



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**



---

**Centro Universitario UAEM Tenancingo**

**MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**VARIACIÓN DE MORFOTIPOS DE *Capsicum pubescens* EN LA RESISTENCIA  
A LA MARCHITEZ**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**ALMA JANETH VALLEJO GUTIÉRREZ**

**COMITÉ DE TUTORES:**

**Dr. Jaime Mejía Carranza. Tutor Académico**

**Dr. Rómulo García Velasco. Tutor Adjunto**

**Dra. Marithza Guadalupe Ramírez Gerardo. Tutor Adjunto**

**Tenancingo, México, octubre de 2018**

## DEDICATORIA

- \* A Dios, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí y nunca soltarme de la mano aún en los peores momentos en este trayecto.
- \* A mi abuelito J. Guadalupe† quien desde las alturas me ha impulsado a seguir adelante
- \* A mi pequeña Aniela, el motor de mi vida, la razón de alcanzar esta meta. Te amo mi niña y hoy y siempre este logro es todo tuyo.
- \* A mis padres, Jorge VZ y Juana GB. por todo su apoyo, por darme la mano y no permitir que me hundiera. Mil gracias por impulsarme y por siempre creer en mí, los amo.
- \* Enrique amigo mío, tú que me viste caer y que nunca me permitiste quedarme en el suelo. Por esas palabras tan sensatas, por estar siempre en el momento indicado, por ser parte de este proyecto y siempre ayudarme a encontrar una solución a los problemas, te quiero mucho.

## RESUMEN

El chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es un cultivo económicamente importante como producto alimenticio y farmacéutico. Es afectado por la "Marchitez", enfermedad de la raíz que provoca la muerte descendente de la planta. El objetivo fue evaluar la variación en la respuesta al daño provocado por el complejo fúngico de la marchitez en dieciséis fenotipos de plantas de chile manzano. En 2016, se colectaron plantas con síntomas de marchitez en 10 localidades del sur del Estado de México. Se identificaron tres agentes causales, *Fusarium oxysporum* Schlechtendal y *Rhizoctonia solani* J.G.Kühn aislados en medio de cultivo PDA; y *Phytophthora capsici* Leonina en medio 3P. Se obtuvieron cultivos monospóricos de *F. oxysporum* y de punta de hifa de *P. capsici* y *R. solani*. Se midió la velocidad de crecimiento expresada en la pendiente de la curva, la esporulación en conidios mL<sup>-1</sup> y la patogenicidad (incidencia y severidad). Se realizaron inoculaciones individuales y de las combinaciones de los patógenos en plántulas de chile manzano, en campo se inocularon 16 fenotipos, los cuales se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y se midió la severidad. Los resultados mostraron crecimiento y esporulación diferencial en los cultivos monospóricos y punta de hifa. La correlación entre crecimiento y esporulación fue de  $r = -0.17$ . En la severidad y la incidencia se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre colonias de *F. oxysporum* y significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre colonias de *P. capsici*. La correlación para severidad e incidencia fue de  $r = 0.11$ ,  $0.07$  y  $-0.05$  para *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* respectivamente. Hubo diferencias altamente

significativas ( $P \leq 0.01$ ) en severidad entre *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*, y la mezcla de los mismos. Los fenotipos M1 a M7 y M10 a M16 resultaron ser susceptibles a los tres patógenos y la mezcla de los mismos, mientras que el fenotipo 8 mostró ser resistencia a *F. oxysporum* y *R. solani*; y tolerante a *P. capsici*; *P. capsici* + *F. oxysporum* y a *P. capsici* + *F. oxysporum* + *R. solani*. El fenotipo 9 solo fue resistente a *F. oxysporum*. En conclusión tres patógenos son los responsables de la marchitez y exhiben en sus colonias grado diferencial en crecimiento, esporulación y patogenicidad. *P. capsici* es el patógeno que ocasiona la muerte de las plantas de chile manzano en menor tiempo, el fenotipo 8 es una fuente de resistencia genética importante para el control de la marchitez.

## SUMMARY

The manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.), is an economically important crop as a food and pharmaceutical product. It is affected by "Wilt", a root disease that causes the plant's downward death. The objective was to evaluate the variation in the response to damage caused by the fungal complex of wilt in sixteen phenotypes of manzano pepper plants. In 2016, plants with symptoms of wilt were collected in 10 localities in the south of the State of Mexico. Three causative agents were identified, *Fusarium oxysporum* Schlechtendal and *Rhizoctonia solani* J.G.Kühn isolated in PDA culture medium; and *Phytophthora capsici* Leonina in 3P medium. Monosporic cultures of *F. oxysporum* and hyphae of *P. capsici* and *R. solani* were obtained. The growth velocity expressed in the slope of the curve, the sporulation in conidia mL<sup>-1</sup> and the pathogenicity (incidence and severity) were measured. Individual inoculations and combinations of pathogens were made in manzano pepper seedlings. In the field, 16 phenotypes were inoculated, which were kept under greenhouse conditions and the severity was measured. The results showed growth and differential sporulation in the monosporic and tip of hypha cultures. The correlation between growth and sporulation was  $r = -0.17$ . In severity and incidence, highly significant differences ( $P \leq 0.01$ ) were observed between colonies of *F. oxysporum* and significant ( $P \leq 0.05$ ) between colonies of *P. capsici*. The correlation for severity and incidence was  $r = 0.11$ ,  $0.07$  and  $-0.05$  for *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* respectively. There were highly significant differences ( $P \leq 0.01$ ) in severity between *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, and the mixture thereof. The phenotypes M1 to M7 and M10 to M16 were found to

be susceptible to the three pathogens and the mixture thereof, while phenotype 8 showed resistance to *F. oxysporum* and *R. solani*; and tolerant to *P. capsici*; *P. capsici* + *F. oxysporum* and *P. capsici* + *F. oxysporum* + *R. solani*. The phenotype 9 was only resistant to *F. oxysporum*. In conclusion, three pathogens are responsible for wilt and exhibit differential growth, sporulation and pathogenicity in their colonies. *P. capsici* is the pathogen that causes the death of the manzano pepper plants in less time, the phenotype 8 is a source of genetic resistance important for the control of the wilt.

## **AGRADECIMIENTO**

- \* Al Centro Universitario UAEM Tenancingo, por permitir mi estancia en sus instalaciones y por todo el apoyo brindado.
- \* Dr. Jaime Mejía Carranza, por todo el apoyo, porque además de ser un excelente tutor, es usted un buen amigo.
- \* Dr. Rómulo García Velasco y Dra. Marithza Guadalupe Ramírez Gerardo, por el apoyo brindado durante este proyecto.
- \* Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca brindada durante el periodo años de maestría.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	II
RESUMEN .....	III
SUMMARY.....	V
AGRADECIMIENTO .....	VII
ÍNDICE GENERAL .....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Capsicum</i> spp. ....	4
2.2. <i>Capsicum pubescens</i> .....	5
2.2.1. Importancia del cultivo y comercialización .....	5
2.2.2. Variedades .....	7
2.2.3.1. <i>Fusarium</i> spp.....	13
2.2.3.2. <i>Phytophthora</i> spp. ....	14
2.2.3.3. <i>Rhizoctonia</i> spp.....	14
2.3. Mecanismos de defensa de la planta .....	15
2.4. Selección natural .....	21
2.5. Deriva génica y efecto fundador .....	22
2.6. Variabilidad genética .....	24
2.7. Identificación molecular de hongos filamentosos .....	27
2.8. Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación.....	29
2.8.1. Amplificación de ADN mediante PCR.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	33
5.1. Objetivo general.....	33
5.2. Objetivos específicos .....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1. Localización del experimento .....	34
6.2. Material biológico.....	34

6.2.1. Fenotipos .....	34
6.2.2. Colecta de material enfermo.....	35
6.3. Aislamiento <i>in vitro</i> del patógeno .....	35
6.3.1. Desinfección del tejido vegetal .....	35
6.3.2. Siembra del tejido vegetal en medio de cultivo .....	36
6.3.3. Purificación <i>in vitro</i> del patógeno .....	37
6.3.4. Cultivos monospóricos .....	37
6.3.5. Cultivo de punta de hifa .....	38
6.3.6. Velocidad de crecimiento micelial.....	38
6.4. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> .....	39
6.5. Interacción patógeno-patógeno .....	40
6.6. Inoculación de 16 fenotipos de chile manzano.....	41
6.7. Identificación morfológica de los fitopatógenos .....	43
6.8. Identificación molecular de los fitopatógenos .....	44
6.8.1 Amplificación de fragmentos de ADN por reacción de polimerasa en cadena (PCR).....	46
6.8.2. Secuenciación de fragmentos amplificados. ....	47
6.8.3. Análisis de secuencia.....	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
7.1. Patógenos aislados .....	49
7.2. Velocidad de crecimiento micelial y esporulación .....	50
7.3. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> .....	53
7.4. Interacción del patógeno en plántulas de chile manzano .....	58
7.5. Inoculación de 16 fenotipos de chile manzano.....	62
7.6.1. ADN de microorganismos.....	66
7.6.2. Amplificación de fragmentos de ADN por reacción de polimerasa en cadena (PCR).....	67
7.6.3. Secuenciación de fragmentos amplificados .....	68
7.7. ARTÍCULO .....	72
7.7.1. Envío de Artículo .....	93
8. CONCLUSIONES .....	94
9. BIBLIOGRAFIA.....	95
10. GLOSARIO .....	116

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación general por jerarquía taxonómica para <i>Capsicum</i> .....	5
Cuadro 2. Variación en color de flor .....	9
Cuadro 3. Localización y descripción de 12 colectas muestreadas en el Mercado Riva Palacio, Tenancingo Estado de México .....	10
Cuadro 4. Comparación de medias en ocho caracteres cuantitativos observados en 15 fenotipos de chile manzano del sur del Estado de México .....	11
Cuadro 5. Tiempo de crecimiento radial a límite de caja de Petri .....	52
Cuadro 6. Velocidad de crecimiento radial y esporulación en <i>F. oxysporum</i> , <i>P. capsici</i> y <i>R. solani</i> .....	53
Cuadro 7. Síntomas ocasionados por microorganismos fitopatógenos en plántulas de chile manzano. F= <i>F. oxysporum</i> ; P= <i>P. capsici</i> ; R= <i>R. solani</i> ; F+P= <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> ; F+R= <i>F. oxysporum</i> + <i>R. solani</i> ; P+R= <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> ; F+P+R= <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> ; acc= ápice de cotiledones cloróticos; clc= cotiledones ligeramente cloróticos; cc= cotiledones cloróticos; crc= cotiledones rizados y cloróticos; cln= cotiledones ligeramente necróticos; cm= cotiledones muertos; nlh= necrosis; ligera en hipocótilo; nh= necrosis en hipocótilo; pnh= puntuaciones necróticas ligeras en hipocótilo; pnh= puntuaciones necróticas en hipocótilo; hm= hipocótilo muerto; arn= ápice de raíz necrótico; nlr= necrosis ligera en raíz; nr= necrosis en raíz; rsan= raíces secundarias con ápices necróticos; rm= raíz muerta. ....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Forma y coloracion de frutos de fenotipos presentes en el Centro Universiatario Tenancingo .....	10
<b>Figura 2.</b> ITS. A. Región de ADN que codifica para el ARN ribosomal. B. Detalle de una unidad repetitiva. ....	29
<b>Figura 3.</b> Ubicación del Centro Universitario UAEM Tenancingo en Google earth 2018 ..	34
<b>Figura 4.</b> Microcámara.....	44
<b>Figura 5.</b> Patógenos causales de la marchitez de <i>C. pubescens</i> . 1. <i>F. oxysporum</i> a) Microconidios, b) Micelio septado y hialino. 2. <i>R. solani</i> a) Septo cercano al punto de origen a la ramificación hifal, b) micelio grueso y septado, c) Angulo de 90°. 3. <i>P. capsici</i> a) Esporangios, b) Micelio turuloso.....	50
<b>Figura 6.</b> A. Daños ocasionados por <i>F. oxysporum</i> . a) Testa cubierta con micelio, b) Necrosis en hipocótilo, c) Necrosis en radícula, d) Ápice de radícula necrótico. B. Daños ocasionados por <i>P. capsici</i> . a) Hipocótilo necrótico, b) Radícula necrótica con pequeños puntos, c) Ápice ligeramente dañado. C. Daños ocasionados por <i>R. solani</i> . A) Hipocótilo necrótico, b) Daño ligero en radícula, c) Ápice radicular necrótico .....	54
<b>Figura 7.</b> Incidencia y severidad de <i>F.oxysporum</i> en plántulas de chile manzano. Barras de error indican la desviación estándar. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente.....	56
<b>Figura 8.</b> Incidencia y severidad de <i>P. capsici</i> en plántulas de chile manzano. Barras de error indican la desviación estándar. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente.....	57
<b>Figura 9.</b> Incidencia y severidad de <i>R. solani</i> en plántulas de chile manzano. Barras de error indican la desviación estándar. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente.....	57
<b>Figura 10.</b> Daños ocasionados 5 ddi por: F) <i>F. oxysporum</i> , R) <i>R. solani</i> , P) <i>P. capsici</i> , P+R) <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> , F+R) <i>F. oxysporum</i> + <i>R. solani</i> , P+F) <i>P. capsici</i> + <i>F. oxysporum</i> y P+F+R) <i>P. capsici</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>R. solani</i> .....	60
<b>Figura 11.</b> Patogenicidad acumulada y promedio de hongos en 5 días después de la inoculación en plantas de chile manzano. P= <i>P. capsici</i> , P+R= <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> , F+P= <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> , F+P+R= <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> , F= <i>F. oxysporum</i> y R= <i>R. solani</i> . Barras de error son error estándar.....	62
<b>Figura 12.</b> Eficiencia en tolerancia, obtenida de promedio de 16 fenotipos de chile manzano. M= Fenotipo. Barras de error son error estándar. ....	64
<b>Figura 13. Daños ocasionados por los patógenos causales de la marchitez. 8-F.</b> Fenotipo 8 inoculado con <i>F. oxysporum</i> , a) producción de raicesillas; <b>8-P.</b> Fenotipo 8 inoculado con <i>P. capsici</i> , a) raíz necrótica, b) defoliación; <b>8-R.</b> Fenotipo 8 inoculado con <i>R. solani</i> , a) producción de raicesillas; <b>8-F+P.</b> Fenotipo 8 inoculado con <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> , a) raíz necrótica, b) defoliación; <b>8-F+P+R.</b> Fenotipo 8 inoculado con <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> , a) producción de raicesillas nuevas. <b>9-F.</b> Fenotipo 9 inoculado con <i>F. oxysporum</i> , a) clorosis foliar; <b>9-P.</b> Fenotipo 9 inoculado con <i>P. capsici</i> , a) raíz y corona necróticos, b) defoliación; <b>9-R.</b> Fenotipo 9 inoculado con <i>R. solani</i> , a) necrosis en raíz; <b>9-</b>	

<b>F+P.</b> Morfotipo 9 inoculado con <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> , a) raíz necrótica, b) corona necrótica, c) defoliación; <b>9-F+P+R.</b> Fenotipo 9 inoculado con <i>F. oxysporum</i> + <i>P. capsici</i> + <i>R. solani</i> , a) raíz necrótica, b) corona necrótica, c) defoliación.....	66
<b>Figura 14.</b> Electroforesis en gel de 1.2% agarosa en TBE para ADN de extracciones. F= <i>F. oxysporum</i> , R= <i>R. solani</i> y P= <i>P. capsici</i> ; carriles M es el marcador molecular de 100 pb. ....	67
<b>Figura 15.</b> Electroforesis en gel de 1.2% agarosa en TBE para productos amplificados de ADN no específicos. F= <i>F. oxysporum</i> , R= <i>R. solani</i> y P= <i>P. capsici</i> ; carriles M es el marcador molecular de 100 pb. ....	68
<b>Figura 16.</b> Electroforesis en gel de 1.2% agarosa en TBE para productos amplificados de ADN ITS de F= <i>F. oxysporum</i> , P= <i>P. capsici</i> y R= <i>R. solani</i> ; carriles M es el marcador molecular de 100 pb. ....	68
<b>Figura 17.</b> Alineamiento y consenso de <i>F. oxysporum</i> de fragmentos amplificados que se empalmaron con secuencias de la accesión número CM000595.1 del banco de genes de FungiDB. ....	69
<b>Figura 18.</b> Alineamiento y consenso de <i>P. capsici</i> de fragmentos amplificados que se empalmaron con secuencias de la accesión número PcapLT1534_SC064 del banco de genes de FungiDB. ....	70
<b>Figura 19.</b> Alineamiento y consenso de <i>R. solani</i> de fragmentos amplificados que se empalmaron con secuencias de la accesión número JATN01000256.1 del banco de genes NCBI, con anastomosis con el grupo 3 (AG-3).....	71

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del chile se ubica entre las siete hortalizas más cultivadas en el mundo, con una producción mundial estimada en 24 millones de toneladas (Latournerie-Moreno *et al.*, 2015). Sin embargo, su cultivo se ve afectado por la enfermedad conocida como “Marchitez” la cual destaca como la enfermedad de raíz más importante del cultivo de chile, ya que provoca la muerte prematura de la planta. Esta enfermedad fue identificada por primera vez en Nuevo México por Leonian (1922), quien estableció a *P. capsici* como el agente causal. Este patógeno es considerado el factor limitante más importante para la producción de chile en el mundo (Silvar *et al.*, 2006). Se estima que puede causar entre 25 y 40% de pérdidas en el cultivo del chile, mismas que pueden llegar a ser totales en función de las condiciones ambientales, los ecotipos y la cantidad de inóculo en el suelo (Palomo-Rodríguez *et al.*, 2003).

