). 1: L8, 2: L7, 3: L4, 4: L3, 5: L2, 6: L1, 7: 7X8 ("YOLI"), 8: 3x8 ("CLARIS"), 9: 3x4 ("JHOS"), 10: 1x3 ("DALI"), 11: 1x2 ("MARUCA"), 12: CM-334 (R), 13: *Capsicum chinense* (R), 14: Pimiento "YOLO WONDER" (S), 15: Cuauhtémoc, 16: Espartaco, 17: Moctezuma, 18: Aquiles, 19: Mermaid, 20: El Cid, T21: BLANCO.