En México, los agentes causales de la marchitez reportados para *Capsicum annum* L., además de *P. capsici*, son *R. solani*, *F. oxysporum*, *Fusarium equiseti* Corda, *Fusarium verticilloides* Nirenberg, y *Fusarium solani* Appel and Wollenw (Palomo-Rodríguez *et al.*, 2003; González-Pérez *et al.*, 2004), por lo que es probable que estos patógenos actúen formando un complejo.

Dichos patógenos habitan en el suelo y afectan principalmente las raíces y base del tallo de la planta. Los síntomas iniciales son necrosis y pudrición de raíces secundarias y terciarias que son las que se encargan de la absorción del agua, seguida de la marchitez de la planta y posterior pudrición de frutos. La muerte de

la planta es ocasionada por la obstrucción de los haces vasculares y el avance de patógenos a través del pedúnculo del fruto, ramas y tallos. Esta enfermedad se encuentra presente en todo el mundo y en México se considera la más importante en todas las zonas productoras de chile (en el centro, bajío y norte) (Guigón-López y González – González, 2001) y puede causar pérdidas hasta del 100%.

En el sur de Estado de México el cultivo de chile manzano es intensivo para consumo interno y de exportación. Sin embargo tiene limitaciones en la producción debido a la marchitez de la cual no se tienen claro el o los agentes causales. A este respecto, se ha observado respuesta diferencial a la marchitez en diferentes morfotipos cultivados en la región, los cuales constituyen un valioso reservorio genético natural.

La variación natural de *C. pubescens*, que en general para todas las especies es un proceso de reproducción diferencial que provocan cambios genéticos a través del tiempo, puede generar mayor cantidad de descendientes de un grupo de individuos que otros, los cuales incrementan la frecuencia de su material genético en la población como un todo, confiriéndoles ciertas ventajas ligadas a su ciclo de vida como crecer más rápido, sobrevivir a una cantidad mayor de condiciones ambientales o tienen una ventaja reproductiva.

En este contexto, la colección de 16 fenotipos contrastantes en el Centro Universitario UAEM Tenancingo representan variación genética natural importante para diferentes caracteres, entre ellas la resistencia a la marchitez. El aprovechamiento de esta variación pudiera constituir los cimientos del desarrollo

de variedades resistentes a través de la incorporación de la fuente genética de resistencia.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en dieciséis fenotipos de plantas de chile manzano la variación en la respuesta al daño provocado por el complejo fúngico, dichas colectas proceden de las principales regiones productoras con problemas de marchitez para identificar nuevas fuentes de resistencia.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. *Capsicum* spp.

El chile, *Capsicum* spp., es un fruto americano probablemente originario de Bolivia (Perry y Flannery, 2007) cuya característica principal, el picor, es producido por un irritante llamado capsaicina (Heiser y Smith, 1953; Coe, 1994; Long-Solís, 2012) cuya concentración determina el grado de pungencia y una clasificación de las especies en picantes (frutos generalmente pequeños) y dulces (frutos generalmente grandes).

El fruto del chile tuvo una gran importancia en la cocina y en la medicina tradicional de Mesoamérica; por ejemplo, fue utilizado por los mexicas durante el Posclásico como irritante en conflictos bélicos, como medicina, como fumigante y como medio para disciplinar a los niños, además de ser uno de los tantos bienes que eran tributados; en la actualidad es utilizado principalmente como condimento, medicinal, alimento nutracéutico y funcional (Long-Solís, 1986; Coe, 1994; Long-Solís, 2012).

La clasificación taxonómica de *Capsicum* de acuerdo a GRIN (2014) se muestra en el Cuadro 1. No obstante, este género incluye 33 especies y 10 variedades o variantes. Hay cinco especies domesticadas en América: *C. annuum*, de probable origen mexicano o del norte de Centroamérica; *Capsicum baccatum* L., de las tierras bajas de Bolivia; *Capsicum chinense* Jacq, de Sudamérica; *Capsicum frutescens* L., del Caribe, y *Capsicum pubescens*, probablemente de los Andes, y más de 20 especies silvestres (Coe, 1994; Perry y Flannery, 2007; Long-Solís, 2012; Powis *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Clasificación general por jerarquía taxonómica para *Capsicum*

Jerarquía	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta- vascular plants
División	Magnoliophyta- angiosperms, flowering plants, plantes fleurs, plantes fruits
Clase	Magnoliopsida- dicots, dicotiledones, docotyledons
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae – nightshades- solanacées
Género	<i>Capsicum</i> L. pepper
Especie	<i>C. annuum</i> L.- cayenne pepper
Especie	<i>C. chinense</i> Jacq – aji
Especie	<i>C. pubescens</i> Ruiz y Pavon – rocoto
Variedad	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> L. – cayenne pepper
Variedad	<i>C. annuum</i> var. <i>glabrusculum</i> (Dunal) Heisen and Pickersgill – cayenne pepper
Variedad	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i> L. – cayenne pepper
Variedad	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (Wild.) Eshb. – aji

## 2.2. *Capsicum pubescens*

### 2.2.1. Importancia del cultivo y comercialización

En la diversidad de chiles que se cultivan en el territorio nacional, el chile manzano (*C. pubescens*) ha cobrado mayor importancia en la última década y de acuerdo con SAGARPA (2018), 4, 995.33 toneladas están destinadas solo para exportación a los Estados Unidos, de las cuales el 98 % es producido en el sur del Estado de México. Por otro lado, las hortalizas mexicanas son de las pocas actividades que mantienen una balanza comercial positiva dentro del sector rural, ya que el volumen exportado fue 4.1 veces mayor que el importado desde 1961 a 2010 (FAO-FAOSTAT, 2012). La producción de hortalizas en México ha tenido un aumento en las últimas dos décadas, uno de ellas es el cultivo del chile

(*Capsicum*.) alimento fundamental en la dieta diaria de los mexicanos debido a su picor, tradición de consumo que se ha conservado desde tiempos prehispánicos.

México sobresale en la generación de variedades de chile en el mundo, alrededor del 90% de chile que se consume a nivel mundial es de origen mexicano. Otros países productores son China, Indonesia, Turquía, España, Estados Unidos y Nigeria. El chile es el 8vo cultivo con mayor valor generado en la agricultura nacional, alcanzando alrededor de 13 mil mdp anualmente, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas, del cual se exportan cerca de 900 mil toneladas de chiles frescos, secos y en preparaciones (SAGARPA, 2015).

De la diversidad de chiles que se cultivan en el territorio nacional mexicano, el chile manzano es uno de los más importantes y ha cobrado mayor importancia en los últimos 15 años (Pérez y Castro, 2008). Debido a la demanda del chile manzano, la producción ha incrementado en huertos semicomerciales y actualmente este producto ha motivado el desarrollo de sistemas de producción que elevan la productividad y su calidad postcosecha (Espinosa, 2005). Sin embargo, este cultivo se ve afectado por la enfermedad conocida como marchitez de la planta, la cual puede afectar del 5 al 80% de las plantas, lo que ocasiona graves consecuencias económicas para los agricultores (Ram et al., 2017). De acuerdo a Espinosa (2010), en el Estado de México, los mercados con mayor distribución del chile manzano son la Central de abastos de Ecatepec y la Central de abastos de la ciudad de Toluca, los cuales presentan características similares, ya que venden frutos provenientes de campo abierto e invernadero. La central de abastos de la ciudad de Toluca se sitúa como uno de los dos mercados del chile manzano más importantes del Estado de México, ya que en este lugar se

comercializa el producto de los municipios de Coatepec Harinas, Tenancingo, Villa Guerrero y Valle de Bravo. Además, estas poblaciones tienen un alto consumo de chile manzano. En menor escala se encuentran los mercados locales de Texcoco, Coatepec Harinas, Tenancingo, Valle de Bravo y Villa Guerrero los cuales distribuyen a los consumidores finales.

Los estándares de calidad en los mercados no ha estado debidamente reglamentado y solo se ha basado en lineamientos de orden regional, establecidos por los principales compradores en los centros de consumo y distribución del país (Espinosa, 2010). Sin embargo, existen empresas importantes para la exportación de chile manzano, dos están ubicadas en Coatepec Harinas, Estado de México y una en el estado de Chihuahua.

### **2.2.2. Variedades**

Se ha señalado, por lo general que el chile manzano es genéticamente diverso y están bien adaptado a las localidades y ambientes específicos en los que se siembra (Votava *et al.*, 2005), y que la zona de adaptación de un ecotipo es la región donde éste ha evolucionado bajo un conjunto de condiciones locales climáticas, pedológicas y bióticas, con presión antrópica en el caso de los materiales cultivados (Pupilli *et al.*, 2000).

Entre los domesticados, los materiales del agricultor, es decir, aquellos que se han desarrollado por períodos largos de tiempo en sistemas locales de cultivo, tienen alta tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico y poseen alta estabilidad en su rendimiento. Estos materiales domesticados han estado sometidos a selección

antrópica, con un posible efecto fundador, en especial en el caso de las variedades mejoradas (Zevin, 1998).

El chile manzano cuenta con pocas variedades y estas únicamente son existentes en la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, Estado de México, puesto que a partir de 1996 Mario Pérez Grajales autor del libro “Mejoramiento genético de hortalizas” y un equipo de investigadores, empezaron a realizar cruces de variedades de chile manzano, colectadas en la zona centro del país y para el año 2002 ya contaban con tres variedades que son:

### **Amarillo Chapingo**

El crecimiento de las plantas alcanza dos metros con entrenudos no muy largos sino intermedios de ocho a diez centímetros de longitud. Los frutos de esta variedad son uniformes con tres lóbulos y tres lóculos. Este último aspecto es importante ya que el consumidor prefiere un fruto cuadrado, por ser más manejable en empaclado y transporte.

### **Puebla**

La planta de esta variedad, tiene los entrenudos más largos y toma de 15 a 20 días más en producir que la variedad Amarillo Chapingo. Su fruto es grande y tiene cuatro lóbulos, por lo que es más cuadrado; la parte carnosa (pericarpio) es más gruesa, y sus frutos son más grandes que los de la variedad Amarillo Chapingo.

### **Zongolica por Puebla**

Las plantas de esta variedad tienen los entrenudos cortos por lo que producen un mayor número de bifurcaciones y frutos por altura de la planta. El fruto de esta variedad es pequeño. Martínez, (2002), menciona la existencia de cuatro variedades más de chile manzano (Chiapas, Huatusco I, Huatusco II y Perú) de las cuales no describe sus características ni menciona el lugar donde se cultivan.

Sin embargo en el Centro Universitario UAEM Tenancingo, se han caracterizado 15 colectas, de las cuales, de acuerdo a Ayala, (2015) la colecta 12 es identificada como FB: colecta de corola blanca con entrenudos cortos, la colecta 11 FML: colecta de flor morada con entrenudos largos; ambas donadas por el Sr. Augusto Zárate que ha trabajado con el cultivo por 15 años, realizando selección masal para la conservación de este material. La colecta 3 fue proporcionado por el Ingeniero Jacobo Madero identificada como FMC: colecta morada de entrenudos medianos (Cuadro 2). El fenotipo F1, F2, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F13, F14 y F15 con localización diferente (Cuadro 3) y de acuerdo a Martínez (2016) muestran características contrastantes en cuanto a color de flor, forma y color del fruto (Figura 1), así como en la morfología de la planta (Cuadro 4).

Cuadro 2. Variación en color de flor

<b>COLECTA</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>ALTITUD</b>
<b>C12</b>	El Zarco, Tenancingo Estado de México.	2200 msnm
<b>C11</b>	Coatepec Harinas, Estado de México	2250 msnm
<b>C3</b>	Coatepec Harinas,	2250 msnm

Estado de México

C12= Colecta 12; C11= Colecta 11; C3= Colecta 3.

Cuadro 3. Localización y descripción de 12 colectas muestreadas en el Mercado Riva Palacio, Tenancingo Estado de México

COLECTA	LOCALIZACIÓN	ALTITUD	DESCRIPCIÓN
C1	San Bartolo, Villa Guerrero	2440 msnm	Fruto rojo tres lóculos
C2	Coatepec Harinas	2250 msnm	Fruto rojo dos lóculos
C4	Villa guerrero	1767 msnm	Fruto naranja dos lóculos
C5	Santa Ana, Tenancingo	2200 msnm	Fruto naranja tres lóculos
C6	Santa Ana, Tenancingo	2200 msnm	Fruto naranja tres lóculos
C7	Santa Ana, Tenancingo	2200 msnm	Fruto naranja tres lóculos
C8	Santa Ana, Tenancingo	2200 msnm	Fruto rojo dos lóculos
C9	Villa Guerrero	1767 msnm	Fruto rojo tres lóculos
C10	Coatepec Harinas	2250 msnm	Fruto naranja tres lóculos
C13	Coatepec Harinas	2250 msnm	Fruto rojo tres lóculos
C14	Santa Ana, Tenancingo	2200 msnm	Fruto naranja tres lóculos
C15	Villa Guerrero	1767 msnm	Fruto naranja tres lóculos

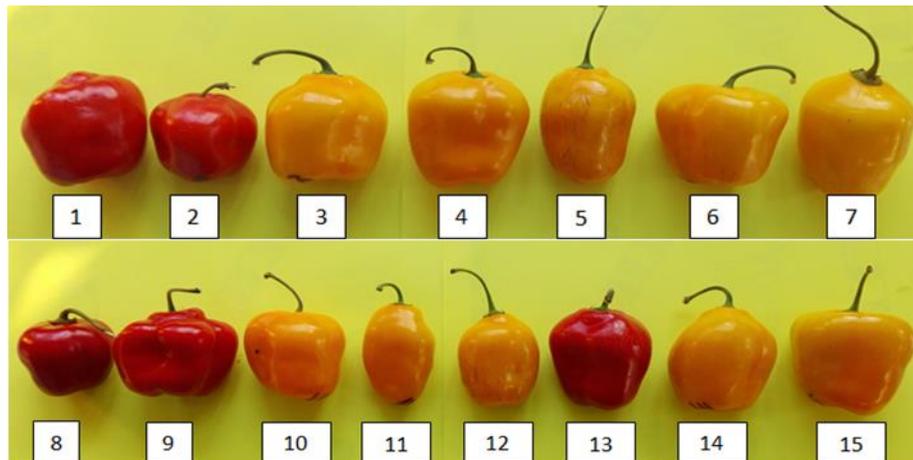


Figura 1. Forma y coloración de frutos de fenotipos presentes en el Centro Universitario Tenancingo

Cuadro 4. Comparación de medias en ocho caracteres cuantitativos observados en 15 fenotipos de chile manzano del sur del Estado de México

Colecta	L. tallo	D. tallo	L. hoja	A. hoja	L. planta	A. planta	L. B. P.*	L. pedicelo*
1	17.4	13.07	16.2	8.2	110.4	71.6	9.4	2.53
2	18.55	13.38	17.2	10.5	105.8**	68.6	4.4**	3.83**
3	17.8	14.63	17.8	10.61**	121.4	61.9**	5.9	2.21
4	14.4	13.53	16.8	8.96	125.1	90.5	9.5	2.19
5	14.65	12.47	16.4	7.6**	128.2	79.2	9.9**	3.19
6	10.77**	14.85	18*	9.25	125.8	81.1	6.6	2.83
7	20.4**	13.76	17	9.57	121.4	66.4	6.5	1.96**
8	12.55	13.93	16.7	8.09	112.8	96.2	7.8	2.12
9	17.65	12.63	15.9*	9.95	113.5	83.9	4.6	3.31
10	18.65	14.78	16.6	10.25	113.1	74.8	5.2	2.62
11	12.4	12.17	16	8.65	114.1	96.2**	7.4	2.9
12	12.85	10.79**	16.2	7.78	130.1	89.2	7	2.36
13	18.15	14.93**	16.5	8.44	136.5	80.8	7.6	2.62
14	30.5**	14.09	17.3	9.75	140.9**	72.2	7.9	2.69
15	20.45	13.95	17.1	9.47	118.7	75.4	6.2	2.43
CV	25.16	13.33	8.69	10.33	10.58	18.63	30.57	19.43
p	0.0001	0.001	0.04	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

CV= coeficiente de variación, p= probabilidad Tukey <0.01, \*\* valores altamente significativos, \* valores significativos, L= longitud, D= diámetro, A= ancho y L. B. P.= longitud en brotes primarios.

### 2.2.3. Enfermedades

De acuerdo a Agrios (2008), las plantas presentarán enfermedad cuando una o varias de sus funciones sean alteradas por organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio. Las causas principales de enfermedad en las plantas son los organismos patógenos y los factores del ambiente físico. Los procesos específicos que caracterizan las enfermedades, varían considerablemente según el agente causal y a veces según la planta misma. En un principio, la reacción de la planta ante el agente que ocasiona su enfermedad se concentra en la zona enferma, y es de naturaleza química e invisible. Sin

embargo, poco tiempo después la reacción se difunde y se producen cambios histológicos que se hacen notables y constituyen los síntomas de la enfermedad.

La importancia de un patógeno que ataca a una planta en su ambiente natural generalmente es muy poca, pero conforme la agricultura tiende al monocultivo y a la implantación de diversas técnicas agronómicas, no solo causa un desequilibrio en el ecosistema y favorece la proliferación de plagas y enfermedades, sino que también se coloca a las especies cultivadas en un estado de predisposición (Bustamante y Rivas, 1999).

La pudrición de la raíz es el principal problema fitopatológico del cultivo de chile en el Norte-Centro de México. En muestreos de campo realizados durante el año 2000 en los Estados de Aguascalientes y Zacatecas, se detectó a los hongos *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp. y *Pythium* spp. en raíces de plantas enfermas. La mayoría de estos hongos producen estructuras de resistencia (esclerocios, oosporas o clamidosporas) que aseguran su supervivencia en el suelo por períodos prolongados (Velásquez *et al.*, 2002).

La sintomatología asociada con la pudrición de la raíz del chile incluye marchitez, defoliación, cambio de color y rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, maduración adelantada e irregular, pudrición de la raíz, raicillas necróticas, presencia de rebrotes, y otros síntomas como nudos deprimidos prolongados (Velásquez y Medina, 2002).

Apodaca-Sánchez *et al.*, (2004); Anaya- López *et al.*, (2011), mencionan a *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* Edson, *P. capsici* y *R. solani* como agentes causales de la marchitez en *C. annum*, los cuales se establecen en la raíz de la planta ocasionando un daño que origina la marchitez de la misma.

### **2.2.3.1. *Fusarium* spp.**

Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular (Turlier *et al.*, 1994). Sin embargo, la colonización, se restringe tanto en cultivares resistentes como susceptibles a la región de entrada inicial del patógeno, debido a la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas (Takken y Rep, 2010). En los cultivares susceptibles, la colonización continúa (distribución secundaria) cuando los geles y calosas son degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno y el crecimiento de las tilosas es inhibido. En los cultivares resistentes, flavonoides del tipo de las catequinas y sus productos de oxidación inactivan las enzimas, y la distribución secundaria es confinada a los puntos de infección inicial (Deese y Stahmann, 1962).

*Fusarium* spp. se comporta como fitopatógeno al encontrar la planta con las características apropiadas de hospedero. Éste penetra las diferentes capas de la corteza de la raíz hasta alcanzar el sistema vascular. Ya establecido, la colonización de la planta se lleva a cabo de manera rápida a través del xilema,

que origina la sintomatología característica de la marchitez (Roncero *et al.*, 2000; Agrios, 2008).

#### **2.2.3.2. *Phytophthora* spp.**

El Oomiceto se encuentra en el suelo y desde ahí sus propágulos son capaces de diseminarse en corrientes de agua e infectar las raíces o la base del tallo, tanto en plántula como en etapa adulta; en la raíz genera pudrición y en la base del tallo un estrangulamiento que bloquea el xilema e interrumpe el paso del agua, causa amarillamiento de las hojas, favorece la incidencia del tizón de hojas, defoliación rápida, pudrición de frutos y muerte de la planta (Velásquez *et al.*, 2001).

#### **2.2.3.3. *Rhizoctonia* spp.**

En raíz se observan manchas irregulares a alargadas, acuosas, hundidas, de color café claro a café oscuro. Sobre el tejido afectado ocasionalmente es posible detectar a simple vista la presencia del hongo en forma de micelio muy ramificado, de color café. En la parte aérea de la planta puede apreciarse clorosis del follaje, seguido de marchitez (Andres, 2015). Estas enfermedades son conocidas como “pudrición del tallo y la raíz”, “ahogamiento” ó “cancrosis del tallo de las plántulas” (Agrios, 1985).

#### **2.2.3.4. *Pythium* spp.**

Las distintas especies de *Pythium* tienden a ser muy inespecíficas y generalistas en su gama de huéspedes (Owen-Going, 2002). Ante un ataque de *Pythium* las

semillas infectadas se tornan blandas, pastosas y negras, y finalmente mueren. Los plantíos tienen tallos muy húmedos y se colapsan. Aparentemente sin razón, plantas ya crecidas y plantas madres comienzan a marchitarse y muestran un color amarillento (que a menudo se identifica erróneamente como una deficiencia nutricional), y a veces las hojas tienden a enrollarse hacia abajo. De igual manera, las plantas muestran un crecimiento pobre y el rendimiento se reduce o hay pérdida total de la cosecha. La podredumbre de las raíces afecta a todo el cultivo (decenas de miles de plantas, en muchos casos) en un plazo de dos a cuatro días (Owen-Going, 2002; Owen-Going *et al.*, 2003).

### **2.3. Mecanismos de defensa de la planta**

En el proceso de adaptación a los ecosistemas terrestres, las plantas enfrentan muchos tipos de estrés, incluyendo el ataque de comunidades de microorganismos del suelo (Emiliani *et al.*, 2009). Las interacciones planta-microorganismos han mostrado diversas respuestas en la planta, en términos de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y se ha podido determinar su importante papel en resistencia de las plantas a patógenos (Bindschedler *et al.*, 2006), encontrándose que la planta eleva sus niveles de ERO's cuando es atacada por patógenos (Fase I) y luego mantiene niveles moderados de producción de ERO's (Fase II) (Lamb y Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2005).

Las comunidades de plantas interactúan con organismos benéficos y antagónicos, lo cual les exige el desarrollo de respuestas adaptativas para integrar las diferentes

señales que reciben. Esta complejidad está enmarcada en la gran diversidad de especies de plantas, insectos y microorganismos, incluyendo benéficos que interactúan y permiten mejorar el crecimiento y la nutrición vegetal, favorecen la tolerancia a estrés, el control de plagas y la polinización (Pozo *et al.*, 2005). Ante la multiplicidad de interacciones, las plantas presentan una amplia flexibilidad de respuestas frente a organismos benéficos y patógenos (Verhagen *et al.*, 2004), con superposición de algunas señales activadas por la planta y respuestas adaptativas que se mueven entre la protección frente a los agresores y la obtención de beneficios, generándose una sofisticada red de señales, donde los procesos de sinergismo y antagonismo entre vías de señalización permiten afinar el mecanismo de defensa más adecuado (Chisholm *et al.*, 2006; Pieterse y Dicke, 2007).

La iniciación de procesos de defensa de las plantas frente a una posible infección o colonización por microorganismos, requiere de un diálogo molecular entre los organismos involucrados (Gust *et al.*, 2012) en el cual se debe considerar:

- 1.- Percepción de los patrones moleculares asociados a microorganismo (MAMPs) del microorganismo por los receptores de reconocimiento de la planta (PRRs).
- 2.- Percepción de las proteínas efector-específicos del patovar microbiano por los receptores inmunes de la planta (Spoel y Dong, 2012; Chisholm *et al.*, 2006; Dang y Jones, 2001).

Un mecanismo de adaptación de plantas, es su habilidad de reconocer y responder rápidamente frente a un posible invasor mediante respuestas de defensa.

Respuestas gen-gen se observan cuando un patógeno con un gen dominante de avirulencia es reconocido por una planta con un gen dominante de resistencia (R); en interacciones incompatibles el hospedero es resistente, pero en las compatibles no hay reconocimiento gen-gen, el patógeno es virulento y el hospedero susceptible. En las respuestas de resistencia gen-gen, mediadas por hormonas como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), las plantas presentan mecanismos de defensa mediante efectores, con producción de metabolitos, proteínas y acumulación de calosa y lignina (Glazebrook, 2005).

La respuesta de defensa, puede iniciarse por un reconocimiento gen-gen, que limita el crecimiento del organismo invasor y puede estar acompañada por la producción de ERO's, necesarias para la respuesta hipersensible (HR), que permite la programación de muerte celular y le impide al invasor el acceso a nutrientes y agua. Esta resistencia mediada por genes *R* está asociada con la activación de la vía de señalización dependiente del SA que permite la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (PR), mientras que otras defensas de la planta están controladas por mecanismos que dependen de ET o de JA (Glazebrook, 2005). La primera respuesta inmune, genera un nivel de defensa basal y le permite reconocer características comunes de los patógenos. Son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales forman parte de la primera línea de defensa y puede ser suprimida por patógenos por liberación de proteínas efectoras, que son reconocidas por las plantas a través de proteínas R, conformando una segunda línea de defensa, llamada inmunidad disparada por efector (Chisholm *et al.*, 2006).

Las plantas pueden activar otra línea de defensa, la resistencia inducida, que es sistémica, tiene un amplio espectro de efectividad (Howe, 2004) y puede ser inducida por organismos patógenos y benéficos (HFMA y rizobacterias), activada en órganos distantes de una planta en respuesta a una infección localizada y confiere una resistencia mejorada contra un posible ataque posterior para un amplio rango de patógenos (Pozo *et al.*, 2004; Chaturvedi y Shah, 2007; Vlot *et al.*, 2008). Los patógenos inducen resistencia sistémica adquirida (SAR) (Durrant y Dong, 2004). En cuanto a la resistencia sistémica inducida (ISR) esta es mediada por rizobacterias (Van Loon *et al.*, 1998) y también es observada en plantas colonizadas por HFMA (Liu *et al.*, 2007) y la defensa directa es inducida por herbívoros (Howe, 2004). Dentro de los mecanismos de defensa inducida, se encuentra la producción de compuestos como proteínas relacionadas con patogénesis (PR) con actividad antimicrobiana (Van Poecke y Dicke, 2004), inhibidores de proteinasas que afectan insectos (Howe, 2004), producción de sustancias volátiles que atraen parasitoides y predadores (Van Bel y Gaupels, 2004; Heil y Ton, 2007) y néctar para capturar artrópodos que controlan herbívoros (Dicke y Hilker, 2003). Estas señales pueden transmitirse internamente por haces vasculares (Van Bel y Gaupels, 2004; Heil y Silva, 2007) y externamente mediante sustancias volátiles que permite dirigir la señal a la planta y a plantas circundantes. Algunas de estas señales pueden actuar indirectamente, mediante atracción de enemigos naturales (Heil y Silva, 2007).

En la resistencia inducida, el SA, el JA y el ET juegan un papel clave (Durrant y Dong, 2004) y la eficiencia en la regulación de la respuesta depende del tipo

específico de organismo y la cantidad, composición y tiempo de identificación de la señal que produce la activación de genes de defensa (Mur *et al.*, 2006). La mayoría de genes de respuesta vía JA activados por cada atacante son específicos para la combinación planta-atacante, pero en mecanismos de comunicación cruzada, se forma una compleja red de respuesta específica por el atacante (Pieterse y Dick, 2007). La comunicación cruzada entre vías de defensa permite regular, priorizar y definir la estrategia de defensa dependiendo del atacante, pero organismos benéficos y atacantes pueden alterar la red de señales y manipular las defensas (Harrison, 2005), usando factores de virulencia como la coronatina que actúa en forma análoga al jasmonato (Nomura *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* la coronatina suprime las defensas dependientes de SA contra *Pseudomonas syringae* Van Hall, incrementando la susceptibilidad al patógeno (Brooks *et al.*, 2005), así como la variabilidad intraespecífica existente en el grado de interacción entre defensas dependientes de SA y JA puede constituir una forma de evasión frente a estrategias tipo señuelo empleadas por patógenos (Traw *et al.*, 2003).

### **“Priming”**

La modulación de respuestas de defensa de la planta utiliza diversos mecanismos como identificación, comunicación cruzada y supresión de señales de defensa mediada por el patógeno. La activación de respuesta de defensa acompañada de una estrategia efectiva es fundamental para control de plagas, por el alto costo energético de la defensa. Este fenómeno se conoce como “priming”, en el que un estímulo recibido facilita la respuesta de otro estímulo relacionado y actúa como un mecanismo de memoria (Conrath *et al.*, 2006), que contribuye a los procesos de

adaptación de la planta al estrés (Pieter y Dicke, 2007). La eficiencia en la comunicación entre órganos infectados y no infectados es vital para la manifestación a tiempo de defensas que permitan restringir sistémicamente el avance del ataque. Los haces vasculares sirven como medio eficiente de comunicación a larga distancia dentro de la planta. Las señales aéreas también contribuyen en este proceso. Algunos de los metabolitos candidatos en señales sistémicas de defensa de la planta frente a patógenos son el metil-salicilato, los jasmonatos, el ácido azelaico y di-terpenoides, encontrados como señales móviles asociados con la activación sistémica en contra de un amplio espectro de patógenos (Chaturvedi y Shah, 2007; Truman *et al.*, 2007). Así, está el ácido zelaico que ejerce “priming” sobre la vía del SA (Cameron *et al.*, 1994; Laurie-Berry *et al.*, 2006; Jung, *et al.*, 2009), los terpenoides (Mumm *et al.*, 2008) y los volátiles verdes de hojas (Green leaf volátiles- GLVs) que actúan como “priming” en vías de jasmonatos (Heil *et al.*, 2007). Por el contrario, las auxinas probablemente contribuyen a la regulación negativa de las defensas sistémicas (Shah, 2009).

El “priming” puede ser inducido por bacterias benéficas (Verhagen *et al.*, 2004), hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) (Pozo *et al.*, 2005), patógenos (Cameron *et al.*, 1999), insectos herbívoros (De Vos *et al.*, 2006), por aplicación de sustancias químicas, como bajas dosis de SA (Mur *et al.*, 1996), JA (Kauss *et al.*, 1994) y por compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en relaciones planta-herbívoros y planta-planta (Baldwin *et al.*, 2006), observándose que los VOCs inducidos por herbívoros producen un estímulo en plantas cercanas mejorando directa e indirectamente las respuestas de defensa (Kessler *et al.*,

2006). En plantas en estado de “priming” las respuestas de defensa no son activadas directamente por el agente del “priming”, pero son aceleradas después de la percepción de la señal de estrés, aumentando el nivel de resistencia (Conrath *et al.*, 2006).

#### **2.4. Selección natural**

De acuerdo a Solomon (2008), la evolución es la acumulación de cambios hereditarios en el transcurso del tiempo, mientras que la adaptación es la modificación evolutiva que mejora las oportunidades de supervivencia y de éxito reproductivo de la población en un ambiente dado. Con el tiempo la acumulación de modificaciones podría dar por resultado nuevas especies. Así entonces, de acuerdo a Darwin en la selección natural los organismos mejor adaptados tienen mayor probabilidad de sobrevivir y convertirse en los progenitores de las generaciones sucesivas, mientras que los rasgos menos favorables disminuyen o desaparecen.

Darwin propuso que la evolución ocurre por selección natural y consiste en cuatro observaciones sobre el mundo natural:

1. *Variación*: Los individuos de una población presentan variación, con una combinación única de rasgos como la capacidad de tolerar condiciones ambientales diversas y resistencia a ciertos parásitos o infecciones. Algunos de estos rasgos elevan la probabilidad de supervivencia del individuo y su éxito reproductivo, mientras que otros no.
2. *Sobreproducción*: La capacidad reproductiva de cada especie tiene el potencial de aumentar geométricamente las poblaciones.

3. *Límites al crecimiento poblacional, o lucha por la existencia:* El alimento, luz, espacio vital y otros recursos disponibles para la población son limitados, por lo que los individuos compiten entre sí por ellos. Debido a que hay más individuos de los que el ambiente puede mantener, no todos sobrevivirán hasta la edad reproductiva.
4. *Éxito reproductivo diferencial.* La descendencia tiende a parecerse a los progenitores, debido a que la siguiente generación obtiene los rasgos heredados de los progenitores. El éxito productivo es la clave de la elección natural: los individuos mejor adaptados producen mayor descendencia, mientras que los menor adaptados mueren prematuramente o producen menos descendencia.

## **2.5. Deriva génica y efecto fundador**

Aunque la selección natural es importante por ser un mecanismo adaptativo, no es la única fuerza de cambio de las frecuencias alélicas y por ende, de diferenciación genética entre poblaciones. Imaginemos el caso, por ejemplo, de una población teórica pequeña y aislada en la que ninguno de los alelos de un determinado gen multialélico (es decir polimórfico, con varios alelos en la misma población) tiene una ventaja adaptativa sobre los demás (se dice entonces que los alelos son neutros). En estas condiciones cada alelo tiene la misma probabilidad que todos los demás de sobrevivir y de ser transmitido a la descendencia. Sin embargo, debido a que la población es limitada en tamaño es posible que no todos los alelos de ese gen estén representados en los individuos de la siguiente generación. Este mecanismo de cambio de frecuencias alélicas de una generación a otra es similar

a un error de muestreo: si las clases estudiadas son muchas, es muy probable que en una muestra pequeña no detectemos algunas de ellas, especialmente si su ocurrencia es baja. Como consecuencia las frecuencias alélicas cambiarán de una generación a otra, y los alelos tenderán a desaparecer paulatinamente del pozo genético disminuyéndose la variabilidad hasta que, después de un número  $n$  de generaciones, ocurrirá fijación y el gen se vuelve monoalélico. A este fenómeno se le denomina deriva génica. La diferencia entre la selección natural y la deriva génica reside en que la primera es direccional, mientras la segunda es aleatoria, un aspecto importante de la evolución que Charles Darwin ya había notado (Darwin, 1859).

La competencia entre la deriva genética aleatoria y la selección natural desempeña un papel central en la evolución: Considerando que las mutaciones no benéficas a menudo prevalecen en poblaciones pequeñas por casualidad, las mutaciones que barren a través de grandes poblaciones suelen conferir una ventaja selectiva.

Un principio de la biología evolutiva moderna es que La selección darwiniana y la deriva genética aleatoria compiten en impulsar el cambio evolutivo (Nei, 2005). Es ampliamente aceptado que la deriva genética puede tener efectos significativos en poblaciones pequeñas (Nei *et al.*, 1975) que incluso puede llevar a la especiación (Mayr, 1963). En grandes poblaciones, sin embargo, los efectos de muestreo aleatorio generalmente se consideran débiles comparado con la selección (Hartl y Clark, 1997; Elena y Lenski, 2003) (ley de grandes números). La mayor salida de este comportamiento paradigmático ocurre cuando grandes poblaciones experimentan expansiones de rango. Los descendientes de los individuos que se

establecen primero en un nuevo territorio son más propensos a dominar el conjunto de genes a medida que la expansión progresa (Edmonds *et al.*, 2004, Hallatsche y Nelson, 2007). Los efectos de muestreo aleatorio entre estos pioneros dan como resultado una deriva genética que puede tener profundas consecuencias en la diversidad de la población en expansión. De hecho, niveles espacialmente variables de la diversidad genética y los patrones de colonización parecen estar correlacionados en muchas especies (Cavalli-Sforz *et al.*, 1993; Ramachandran *et al.*, 2005).

## **2.6. Variabilidad genética**

De acuerdo a Gliessman (2002), la variabilidad genética entre las especies, se debe principalmente a la naturaleza de la réplica del ADN, el cual no siempre se replica así mismo perfectamente, ocurren errores de diferentes tipos llamados mutaciones, y siempre ocurren con alguna frecuencia. Ya que la réplica del ADN es un requisito previo de la reproducción de nuevos individuos, mutantes son generados constantemente. Sin embargo, algunas mutaciones son fatales, perjudiciales, neutras y muy poco ventajosas o positivas, todas las mutaciones representan diferencias y variabilidad genética. La mayoría de las mutaciones son cambios simples en la secuencia de los nucleótidos de la molécula del ADN, que por sí mismas pueden no tener efecto significativo, pero sumadas y en funciones del tiempo, pueden resultar en cambios fundamentales, como producción de frutos más grandes o resistencia a las heladas.

La variabilidad también es producida por la reproducción sexual. Cuando dos individuos se reproducen sexualmente, los genes de cada uno son distribuidos de manera diferente en los diferentes gametos (células sexuales), y el material genético contenido en los gametos es mezclado en una nueva manera cuando los gametos se cambian durante la fertilización. Las variaciones pueden ser introducidas durante la meiosis (la formación de gametos) cuando los cromosomas son borrados o translocados, o cuando cromosomas análogos fallan al separarse en la primera división mitótica.

Este último tipo de "error" crea gametos que tienen dos copias de cada cromosoma (diploide) en vez de uno como es usual (haploide). Si uno de estos gametos diploides se fusiona con un gameto haploide normal resultara un cigoto con tres veces el número de cromosomas haploides, y cuando uno se fusiona con otro gameto diploide no reducido, se puede formar un cigoto con cuatro veces el número de cromosomas del haploide. De tal forma que el incremento de cromosomas representa otra fuente de variación genética. Las plantas que tienen más cromosomas que el diploide, son llamadas poliploides, típicamente tienen características diferentes que sus ancestros y ocurre con relativa frecuencia en la naturaleza.

Debido a la variación genética natural, algunos individuos de la población pueden poseer características que otros no tienen, o pueden expresar ciertas características con mayor o menor grado que otros. Estas características pueden dar al individuo ciertas ventajas ligadas a su ciclo de vida. Estos individuos pueden

crecer más rápido, sobreviven una cantidad mayor o tienen una ventaja reproductiva. Debido a estos factores, ellos pueden tener mayor cantidad de descendientes que otros individuos, los cuales incrementan la frecuencia de su material genético en la población como un todo. Esto es a través de un proceso de reproducción diferencial que provocan cambios genéticos en las especies a través del tiempo.

Para que la selección natural actúe es imprescindible que exista variabilidad genética; si la variación genética de determinada población disminuye y aumenta la homocigosis, ésta se dirigiría a un camino evolutivo sin salida. Sin embargo, las poblaciones tienen en general un alto grado de heterocigosis. Una de las principales fuentes de variabilidad son las mutaciones genéticas al azar que dan lugar a cambios heredables en las secuencias de nucleótidos. Las variantes alélicas que se originan dentro de una población por mutaciones y que se recombinan en la meiosis dan lugar a fenotipos que son la base de la microevolución adaptativa Masuelli y Marfil (2011).

Recientes avances en el área de la biología y genética molecular han demostrado que existe otra fuente de variación llamada epigenética. La epigenética es el estudio de cambios heredables en la expresión y función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de ADN (Richards, 2006). Se encontró que la variación heredable no necesariamente se basa en cambios de secuencias, sino que existen cambios heredables en la expresión génica en total ausencia de variabilidad genética. Una característica fundamental del fenómeno epigenético es

que está influenciado por el ambiente y un mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos. Diferentes tipos de estrés pueden inducir cambios epigenéticos en un individuo, en plantas se mencionan, entre otros, el ataque de patógenos, el cultivo in-vitro y la hibridación interespecífica (McClintock, 1984).

## **2.7. Identificación molecular de hongos filamentosos**

La identificación preliminar de fitopatógenos basada en estudios taxonómicos de los hongos y su patología sobre hospedero (Aoki *et al.*, 2005), requiere tiempo y experiencia considerables. Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de las técnicas moleculares basadas en el análisis de fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos (Orberá, 2004). Sin embargo, los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016).

La taxonomía de hongos puede ser desafiante por la plasticidad morfológica y fisiológica intraespecíficas, así como por el número limitado de marcadores morfológicos. Además, el proceso de identificación basado en rasgos morfológicos y fisiológicos, puede consumir mucho tiempo. La secuenciación de los genes ribosomales (ADNr) y de sus espacios transcriptos internos, ITS (Internal Transcribed Spacer) u otras regiones variables dentro de genes conservados (por ejemplo: gen de actina) es frecuentemente necesaria para la identificación taxonómica precisa (Slemmons *et al.*, 2013).

Resultados previos han demostrado que regiones complejas ITS (no codificantes y variables) son útiles para medir relaciones genealógicas cercanas de hongos, dado que exhibe grandes diferencias interespecíficas (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). En hongos, el ADN que codifica para el ARN ribosomal está organizado en unidades que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma. Cada unidad está formada por tres genes, uno que codifica para la subunidad 18S, uno que codifica para la subunidad 5.8S y otro para la subunidad 26S. Estos genes están intercalados por secuencias no codificantes, denominadas ITS 1 e ITS 2, A su vez, cada unidad está separada de la otra por una región denominada IGS (Inter Genic Spacer), intercaladas por gen 5S (Figura 2). Estas regiones son lo suficientemente variables para ser utilizadas como región blanco específicas de especie (Slemmon *et al.*, 2013). Dado que las regiones ribosomales evolucionan de manera concertada, muestran un bajo polimorfismo intraespecífico, y una gran variabilidad interespecífica, se ha probado que son muy útiles para la clasificación de especies de género (Esteve-Zarzoso *et al.*,1999).

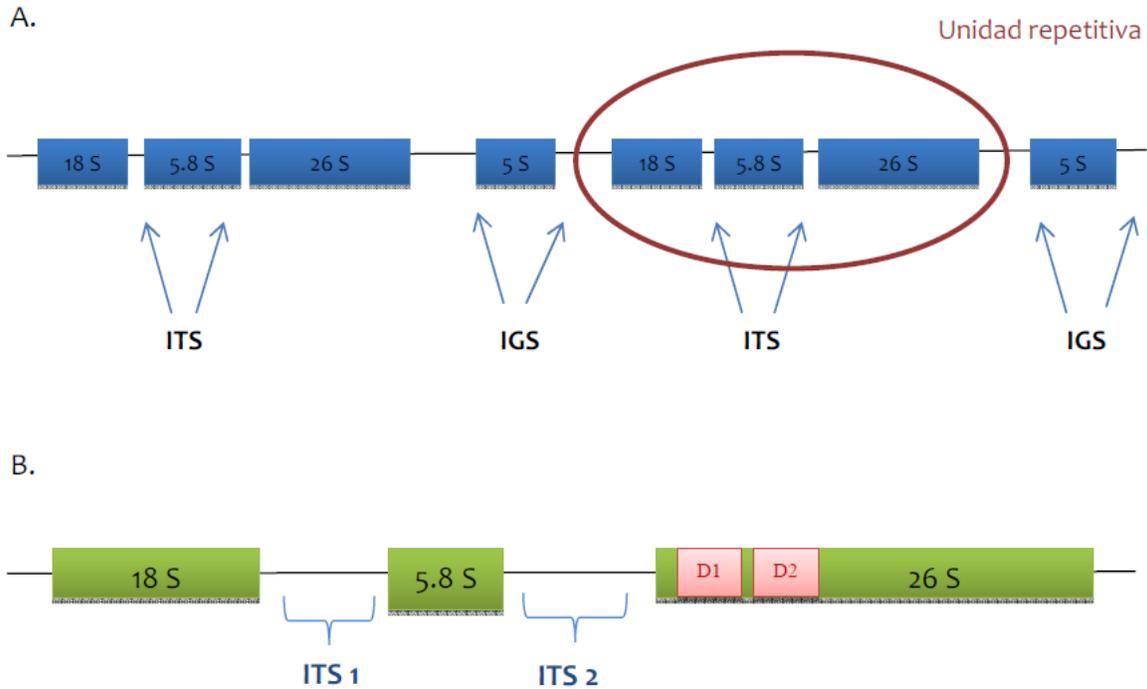


Figura 2. ITS. A. Región de ADN que codifica para el ARN ribosomal. B. Detalle de una unidad repetitiva.

## 2.8. Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación

La extracción de ADN consta de tres etapas: 1- Lisis celular, 2- purificación y 3- recuperación. La lisis celular en hongos implica la ruptura de la pared celular y de la membrana plasmática (Sambrook y Russell, 2011).

La estructura de la pared celular es altamente compleja comparada con la membrana celular de los mamíferos y la pared bacteriana. Consiste de gruesas capas de quitina (1-3)- $\beta$ -D-glucano, (1-6)- $\beta$ -glucano, lípidos y proteínas. Una dura capa superficial de la melanina puede estar presente, que es altamente resistente a la luz UV, a la digestión enzimática y a la descomposición química. Estas características físicas de la pared fúngica, han impedido el desarrollo de un

método único y universal de extracción de ADN para hongos (Karakousis *et al.*, 2006). Para la ruptura de pared se usan métodos físicos o enzimáticos, y métodos químicos para la ruptura de membrana.

Existen diferencias significativas en el grado de lisis entre especies, dependiendo del método de ruptura de pared celular utilizado, sin embargo la lisis completa en todas las especies solo se dio utilizando congelamiento con nitrógeno líquido y molienda con mortero (Karakousis *et al.*, 2006).

En el proceso de purificación se realizan uno o dos lavados con solventes orgánicos (Fenol, cloroformo) para separar proteínas, tales como las nucleasas. Mientras que la recuperación del ADN se logra mediante precipitación en condiciones adecuadas. Agregar sales neutraliza la carga negativa del ADN favoreciendo su precipitación, y volviéndolo insoluble en etanol o isopropanol.

Varios factores además de la recuperación de ADN deben ser considerados al seleccionar un método de extracción de ADN, un ejemplo es: el costo de la muestra, el tipo de procedimiento, el volumen de muestra, reactivos adicionales y el equipamiento necesario (Fredricks *et al.*, 2005)

### **2.8.1. Amplificación de ADN mediante PCR**

La reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (Polymerase Chain Reaction) es un método de síntesis enzimático que se utiliza para la amplificación de fragmentos específicos de ADN *in vitro*. Utiliza un ADN molde, dos cebadores

oligonucleótidos (primers), desoxinucleótidos y una enzima termoestable con actividad polimerasa. La reacción transcurre a través de una serie de ciclos repetitivos que consisten en tres pasos:

1. Desnaturalización del ADN molde.
2. Hibridación de las cadenas simples de ADN con los primers.
3. Polimerización o elongación del complejo ADN-iniciador realizado por la polimerasa termoestable.

La PCR ha permitido detectar e identificar especies fúngicas en muestras clínicas, en alimentos, aire, agua y suelo (Karakousis *et al.*, 2006).

La sensibilidad final de cualquier ensayo de PCR para la detección de hongos depende de la lisis eficiente de las células fúngicas en la muestra y de la purificación del ADN que esté libre de inhibidores de la PCR.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo del chile manzano presenta diferentes retos aun por superar como: eficientes sistemas de producción, reducido número de variedades, susceptibilidad a problemas de marchitez provocada por hongos, entre otros. Las estrategias que se siguen actualmente para disminuir el daño de esta enfermedad son la modificación del pH de los suelos, surcos elevados que reduzcan el exceso de humedad, una mejor nutrición y uso de fungicidas; sin embargo, se considera que la mejor forma de controlar la marchitez es con el uso de variedades resistentes. No se ha explorado la resistencia a dicho patógeno en la variabilidad genética de las diferentes colectas de la región. Actualmente se sabe que en la región sur del Estado de México se cultivan diferentes colectas, de las cuales, algunas han sido descritas por Martínez (2016), no obstante, no se conoce el grado de susceptibilidad a plagas y enfermedades que pudiera representar el inicio de programas de mejoramiento genético para el desarrollo de nuevos materiales superiores a los ya existentes.

Con base en lo anterior se realizó la presente investigación con el objetivo de evaluar el comportamiento de 16 fenotipos de chile manzano, cultivados en invernadero, a los que se les inocularan los hongos patógenos de importancia agrícola como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* en la Universidad Autónoma del Estado México, a fin de detectar aquellos materiales que ofrecen cierto grado de tolerancia o resistencia.

### 4. HIPÓTESIS

De existir variabilidad genética en diferentes fenotipos de chile manzano entonces éstos pueden mostrar variación en la respuesta a la marchitez de la planta provocada por el complejo fúngico.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Evaluar la variación en la respuesta al daño provocado por el complejo fúngico de la marchitez en dieciséis fenotipos de plantas de chile manzano.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Aislar e identificar morfológica y molecularmente el o los agentes causales de la marchitez en chile manzano
- Determinar la patogenicidad de los microorganismos aislados
- Evaluar el daño ocasionado por el agente causal
- Evaluar la resistencia de colectas de chile manzano a la marchitez

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Localización del experimento

La investigación se llevó a cabo en Centro Universitario UAEM Tenancingo, el experimento se realizó en el invernadero que está ubicado a 18° 58' 05.53" de latitud norte y 99° 36' 50.51" de longitud oeste, y a una altitud de 2068 msnm.



Figura 3. Ubicación del Centro Universitario UAEM Tenancingo en Google earth 2018

### 6.2. Material biológico

#### 6.2.1. Fenotipos

Se utilizaron 16 fenotipos o morfotipos de chile manzano contrastantes en al menos un carácter (los términos fenotipo y morfotipo se usaran en esta investigación de manera indistinta); tres de ellos (M11, M12 y M3) obtenidos de productores (Cuadro 2) y 12 más (M1, M2, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M13,

M14, M15) fueron muestreadas en el mercado Riva Palacio de Tenancingo (Cuadro 3). La información sobre el lugar de procedencia de los fenotipos de Santa Ana y Villa Guerrero fue proporcionada por las señoras a quienes se les compraron los chiles, que característicamente no tienen un local establecido y venden lo que producen en traspatio. Los fenotipos de Coatepec Harinas se compraron en los locales establecidos en el mercado, eligiendo los vendedores que compran los chiles directo con los productores y saben su procedencia, las cuales ya fueron caracterizadas en el Centro Universitario UAEM Tenancingo por Martínez (2016), además se incluyó 1 fenotipo muestreado en Tecomatlan.

### **6.2.2. Colecta de material enfermo**

Se muestrearon y colectaron plantas de chile manzano en los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero, Ixtapa de la Sal y Coatepec Harinas. Dichas plantas presentaban sintomatología de marchitez, y de las cuales se tomó la raíz con 30 cm de tallo y tierra de alrededor de la raíz.

## **6.3. Aislamiento *in vitro* del patógeno**

### **6.3.1. Desinfección del tejido vegetal**

Se tomó tejido de tallo y raíz de las plantas colectadas y se procedió a desinfectarlo de acuerdo al método descrito por López (1984). La muestra se lavó con agua corriente y se cortó en secciones (trozos) de tejido de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup>. En seguida se pasaron los trozos seleccionados a cajas de Petri con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% (v/v) y se dejaron por un minuto y

medio, en seguida se enjuagaron en tres pasos de agua destilada estéril durante 30 segundos cada uno. Después se colocaron en cajas de Petri con papel desecante estéril por un lapso de 24 horas, transcurrido este tiempo se procedió a colocar el tejido en medio de cultivo específico bajo condiciones asépticas.

### **6.3.2. Siembra del tejido vegetal en medio de cultivo**

Para el aislamiento del patógeno el tejido vegetal desinfectado se sembró de acuerdo a López (1984), en una caja de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para hongos y para oomicetos de acuerdo a López (2009), en 20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimarcina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L<sup>-1</sup> de ampicilina, en agua destilada (Medio de cultivo 3P). Se colocaron cinco trocitos de raíz y tallo, separados uno de otro, y se incubaron a una temperatura de 24°C bajo obscuridad. Las siembras se revisaron cada 24 horas para observar el crecimiento y desarrollo del hongo. Una vez crecido el hongo, trocitos del medio de cultivo con micelio se tomaron del margen externo de la cepa y se transfirieron a otra caja con medio de cultivo. Después de cinco días se transfirieron nuevamente a cajas de Petri con medio de cultivo para la obtención de cultivos puros.

En el caso de las muestras de suelo, el aislamiento se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Hendrix y Campbell, (1970), se utilizaron manzanas verdes Granny Smith como trampas vegetales para oomicetos, las cuales se lavaron con alcohol; a cada manzana se le realizaron 4 perforaciones de 10 mm

de diámetro y 15 mm de profundidad con un sacabocados estéril. Se rellenaron las perforaciones con la muestra de suelo correspondiente y se saturaron con agua destilada estéril, cubriéndose con cinta adhesiva. Las manzanas se incubaron a temperatura ambiente hasta observar la aparición de lesiones, de las cuales se extrajeron pequeños trozos de tejido infectado y se sembraron en medio 3P. Puntas de hifa de las colonias se transfirieron a medio de cultivo PDA.

### **6.3.3. Purificación *in vitro* del patógeno**

Al observar crecimiento de diferentes colonias se procedió a obtener cultivos puros, es decir que contiene solo el organismo de interés. Muestras de pequeñas secciones de cada una de las diferentes colonias se revisaron previamente para comprobar la ausencia de contaminantes y posteriormente se separaron y transfirieron con aguja flameada a nuevas cajas de Petri con medio PDA. Este proceso se repitió hasta obtener un cultivo puro. Las colonias puras se dejaron crecer hasta que el hongo desarrolló estructuras reproductivas que permitieron su identificación morfológica.

### **6.3.4. Cultivos monospóricos**

Una vez que se obtuvieron los cultivos puros se procedió a realizar cultivos de una sola espora denominados monospóricos, para lo cual por cada aislamiento se tomaron colonias de siete días de edad, de las cuales se preparó una suspensión de conidios para lo cual se aplicaron 10 mL de agua destilada estéril a cada caja de Petri, con una varilla de aluminio estéril se llevó a cabo el raspado de cada una

de las colonias, esto con la finalidad de liberar los conidios. En seguida se tomó 1 mL y se aplicó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, se agitó con un vortex por 15 segundos, se tomó 1 mL y se aplicó en un segundo tubo, este proceso se realizó hasta llegar al tubo 5. Los tubos 1 y 2 se eliminaron por tener una mayor concentración de esporas. Los tubos 3, 4 y 5 se agitaron vigorosamente con vortex por 15 segundos y se tomó 1 mL de cada uno, se aplicó en una caja de Petri con medio de cultivo PDA (todos por separado) y se procedió a extenderlo con una varilla de aluminio esterilizada. Se procedió a incubar a 25°C bajo oscuridad. Dos días después se observó bajo microscopio estereoscópico la germinación de las esporas, las cuales fueron transferidas de manera individual a cajas de Petri con medio de cultivo PDA.

#### **6.3.5. Cultivo de punta de hifa**

Para aquellos patógenos ya sean hongos u oomicetos que no generan conidios se realizaron cultivos de punta de hifa, para lo cual se cultivaron en agar agua, esto con la finalidad de que el micelio creciera separado. Una vez que se observó el crecimiento micelial se observó bajo microscopio estereoscópico y con un alfiler se tomó cuidadosamente la punta de una hifa, la cual se cultivó en medio de cultivo PDA, se procedió a incubar a 25°C bajo oscuridad.

#### **6.3.6. Velocidad de crecimiento micelial**

De cultivos monospóricos y de punta de hifa se realizaron cinco repeticiones, y se procedió a trazar el crecimiento radial cada 24 horas. Una vez que el micelio llenó

la caja de una de las repeticiones, se detuvo la medición para cada especie. El crecimiento se midió en  $\text{cm}^2$  con el programa ImageJ, Versión 1.43u. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal por la pendiente de su curva para determinar la velocidad de crecimiento con el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016). La esporulación se midió con un hematocitometro, y se procedió a seleccionar para cada especie aquella sepa con mejor velocidad de crecimiento y mayor esporulación para aquellas que generaron conidios.

#### **6.4. Pruebas de patogenicidad *in vitro***

Para el caso de la colonia de hongos que generó esporas, la patogenicidad se determinó de acuerdo a Apodaca *et al.* (2001). De cultivos monospóricos se obtuvieron colonias de siete días de edad en cajas de Petri con medio de cultivo PDA, de las cuales se hizo una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , a cada caja de Petri se le aplicó 10 mL de agua destilada estéril y con una varilla de aluminio estéril se llevó a cabo el raspado con la finalidad de liberar los conidios para cuantificarlos en un hematocitómetro.

Para aquellas colonias que no generaron esporas se procedió a aplicar 20 mL de agua destilada estéril en una caja de Petri con la colonia de interés, en seguida con una varilla estéril se realizó raspado para obtener una suspensión de micelio. Semillas del fenotipo tres de chile manzano se desinfectaron en NaOCl 2% por 10 segundos y se enjuagaron en tres pasos de agua destilada estéril, posteriormente se sumergieron en la suspensión de conidios y micelio durante 10 minutos, en seguida se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Agua. Cada

cepa obtenida de cultivos monosporicos y de punta de hifa, fue considerada un tratamiento, de las que se tuvo 5 repeticiones que constaron de 10 semillas. El testigo consistió de semillas desinfectadas y sumergidas en agua destilada estéril. A partir del primer día después de la inoculación se observaron las semillas, al haber germinado se registraron los síntomas de radícula e hipocótilo, en el décimo día se evaluó la incidencia y severidad de acuerdo a Herrera, (2012). Se determinó la incidencia de la enfermedad expresada en porcentaje, mediante la relación (Número de plantas enfermas / Número de plantas totales) x 100. Como indicadores de la severidad se usaron la longitud de las lesiones visibles y la altura de la plántula, así como el porcentaje en la longitud de la plántula ocupada por la lesión  $[(\text{longitud de la lesión}/\text{longitud de la plántula}) \times 100]$  y los valores obtenidos se promediaron dentro de cada unidad experimental. Los datos de severidad e incidencia se sometieron a análisis de varianza ( $\alpha=0.05$ ) y comparación de medias Duncan, todos ellos con los programas estadísticos Info Stat®.

### **6.5. Interacción patógeno-patógeno**

Semillas del fenotipo tres se desinfectaron con NaOCl 2% durante 10 segundos y se enjuagaron en tres pasos de agua destilada estéril, posteriormente se sembraron en un tubo de ensayo que contenía agar agua y se mantuvieron bajo oscuridad a 25°C, al germinar se mantuvieron a 12 horas de luz y 12 de oscuridad a 25°C. A los 10 días de sembradas, siete días de germinadas, se inocularon de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012), técnica modificada ya que los autores mencionan haber aplicado 5 mL de una suspensión de 1000 esporas. Mientras que en esta investigación se aplicaron 100  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{L}$  ò 100  $\mu\text{L}$ ) de una

suspensión de esporas  $1 \times 10^6$  y 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de micelio en forma individual, así como las posibles mezclas de los microorganismos fitopatógenos. Se incubaron a 12 horas de luz y 12 de oscuridad a  $25^\circ\text{C}$  y se observaron cada 24 horas para verificar la severidad del patógeno bajo la siguiente fórmula.

Severidad= (longitud de la lesión/longitud de la plántula)  $\times$  100

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial, donde el modelo estadístico usado fue:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + u_{ijk}$$

con  $i = 1, 2, \dots, a$ ;  $j = 1, 2, \dots, b$ ;  $k = 1, 2, \dots, c$  donde

- $\tau_i$ ,  $\beta_j$  y  $\gamma_k$ : Son los efectos producidos por el nivel  $i$ -ésimo del factor A, ( $\sum_i \tau_i = 0$ ), por el nivel  $j$ -ésimo del factor B, ( $\sum_j \beta_j = 0$ ) y por el nivel  $k$ -ésimo del factor C, ( $\sum_k \gamma_k = 0$ ), respectivamente.
- $(\tau\beta)_{ij}$ ,  $(\tau\gamma)_{ik}$ ,  $(\beta\gamma)_{jk}$  y  $(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ : Son los efectos producidos por las interacciones entre  $A \times B$ ,  $A \times C$ ,  $B \times C$  y  $A \times B \times C$ , respectivamente

$$\sum_i (\tau\beta)_{ij} = \sum_j (\tau\beta)_{ij} = \sum_i (\tau\gamma)_{ik} = \sum_k (\tau\gamma)_{ik} = \sum_j (\beta\gamma)_{jk} = \sum_k (\beta\gamma)_{jk} = \sum_i (\tau\beta\gamma)_{ijk} = \sum_j (\tau\beta\gamma)_{ijk} = \sum_k (\tau\beta\gamma)_{ijk} = 0$$

## 6.6. Inoculación de 16 fenotipos de chile manzano

Se germinaron semillas de los 16 fenotipos en estudio, y al tener cuatro hojas verdaderas se inocularon con el o los patógenos que resultaron ser más severos en el punto anterior. El método de inoculación utilizado fue el descrito por Martínez *et al.* (1996), el cual consistió en lavar la raíz de la plántula, realizar pequeños cortes y sumergirlas en la suspensión  $1 \times 10^6$  conidios/ mL de inóculo durante una

hora. Las plantas inoculadas fueron trasplantadas en vasos de poliestireno de un litro, con sustrato de una mezcla desinfectada de turba y agrolita en proporción de 2:1. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cinco repeticiones.

El modelo lineal para la observación del tratamiento  $i$  en la parcela  $j$ ,  $Y_{ij}$ , ajustado por InfoStat es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

$Y_{ij}$  observación del tratamiento  $i$  en la parcela  $j$

$\tau_i$  efecto del tratamiento  $i$

$\varepsilon_{ij}$  término de error aleatorio asociado a la observación  $Y_{ij}$

La severidad de la enfermedad se evaluó lavando las partes inferiores de la planta (hipocótilo y raíces) bajo el agua del grifo. Se observaron los niveles de infección en las raíces y los hipocótilos, y se evaluó la severidad de la enfermedad según la escala 1-9 desarrollada en el CIAT (Abawi y Pastor-Corrales, 1990) como:

1 = Sin síntomas visibles

3 = Decoloración leve sin lesiones necróticas o con aproximadamente 10 % de los tejidos del hipocótilo y radicular cubiertos con lesiones

5 = Aproximadamente 25 % de los tejidos del hipocótilo y de la raíz cubiertos con lesiones, pero los tejidos permanecen firmes, con cierto deterioro del sistema radicular

7 = Aproximadamente 50 % de los tejidos del hipocótilo y radicular cubiertos con lesiones combinadas con considerable ablandamiento, pudrición y reducción del sistema radicular

9 = Aproximadamente 75 % o más de los tejidos del hipocótilo y de la raíz afectados con etapas avanzadas de pudrición combinadas con una reducción severa en el sistema de raíz.

Los datos se transformaron logarítmicamente para obtener los mínimos cuadrados y se analizaron por el modelo lineal general utilizando InfoStat.

### **6.7. Identificación morfológica de los fitopatógenos**

De las cepas seleccionadas en las pruebas de patogenicidad, se hicieron microcámaras (Figura 4) para observar al microscopio las características morfológicas del agente causal. Con un sacabocados se tomó PDA del cual se colocaron dos trozos por cada portaobjetos, con ayuda de una aguja de disección se tomó una pequeña porción de micelio fitopatógeno y se colocó en el trozo de PDA, en seguida se colocó un cubreobjetos, las preparaciones se mantuvieron bajo oscuridad a 25°C hasta observar el crecimiento del hongo fitopatógeno, finalmente se procedió a observar bajo el microscopio.



Figura 4. Microcámara

Para el primer hongo fitopatógeno, de las estructuras morfológicas observadas; se analizó el tamaño, la forma y formación de 30 microconidios y macroconidios de la sepa seleccionada después de las pruebas de patogenicidad, así como otras posibles estructuras como clamidosporas que son un aspecto característico importante para la identificación. Se procedió a su identificación con el apoyo de claves taxonómicas y literatura especializada (Booth, 1971). Para el segundo hongo fitopatógeno, se midió el largo y ancho de 50 esclerocios, micelio grueso, ángulo de 90°, así como la coloración del micelio. La identificación a nivel género se realizó siguiendo las claves de Singleton *et al*, (1992). Para el tercer patógeno en estudio, se observó crecimiento arrosetado, micelio hialino y cenocítico y toruloso, esporangios ovalados, oogonios y clamidosporas intercalares (Erwin y Ribeiro, 1996).

### **6.8. Identificación molecular de los fitopatógenos**

Se hizo mediante amplificación por PCR de fragmentos de ADN de regiones ITS y posterior consenso en bancos en línea de secuencias. La extracción del ADN se

llevó a cabo con el protocolo de extracción de ADN para hongos método CTAB y ACETATO DE SODIO (Silva *et al.*, 2015), mediante los siguientes pasos:

1. Etiquetar tubos Eppendorf de 2 mL (3 juegos de 2 mL y 1 de 1.5 mL).
2. Precalentar el CTAB 2 % (Tris-HCL 10 mM, pH 8.0, NA<sub>2</sub> EDTA2 H<sub>2</sub>O 20 mM pH 8.0, CTAB NaCL 1.4 M a 80°C) en baño maría.
3. Agregar en un tubo de 2 mL, 1 mL de CTAB y mezclar bien.
4. Incubar a baño maría a 96°C por 60 min, mezclar a intervalos de 10 minutos, se puede utilizar vortex.
5. Centrifugar a 11,000 rpm por 5 minutos, pasar el sobre nadante a tubos nuevos de 2 mL.
6. Agregar 500 µL de cloroformo-alcohol Isoamilico (24:1), agitar por inversión durante 10 minutos y centrifugar a 11,000 rpm por 10 minutos.
7. Transferir la fase acusa a tubo nuevo de 1.5 mL con 950 µL de etanol al 100 % previamente enfriados a -20°C, mezclar muy suavemente por inversión al menos 10 veces. Incubar por al menos 2 horas a -20°C.
8. Centrifugar a 11,000 rpm durante 30 minutos y decantar evitando perder la pastilla.
9. Resuspender la pastilla en 400 µL de agua HPLC e incubar a 55°C por 15 minutos.
10. Añadir 34 µL de NaOAc 3 M y 1 mL de Etanol 95 % e incubar a -20°C por 1 hora.
11. Centrifugar a 11,000 rpm durante 5 minutos y decantar el sobrenadante
12. Lavar con 600 µL de Isopropanol a 700 % y centrifugar por 10 minutos a 11,000 rpm.

13. Secar por al menos 30 minutos. Los lavados dependerán de la coloración de la pastilla.
14. Resuspender la pastilla en 50 ó 100 mL dependiendo del tamaño con agua HLC e incubar a 80°C durante 10 minutos.
15. Extraer solo la parte superior del ADN dejando 10-20 µL del sobrenadante.
16. Agitar con vortex, cuantificar por espectofotometría y almacenar a -20°C.
17. Verificar la calidad del ADN por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %.

#### **6.8.1 Amplificación de fragmentos de ADN por reacción de polimerasa en cadena (PCR)**

Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos y oomicetos con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtaggtgaacctgcg-3' y ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (White *et al.*, 1990); los cuales amplifican un espaciador transcrito interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb) aproximadamente. Esta práctica se realizó con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes fueron: 10 µL de Agua ultrapura, 12 µL de Taq Mix, 1 µL de Primer F, 1 µL de Primer R y 1 µL de ADN. El programa térmico para oomicetos consistió en mantener la temperatura a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 s y una extensión final de 5 min a 72 °C. Y El programa térmico para hongos consistió en mantener la temperatura a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-58 y 60-72 °C durante 30-30-60 s y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.2 %.

### 6.8.2. Secuenciación de fragmentos amplificados.

Productos de PCR se purificaron con el Kit de purificación de productos Bio Basic Inc de la siguiente manera:

1. Añadir 5 volúmenes de Buffer B3 a un volumen de la muestra y mezclar
2. Colocar la muestra en una columna
3. Dejar 2 minutos a temperatura ambiente
4. Centrifugar a 10 000 rpm durante dos minutos
5. Remover el filtrado
6. Agregar 750 µl de solución de lavado
7. Centrifugar a 10 000 rpm durante dos minutos
8. Remover el filtrado
9. Agregar 750 µl de solución de lavado
10. Centrifugar a 10 000 rpm durante dos minutos
11. Remover el filtrado
12. Agregar 750 µl de solución de lavado
13. Centrifugar a 10 000 rpm durante un minuto
14. Transferir la columna a un tubo nuevo
15. Agregar 50 µl de Elution buffer
16. Colocar dos minutos a 37°C en baño María
17. Centrifugar a 10 000 rpm durante dos minutos
18. Almacenar los productos a -20°C

Una vez que se obtuvo el ADN purificado se procedió a llevar muestras de 50  $\mu$  de productos amplificados para su secuenciación en dos direcciones (5' - 3' y 3' - 5') al Laboratorio de Biología Molecular de la FES- Iztacala de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

### **6.8.3. Análisis de secuencia.**

La descarga de las secuencias en formato FASTA fue con el programa Chromas versión 2.6.5 y se compararon con la base de datos del banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) – BLAST (disponible en <https://www.yeastgenome.org/blast-fungal>), el cual permite búsquedas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de múltiples conjuntos de datos de secuencias fúngicas y resultados de consenso e identidad.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Patógenos aislados

Se aislaron tres patógenos asociados a la marchitez del chile manzano, dos hongos y un oomiceto. El primer hongo fitopatógeno con las siguientes características morfológicas: Macroscopicamente se observó micelio aéreo y abundante con un hábito de crecimiento radial y color naranja. Bajo microscopio se observó micelio hialino y septado, microconidios, de forma ovalada, de tamaño promedio  $8.6 \times 4.3 \mu\text{m}$  con 0 ó 1 septos, abundantes en falsas cabeza y en monofialides; macroconidios en menor cantidad, con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie de 3 a 4 septos, de tamaño promedio  $23.8 \times 4.2 \mu\text{m}$ . También se observaron clamidosporas abundantes, terminales o intercalares en la hifa. De acuerdo a la descripción anterior, las claves taxonómicas indicaron que el hongo cultivado es *Fusarium oxysporum* Schlecht (Figura 5) (Booth, 1971; Leslie y Summerell, 2006).

El segundo hongo fitopatógeno mostró micelio con coloración blanca los primeros cuatro días, a partir del quinto día el micelio se tornó café y mostró la presencia de esclerocios. Microscópicamente se logró observar ramificación próxima al septo distal en células vegetativas jóvenes, ángulo de  $90^\circ$ , estrechamiento de hifa y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de  $5-8 \mu\text{m}$  de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro, los cuales son característicos de *Rhizoctonia solani* (Figura 5) (Singlenton *et al.*, 1992; Watanabe, 2002).

Así mismo se aisló un oomiceto, el cual macroscópicamente mostró micelio color blanco, crecimiento arrosetado en medio de cultivo PDA, microscópicamente se observó micelio cenocítico, hialino y toruloso; esporangios ovoides de forma alimonada y poco papilados de 11 a 54  $\mu\text{m}$  de largo y 9 a 36  $\mu\text{m}$  de ancho, clamidosporas intercalares de 9.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, los cuales son característicos de *Phytophthora capsici* (Figura 5) (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008).

Dichos patógenos han sido reportados en *C. annum* como responsables de la marchitez del chile por diferentes autores (Velásquez *et al.*, 2001; López *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 2015). La presencia de estos patógenos se ha reportado en todos los estados productores de chile en México (Redondo 1974; Guigon y González, 2001) y se ve asociada a la intensidad del cultivo en la zona productora del Estado (Cuadro 5).

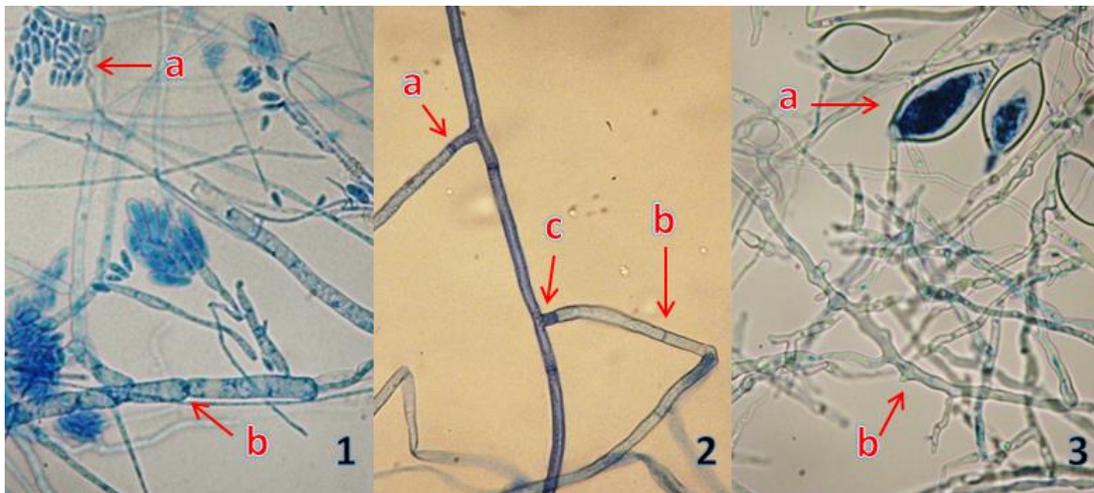


Figura 5. Patógenos causales de la marchitez de *C. pubescens*. 1. *F. oxysporum* a) Microconidios, b) Micelio septado y hialino. 2. *R. solani* a) Septo cercano al punto de origen a la ramificación hifal, b) micelio grueso y septado, c) Angulo de 90°. 3. *P. capsici* a) Esporangios, b) Micelio toruloso.

## 7.2. Velocidad de crecimiento micelial y esporulación

La velocidad de crecimiento se midió hasta que el micelio de una cepa alcanzó los bordes de la caja de Petri. De *F. oxysporum* la cepa de Santa Ana creció más rápido al llenar la caja en seis días; mientras que las de Matlazinca y San Miguel tardaron 12 días. Las colonias de *P. capsici* y *R. solani* tomaron 7 y 5 días respectivamente en llenar la caja de Petri (Cadro 4). Es importante considerar, que se tuvieron colonias diferentes, con variación en las condiciones ambientales, como luz y temperatura, que pudieron influir en un crecimiento micelial diferencial (Nozaki *et al.*, 2004). Hubo crecimiento diferencial en los cultivos monospóricos de *F. oxysporum* y los de punta de hifa de *P. capsici* y *R. solani*, lo cual de acuerdo a Duarte *et al.*, (2016) puede deberse a que los aislamientos que alcanzaron la máxima velocidad en los medios, tienen una mayor tasa de asimilación de los compuestos nutritivos, que en consecuencia *in vitro* pudiera representar una mayor colonización en el suelo (Cuadro 5). Además hubo una correlación baja y negativa ( $r = -0.17$ ) entre las variables crecimiento y esporulación. A este respecto, Lazarotto *et al.* (2014), citan que la luz tiene un efecto directo sobre el hongo, induciendo o inhibiendo la formación de estructuras reproductivas. También los nutrientes presentes en el medio de cultivo, Keller, (2001) menciona que a mayor presencia de carbono, los hongos tienden a generar mayor cantidad de esporas, mientras que a mayor presencia de nitrógeno la tasa de esporulación disminuye, esto debido a que los conidios fúngicos son típicamente ricos en proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, esta variabilidad tiene importancia para la identificación de especies, así como para la determinación de presencia de biotipos en el patógeno.

La incidencia en campo de los microorganismos aislados fue mayor para *F.oxysporum*, seguida de *P. capsici* y finalmente *R. solani* (Cuadro 6). Esta diferencia en incidencia puede deberse a las condiciones climáticas del sitio donde se realizó el muestreo, tamaño de muestra o la etapa fenológica del cultivo en el momento de la colecta (Nelson *et al.*, 1983)

De acuerdo con lo anterior los resultados indican que *P. capsici*, *Fusarium* spp. y *R. solani* están asociados con la enfermedad de la marchitez del chile (Nelson *et al.*, 1983; Velásquez-Valle *et al.*, 2001; Yousaf y Khalid, 2007). Por lo que se consideraron como parte del patosistema para evaluar la resistencia de las colectas de chile a cada uno y a la mezcla de los tres géneros de patógenos.

Cuadro 5. Tiempo de crecimiento radial a límite de caja de Petri

Colonia	Días en llenar la caja		
	<i>F.o.</i>	<i>P.c.</i>	<i>R.s.</i>
Ahuacatitlan	10	X	X
Zarco	10	7	X
Santa Ana	6	X	X
Tepoxtepec	9	X	X
Matlazinca	12	7	X
San Miguel	12	7	X
Potrero	10	7	5
Ixtlahuaca	10	7	X
San Nicolás	9	X	X
Cabañas	X	7	X

*F.o.* *Fusarium oxysporum*, *P.c.* *Phytophthora capsici*,  
*R.s.* *Rhizoctonia solani*

Cuadro 6. Velocidad de crecimiento radial y esporulación en *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*

Localidad		<i>F.oxysporum</i>			<i>P. capsici</i>		<i>R. solani</i>	
Colonia	SC	CP	VC	E	CP	VC	CP	VC
Ahuacatitlan	Baja	3	1.01	1.50x10 <sup>6</sup>				
Zarco	Media	4	1.02	3.94 x10 <sup>6</sup>	4	1.78		
Santa Ana	Baja	3	3.13	2.75 x10 <sup>5</sup>				
Tepoxtepec	Baja	2	1.21	8.34 x10 <sup>6</sup>				
Matlazinca	Media	4	0.37	5.80 x10 <sup>5</sup>	3	1.82		
San Miguel	Media	3	0.28	2.03 x10 <sup>6</sup>	5	2.82		
Potrero	Alta	1	1.13	4.37 x10 <sup>6</sup>	3	1.90	1	6.84
Ixtlahuaca	Alta	5	0.69	9.50 x10 <sup>5</sup>	4	1.72		
San Nicolás	Baja	2	1.46	3.50 x10 <sup>6</sup>				
Cabañas	Media				5	1.86		

SC=Superficie cultivada, CP=Cepa, VC=Velocidad de crecimiento (cm día<sup>-1</sup>), E= Esporulación (Conidios mL<sup>-1</sup>)

### 7.3. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Los aislamientos de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* resultaron patogénicos para las plántulas de chile manzano al mostrar necrosis en ápice de raíz, hipocótilo y/o cotiledones (Figura 6).

En incidencia y severidad para el caso de *F. oxysporum* los síntomas se mostraron 8 días después de la inoculación (ddi) en las colonias Matlazinca, San Miguel y el Potrero, mientras que en Ahuacatitlan los síntomas se presentaron hasta los 12 ddi. Para el caso de las plántulas inoculadas con *P. capsici* y *R. solani* los síntomas se presentaron a los 10 ddi.



Figura 6. A. Daños ocasionados por *F. oxysporum*. a) Testa cubierta con micelio, b) Necrosis en hipocótilo, c) Necrosis en radícula, d) Ápice de radícula necrótico. B. Daños ocasionados por *P. capsici*. a) Hipocótilo necrótico, b) Radícula necrótica con pequeños puntos, c) Ápice ligeramente dañado. C. Daños ocasionados por *R. solani*. A) Hipocótilo necrótico, b) Daño ligero en radícula, c) Ápice radicular necrótico

En incidencia y severidad se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre colonias de *F. oxysporum* (Figura 7) y diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre colonias de *P. capsici* (Figura 8). Para *R. solani* no se encontraron diferencias significativas (Figura 9). Las variaciones en incidencia y severidad entre colonias sugieren heterogeneidad como producto posible de la dispersión natural del patógeno (Guzmán-Plazola *et al.*, 2011). Además de que en el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. y otros hongos se

utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en este grupo se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. Sin embargo, es probable que estos fungicidas sean agentes mutagénicos de las plantas, por lo que pudieran incrementar el grado de resistencia de los patógenos ante su efecto (Agrios, 2005). El uso constante de agroquímicos trae como consecuencia la resistencia de *P. capsici* (Silva-Rojas *et al.*, 2009). Se observaron correlaciones bajas entre incidencia y severidad de  $r = 0.11$ ,  $0.07$  y  $-0.05$  para *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* respectivamente, dejándolos prácticamente como eventos separados. Marshall y Rush (1980) citan que, la severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la formación de estructuras de infección estimulada por el hospedante. Además, los patógenos fúngicos inducen síntomas, la severidad de los mismos puede variar dependiendo sobre los niveles de resistencia o susceptibilidad de las especies o cultivares huéspedes, factores y virulencia (agresividad) del patógeno.

Las 9 colonias de *F. oxysporum* mostraron variabilidad en crecimiento micelial y esporulación. Sin embargo, las colonias de Tepoxtepec, el Zarco y Ahuacatitlan presentaron un alto porcentaje de plantas infectadas, pero no se ubican entre las más destacadas respecto al crecimiento y la esporulación; lo que sugiere que estos caracteres cualitativos no presentaron estrecha relación con la patogenicidad de los mismos.

Así mismo, en las colonias de *F. oxysporum*, *P. capsici* se detectó variabilidad entre aislamientos de una misma especie, lo que sugiere la posible existencia de biotipos, aspectos en los que se debe profundizar en estudios posteriores, ya que

refleja la intensa evolución que está sucediendo en dichos géneros y la variedad de patógenos capaces de afectar al cultivo del chile manzano. Tal es el caso de *B. cinerea*, patógeno que es complejo debido a su gran flexibilidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales. Esta variabilidad se manifiesta en su inestabilidad fenotípica (Yourman *et al.*, 2000), ploidía (Büttner *et al.*, 1994), morfología (Chardonnet *et al.*, 2000), patogenicidad (Van der Vlugt-Bergmans, 1993) y polimorfismo de ADN (Alfonso *et al.*, 2000; Moyano *et al.*, 2003).

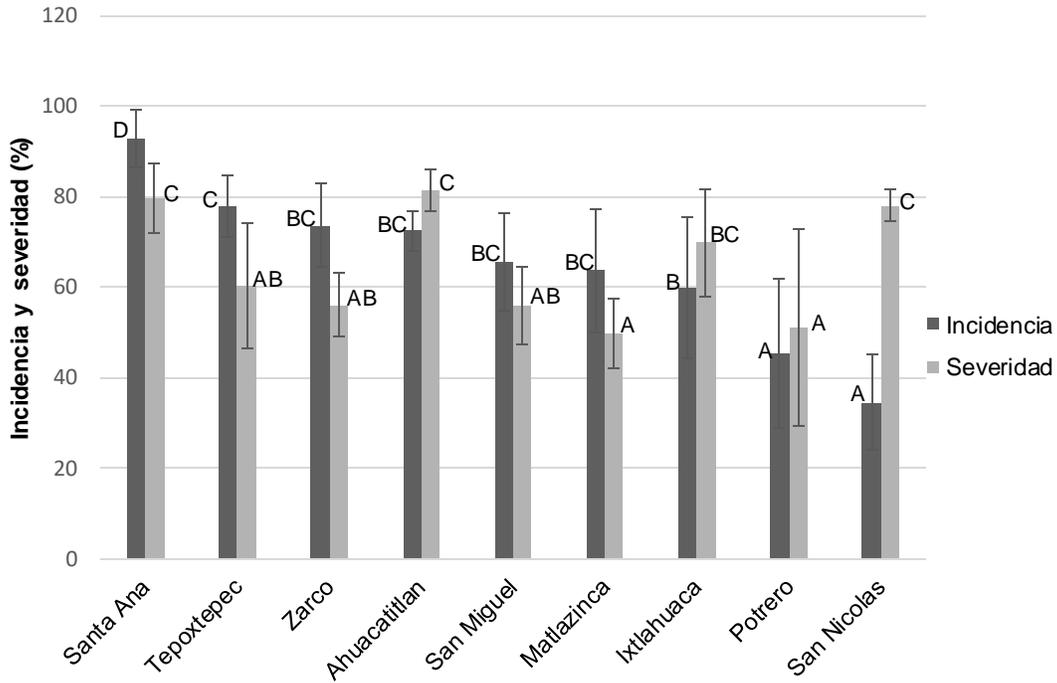


Figura 7. Incidencia y severidad de *F.oxysporum* en plántulas de chile manzano. Barras de error indican la desviación estándar. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente.

VARIACIÓN DE FENOTIPOS DE *Capsicum pubescens* EN LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ

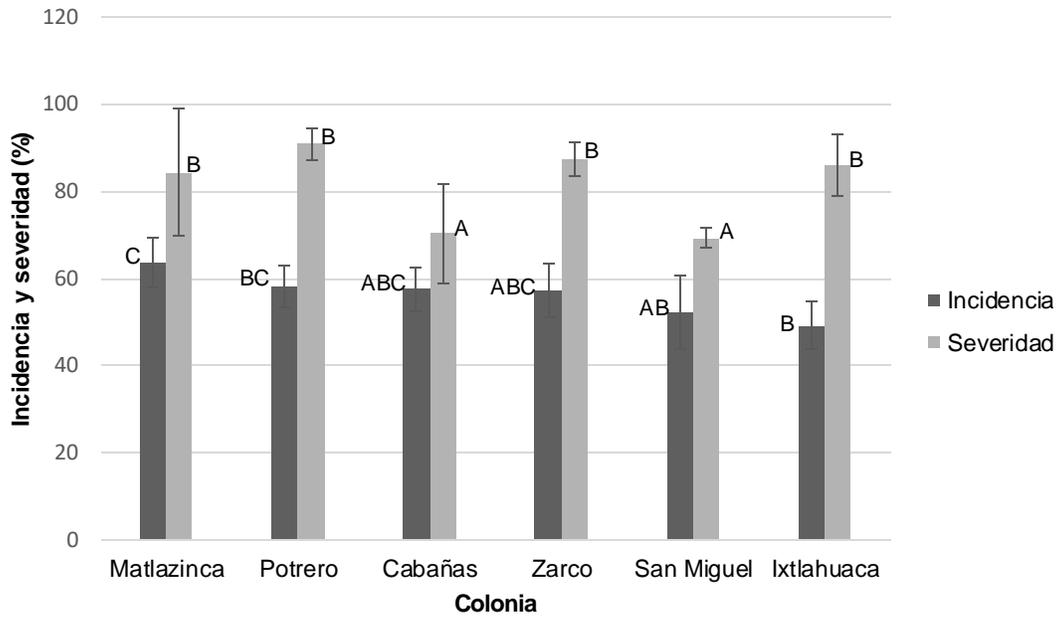


Figura 8. Incidencia y severidad de *P. capsici* en plántulas de chile manzano. Barras de error indican la desviación estándar. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente.

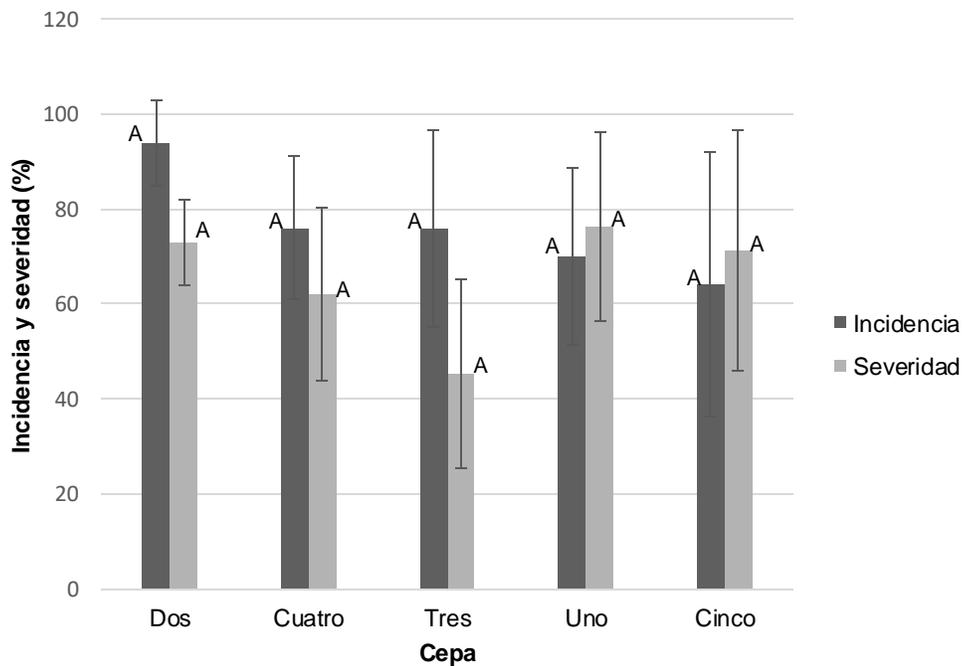


Figura 9. Incidencia y severidad de *R. solani* en plántulas de chile manzano. Barras de error indican la desviación estándar. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente.

#### 7.4. Interacción del patógeno en plántulas de chile manzano

Los síntomas ocasionados por los patógenos empezaron a manifestarse a los tres días después de la inoculación (ddi), sin embargo, cinco ddi las plántulas inoculadas con *P. capsici* murieron (Cuadro 7). En el cuadro se puede observar que *F. oxysporum*, *P. capsici* y *F. oxysporum* + *P. capsici* son los que ocasionan mayor daño. De acuerdo a Sanzón *et al.* (2012), plántulas inoculadas con *P. capsici* muestra síntomas de necrosamiento 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) y a los 5 días posteriores a la inoculación (dpi) todas las plantas mueren debido a la presencia de micelio y esporangios a lo largo del tallo, lo cual evidencia que el avance del patógeno no se detiene, ocasionando así la muerte de la planta. En el caso de *F. oxysporum* a los 48 horas posteriores a la inoculación (hpi) las células muestran mayor acumulación de polifenoles ocasionando que las células en contacto con ellos se degraden total o parcialmente. La degradación de las paredes celulares posiblemente se debe a la actividad de enzimas líticas producidas por estos patógenos (Roncero *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2010), y a que los mecanismos de defensa de las plantas no se dispararon tan rápido ni con la magnitud necesaria para defenderse del ataque por el patógeno (Sanzón *et al.*, 2012).

VARIACIÓN DE FENOTIPOS DE *Capsicum pubescens* EN LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ

Patógeno	3ddi							5ddi							
	Síntomas	F	P	R	F+P	F+R	P+R	F+P+R	F	P	R	F+P	F+R	P+R	F+P+R
acc												X			
clc	X			X	X		X						X	X	
cc									X						X
crc											X				
cln												X			
cm										X					
nlh	X				X	X							X	X	X
nh		X							X		X				
pnlh			X												
pnh				X	X		X								
hm										X		X			
arn	X								X	X	X				
nlr	X		X	X	X	X	X						X		X
nr		X							X		X				
rsan					X	X									
rm										X		X		X	

Cuadro 7. Síntomas ocasionados por microorganismos fitopatógenos en plántulas de chile manzano. F= *F. oxysporum*; P= *P. capsici*; R= *R. solani*; F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*; F+R= *F. oxysporum* + *R. solani*; P+R= *P. capsici* + *R. solani*; F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*; acc= ápice de cotiledones cloróticos; clc= cotiledones ligeramente cloróticos; cc= cotiledones cloróticos; crc= cotiledones rizados y cloróticos; cln= cotiledones ligeramente necróticos; cm= cotiledones muertos; nlh= necrosis; ligera en hipocótilo; nh= necrosis en hipocótilo; pnlh= puntuaciones necróticas ligeras en hipocótilo; pnh= puntuaciones necróticas en hipocótilo; hm= hipocótilo muerto; arn= ápice de raíz necrótico; nlr= necrosis ligera en raíz; nr= necrosis en raíz; rsan= raíces secundarias con ápices necróticos; rm= raíz muerta.

En el caso de *F. oxysporum* + *P. capsici* y *R. solani* + *P. capsici* se logra observar que la respuesta provocada por un patógeno modifica la presencia del otro, esta interacción compleja, o mejor conocida como coinfección tiende a alterar el curso de la enfermedad, ya que los patógenos coexistentes entran en competencia por crecimiento y por los nutrientes en el mismo huésped, y la nutrición subóptima conduce a la competencia por la cual algunas especies pueden dominar (Monod, 1949, Abdullah *et al.*, 2017). No obstante, la gravedad y el tipo de competencia se

determinan por el consumo de nutrientes a lo largo del tiempo (Adee *et al.*, 1990; Chesson, 2000) (Figura 10).



Figura 10. Daños ocasionados 5 ddi por: F) *F. oxysporum*, R) *R. solani*, P) *P. capsici*, P+R) *P. capsici* + *R. solani*, F+R) *F. oxysporum* + *R. solani*, P+F) *P. capsici* + *F. oxysporum* y P+F+R) *P. capsici* + *F. oxysporum* + *R. solani*.

El proceso infeccioso después de la inoculación fue acelerado tanto individual como combinado, al manifestarse simultáneamente los síntomas a los tres días,

lo que sugiere que no hay competencia aparente entre microorganismos en el proceso inicial de infección. De acuerdo a Ristaino y Johnston (1999), *P. capsici* causa la enfermedad conocida como marchitez del chile más devastadora a nivel mundial, lo cual se puede demostrar en estos resultados, ya que *P. capsici* sólo, afecta las plantas ocasionando la muerte total en 5 días (Figura 10), sin embargo se redujo la patogenicidad de *P. capsici*, cuando se combinó con *F. oxysporum* y *R. solani* y se inocularon sobre plantas de chile manzano, caso similar reportado por Abdullah *et al.*, 2017 para *Capsicum frutescens*. Sin embargo, la patogenicidad se reduce al inocular *F. oxysporum* + *R. solani*, lo cual puede ser resultado de una competencia por nutrientes por parte de los patógenos (Abdullah *et al.*, 2017) (Figura 11), ya que las coinfecciones afectan la transmisión de ambos patógenos en una población y la virulencia de los patógenos, lo que influye dinámicamente en la enfermedad (Alizon *et al.*, 2013). Los valores de severidad promediados a partir del tercer día (Figura11), denotaron una variación significativa entre tratamientos, marcando también a *P. capsici* como el más severo.

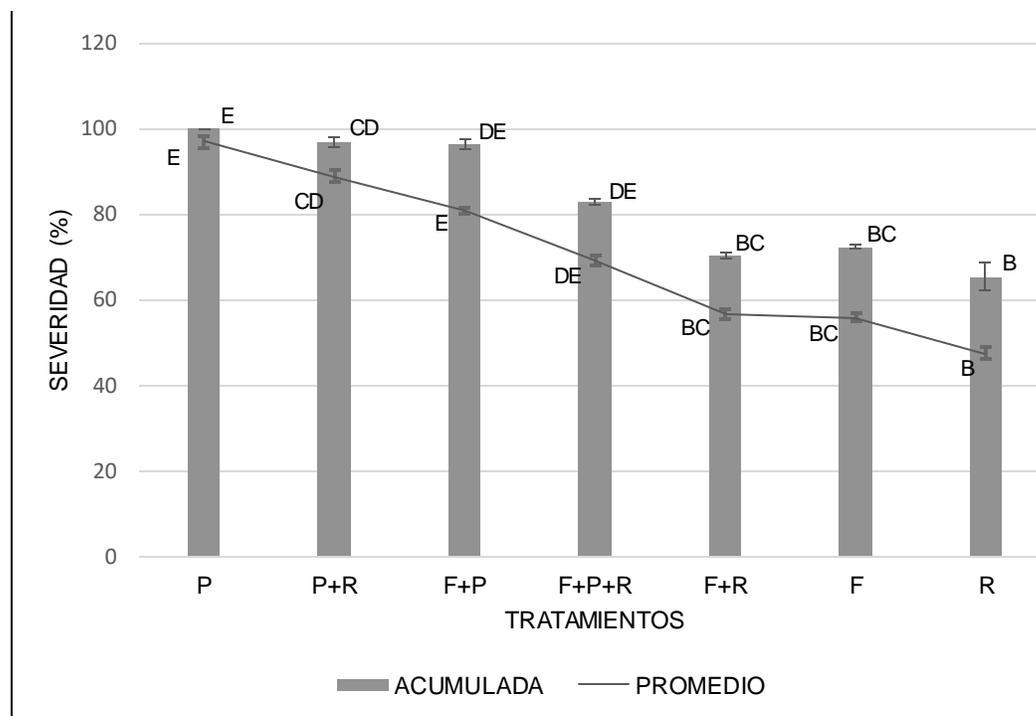


Figura 11. Patogenicidad acumulada y promedio de hongos en 5 días después de la inoculación en plantas de chile manzano. P= *P. capsici*, P+R= *P. capsici* + *R. solani*, F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*, F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, F= *F. oxysporum* y R= *R. solani*. Barras de error son error estándar.

### 7.5. Inoculación de 16 fenotipos de chile manzano

**Descripción de síntomas.** Los síntomas se presentaron 15 ddi. En el caso de *P. capsici* las plantas mostraron flacidez en la parte aérea y necrosis en la corona del tallo. *R. solani* presentó síntomas como clorosis en la parte aérea y necrosis en raíz, en el caso de plántulas con daño más avanzado, la radícula presentó estrangulamiento, lo cual concuerda con (Romero, 1993), al mencionar que *R. solani* provoca una pudrición no compacta, por lo que se desprende la epidermis. Mientras que las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron síntomas como clorosis y en ocasiones rizado en follaje y necrosis en radícula. En la combinación de *F. oxysporum* + *P. capsici* se observó en las plántulas inoculadas clorosis foliar y marchitez, así como necrosis en corona del tallo y radícula. En plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* se observó clorosis

en hojas, corona del tallo necrótica y radícula necrótica. De acuerdo con Velásquez-Valle *et al.* (2001) el síntoma inicial más evidente es una ligera flacidez foliar, que es más notable al avanzar el día, así como un ligero amarillamiento del follaje. Mismo autor señala nueve tipos de síntomas producidos o asociados aparentemente con los patógenos anteriormente mencionados: defoliación, cambios en el color y rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, maduración prematura y/o irregular de frutos, pudrición de la raíz principal, necrosis de raíces secundarias, presencia de rebrotes y presencia de malformaciones como constricción de nudos o ramas dobles o unidas. De los cuales en la presente investigación se lograron detectar cuatro síntomas debido a que se trabajó con plántulas: defoliación, cambios en el color y rizado del follaje, pudrición de la raíz principal, necrosis de raíces secundarias. Estos síntomas se asociaron con la podredumbre de la raíz y ablandamiento de las puntas de las raíces, lesiones de la raíz que varían en tamaño y color, de rojizo a marrón y negro, recorte de la raíz y pudrición (Jung *et al.*, 1999, Hamon *et al.*, 2011).

La mayoría de los fenotipos mostraron los síntomas, sin embargo para el caso de *F. oxysporum* se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) en los fenotipos 8 y 9, los cuales mostraron resistencia a dicho patógeno. En el caso del fenotipo 8, en plántulas inoculadas con *R. solani* se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ), la cual mostró resistencia a dicho patógeno. Mientras que para *P. capsici* mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ); sin embargo para el caso de *F. oxysporum* + *P. capsici* mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ), siendo este fenotipo tolerante a dichos patógenos.

Contrastante a *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* donde se lograron apreciar diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) para el cual el fenotipo mostró ser tolerante al complejo patogénico (Figura 12). De acuerdo a Martínez (2016), el fenotipo 8 cuenta con características de especies silvestres, lo cual le da peso a este fenotipo ya que la resistencia génica presente en plantas criollas y silvestres de Chile, representan un gran acervo de genes que confieren resistencia o tolerancia contra dichos patógenos (Hernández *et al.*, 1998).

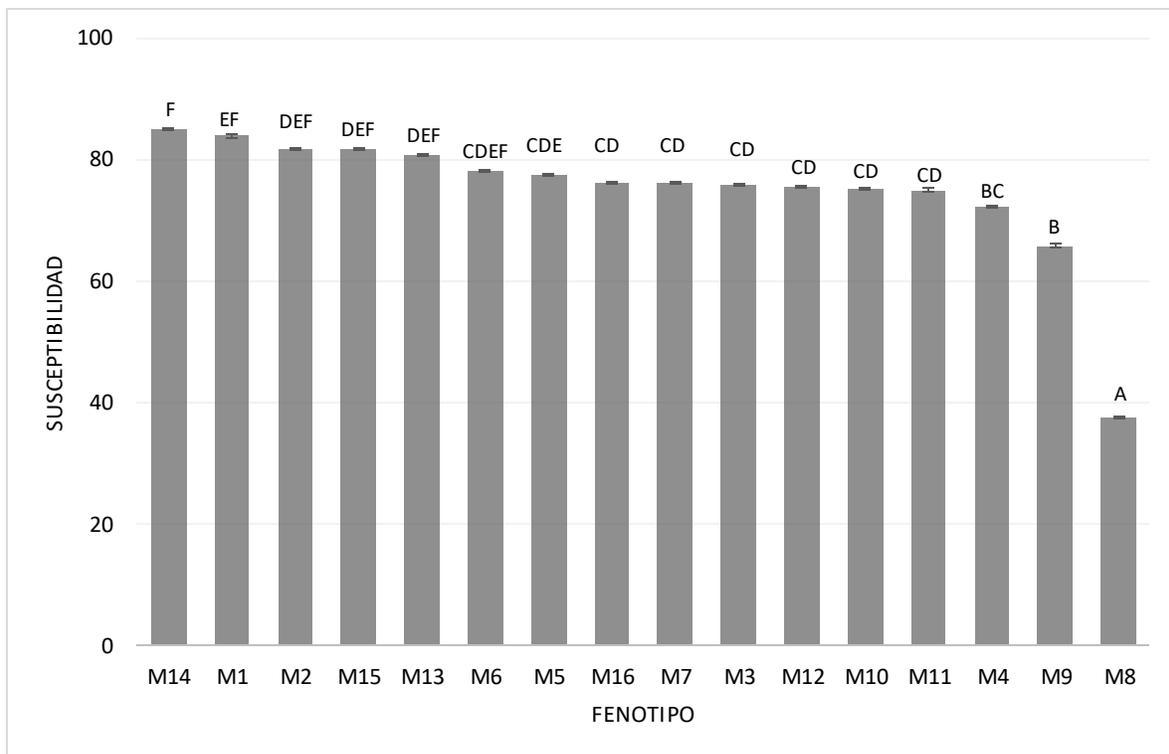


Figura 12. Eficiencia en tolerancia, obtenida de promedio de 16 fenotipos de Chile manzano. M= Fenotipo. Barras de error corresponden a error estándar.

Los fenotipos 8 y 9 que presentan resistencia a *F. oxysporum* y *R. solani*, son una fuente genética importante para el control de la marchitez; sin embargo, el éxito en el control de esta enfermedad podría depender de la incorporación de resistencia a *P. capsici*, ya que dicho patógeno se encuentra presente en gran

parte de las localidades analizadas. Por otra parte, el haber encontrado fenotipos tolerantes a *F. oxysporum*, *R. solani* y las combinaciones de los tres patógenos, indica la existencia de mecanismos de defensa propios contra cada uno de los hongos presentes, así como en el síndrome ocasionado por la interacción de los tres géneros. Por lo tanto, es probable la presencia de mecanismos de resistencia en común e individuales a los tres patógenos (Anaya-López, 2011) (Figura 13).

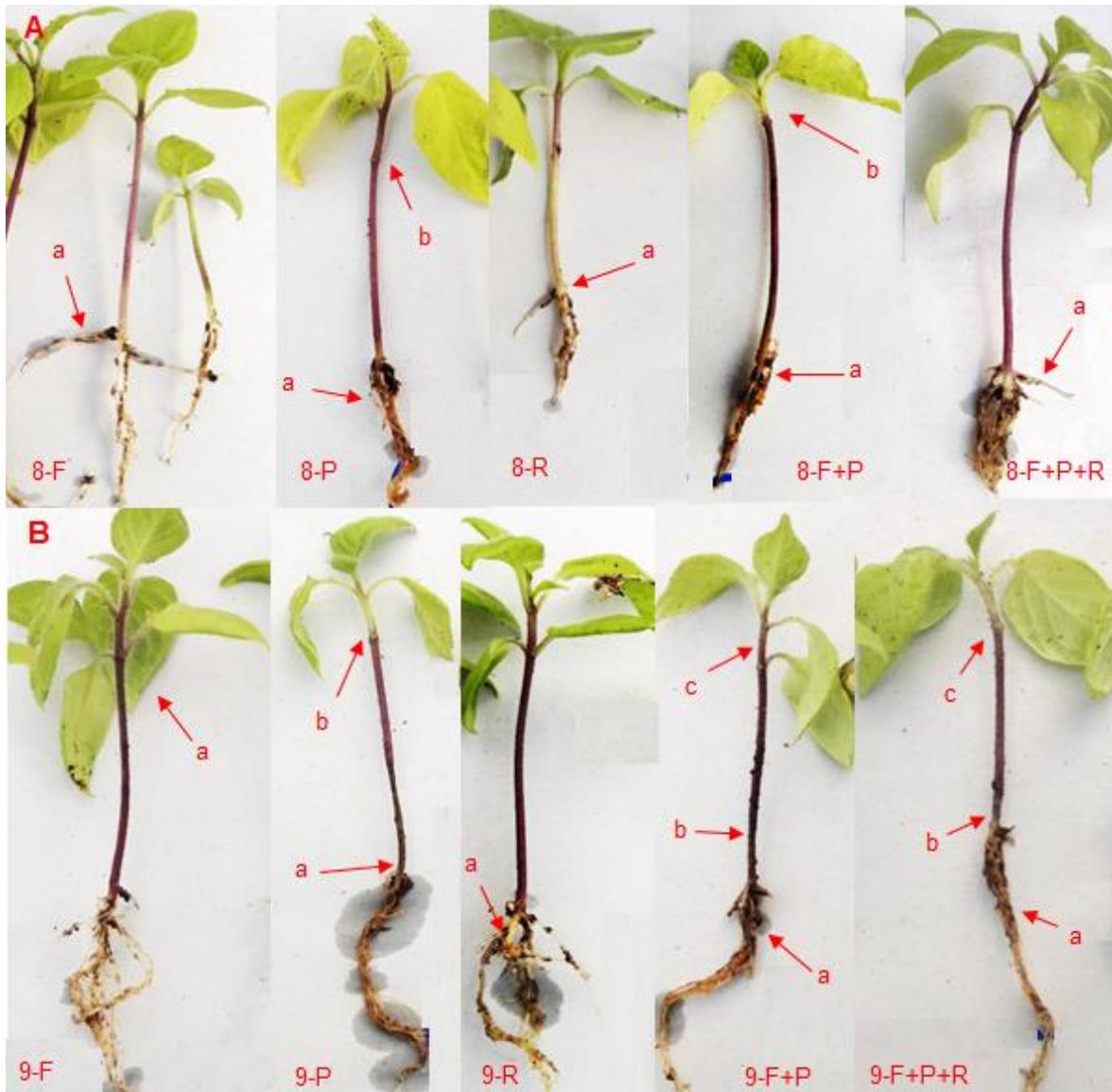


Figura 13. Daños ocasionados por los patógenos causales de la marchitez. 8-F. Fenotipo 8 inoculado con *F. oxysporum*, a) producción de raicesillas; 8-P. Fenotipo 8 inoculado con *P. capsici*, a) raíz necrótica, b) defoliación; 8-R. Fenotipo 8 inoculado con *R. solani*, a) producción de raicesillas; 8-F+P. Fenotipo 8 inoculado con *F. oxysporum* + *P. capsici*, a) raíz necrótica, b) defoliación; 8-F+P+R. Fenotipo 8 inoculado con *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, a) producción de raicesillas nuevas. 9-F. Fenotipo 9 inoculado con *F. oxysporum*, a) clorosis foliar; 9-P. Fenotipo 9 inoculado con *P. capsici*, a) raíz y corona necróticos, b) defoliación; 9-R. Fenotipo 9 inoculado con *R. solani*, a) necrosis en raíz; 9-F+P. Morfotipo 9 inoculado con *F. oxysporum* + *P. capsici*, a) raíz necrótica, b) corona necrótica, c) defoliación; 9-F+P+R. Fenotipo 9 inoculado con *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, a) raíz necrótica, b) corona necrótica, c) defoliación.

## 7.6. Identificación Molecular de los patógenos

### 7.6.1. ADN de microorganismos

Se verificó la presencia de ADN de las extracciones hechas por el método CTAB en gel de agarosa al 1.2 % (Figura 14). La visualización fue tenue, sin embargo fue suficiente para hacer amplificación de fragmentos específicos para identificación por huella genómica de los microorganismos previamente caracterizados morfológicamente.

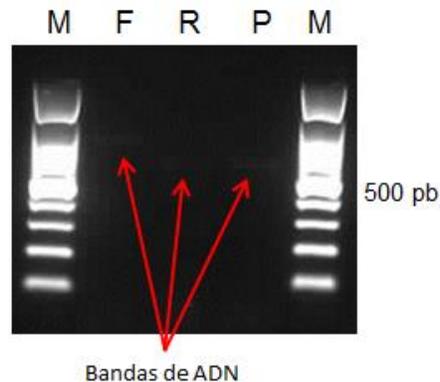


Figura 14. Electroforesis en gel de 1.2% agarosa en TBE para ADN de extracciones. F= *F. oxysporum*, R= *R. solani* y P= *P. capsici*; carriles M es el marcador molecular de 100 pb.

### 7.6.2. Amplificación de fragmentos de ADN por reacción de polimerasa en cadena (PCR)

De la PCR de los fragmentos se observó amplificación para los tres microorganismos, sin embargo para *F. oxysporum* y *R. solani*, no fue específica al observar fragmentos adicionales al esperado (Figura 15). El programa de termociclador fue el propuesto por Díaz-Nájera (2015). Para la obtención de la banda específica, los productos de PCR fueron amplificados nuevamente con los cebadores ITS-1fu 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3', y con la modificación de 55°C para *R. solani* y de 55°C a 60°C para *F. oxysporum*. Los fragmentos de ADN amplificados muestran diferencias en tamaño, dependiendo del organismo. El fragmento amplificado de *F. oxysporum* mostró

peso molecular de 900 pares de bases (pb), mientras que *P. capsici* y *R. solani* en carril 2 y 3 respectivamente, muestran peso aproximadamente de 700 pb (Figura 16).

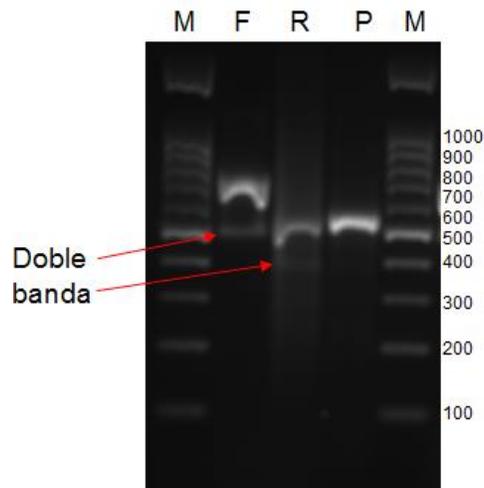


Figura 15. Electroforesis en gel de 1.2% agarosa en TBE para productos amplificados de ADN no específicos. F= *F. oxysporum*, R= *R. solani* y P= *P. capsici*; carriles M es el marcador molecular de 100 pb.

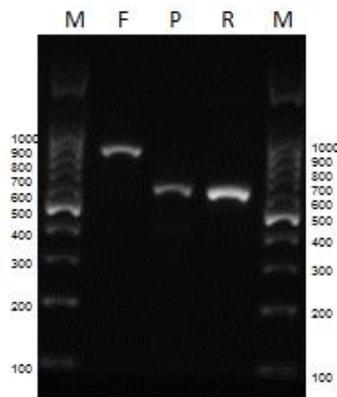


Figura 16. Electroforesis en gel de 1.2% agarosa en TBE para productos amplificados de ADN ITS de F= *F. oxysporum*, P= *P. capsici* y R= *R. solani*; carriles M es el marcador molecular de 100 pb.

### 7.6.3. Secuenciación de fragmentos amplificados

Los cebadores ITS permitieron la amplificación de fragmentos de 700 a 900 pares de bases de las muestras de las cepas analizadas. Por alineamiento la secuencia de la cepa de *F. oxysporum* se empalmo con la secuencia de *F. oxysporum* f.sp.

*lycopersici* accesión CM000593.1 del banco de genes de FungiDB, con fragmentos de la región 248 a 270, que corresponden a una secuencia parcialmente de las regiones rADN-ITS. Dichas secuencias mostraron un 88% de identidad en nucleótidos (Figura 17).

De acuerdo a FungiDB los aislados que causan la marchitez vascular del tomate (*Solanum lycopersicum*) es *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y el primer genoma secuenciado dentro del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC) fue *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2 y grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) 0030. Sin control de enfermedades, los miembros de FOSC tienen el potencial de causar pérdidas severas de cultivos en campos, plantaciones e invernaderos. El genoma preliminar del *Fusarium oxysporum* fue secuenciado, anotado e informado por el Broad Institute.

F-1	248	AAAGATTTACTTTGAAGAATTCA	270
Accesión	820885	AAAGAGTTACTTTGAAGAACTCA	820863

Figura 17. Alineamiento y consenso de *F. oxysporum* de fragmentos amplificados que se empalmaron con secuencias de la accesión número CM000595.1 del banco de genes de FungiDB.

Por alineamiento la secuencia de la cepa de *P. capsici* se empalmo con la secuencia de *P. capsici*\_ LT1534, versión 11, accesión PcapLT1534\_SC064 del banco de genes de FungiDB, con fragmentos de la región 146 – 259, que corresponden a una secuencia parcial de las regiones rADN-ITS. Dichas secuencias mostraron un 83% de identidad en nucleótidos (Figura 18).

VARIACIÓN DE FENOTIPOS DE *Capsicum pubescens* EN LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ



Figura 18. Alineamiento y consenso de *P. capsici* de fragmentos amplificados que se empalmaron con secuencias de la accesión número PcapLT1534\_SC064 del banco de genes de FungiDB.

La anotación v11.0 (20 de agosto de 2010) del ensamblaje v11.0 fue producida por JGI Annotation Pipeline, utilizando una variedad de predictores de genes basados en cDNA, basados en proteínas y ab initio. Después de filtrar por EST y soporte de homología de proteínas, se anotaron un total de 19805 genes estructural y funcionalmente.

De acuerdo a FungiDB *Phytophthora capsici* es un patógeno de plantas que infecta pepino, calabaza, melones, calabaza, pimiento, tomate y berenjena y recientemente se ha descrito en los granos y lima. En los EE. UU. La incidencia y la gravedad de las epidemias se han incrementado de forma espectacular. Una vez que *P. capsici* se introduce en un área agrícola, el inóculo inactivo en forma de oosporas sexuales de pared gruesa puede permanecer viable durante muchos años. La rotación de cultivos y las aplicaciones químicas a menudo no proporcionan un control adecuado y las pérdidas pueden alcanzar el 100%. Para muchos productores estadounidenses de vegetales, *P. capsici* es el factor limitante más importante.



## 7.7. ARTÍCULO

### Respuesta de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez

#### Response of *Capsicum pubescens* to damage caused by the fungal complex of marchitez

**Alma Janeth Vallejo-Gutiérrez, Jaime Mejía-Carranza\*, Rómulo García-Velasco,** Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Km. 1.5. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Tenancingo Estado de México, C.P. 52400, México; **Marithza Guadalupe Ramírez-Gerardo,** División de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero, Carretera Federal México-Ixtapan de la Sal km 64.5. La Finca, Villa Guerrero, Estado de México. C.P. 51760, México. \*Autor de correspondencia: jmejia@uaemex.mx

#### Resumen

En el sur del Estado de México el chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es un cultivo económicamente importante, sin embargo, es afectado por la “marchitez”, enfermedad de raíz que provoca la muerte de la planta. El objetivo de esta investigación fue identificar los patógenos y evaluar la variación en respuesta al daño del complejo fúngico de la marchitez en 16 fenotipos (M1-M16) de chile manzano. Se sembraron segmentos de plantas infectadas en medio de cultivo PDA y 3P. De las colonias obtenidas se identificaron morfológica y molecularmente a los patógenos. Para evaluar la interacción patógeno-planta, se inocularon los patógenos solos y sus combinaciones en *C. pubescens*. Se encontraron tres patógenos como responsables de la marchitez, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, en los que hubo diferencias en severidad e incidencia entre colonias de *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$ ), y de *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ). Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) en patogenicidad entre *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*, y combinaciones de los mismos. La variación en la resistencia encontrada en fenotipos de *C. pubescens* es de hasta el 50 %, ésta puede ser aprovechada en el mejoramiento genético para el desarrollo de materiales resistentes.

**Palabras clave:** chile manzano, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, incidencia, severidad.

### Abstract

In the south of the State of Mexico the manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.) is an economically important crop, however, it is affected by the "wilt disease", root disease that causes the death of the plant. The objective of this research was to identify the pathogens and to evaluate the variation in response to the damage of the fungal complex of wilt in 16 phenotypes (M1-M16) of manzano pepper. Segments of infected plants were seeded in PDA and 3P culture medium. From the colonies obtained, pathogens were identified morphologically and molecularly. To evaluate the pathogen-plant interaction, the pathogens were inoculated alone and their combinations in *C. pubescens* plants. Three pathogens were found responsible for wilt, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*, among which there were differences in severity and incidence between colonies of *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$ ), and *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ). Significant differences ( $P \leq 0.01$ ) were observed in pathogenicity between *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, and combinations thereof. The variation in resistance found in phenotypes of *C. pubescens* is up to 50 %, this can be exploited in genetic improvement for development of plant resistant materials.

**Key words:** Manzano pepper, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, incidence, severity.

El género *Capsicum*, que incluye a los chiles dulces y picantes, son verduras y especias cultivadas y consumidas en todo el mundo (Carrizo et al., 2016). De acuerdo a USDA-ARS (2011), el género *Capsicum* cuenta con 38 especies, de las cuales *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* y *Capsicum baccatum* son cultivadas. De las cinco especies *C. annuum* y *C. frutescens* fueron domesticados en Mesoamérica y *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* en América del Sur (Pickersgill, 2007). El chile en México, por su tradición e historia es un cultivo importante, en 2016 alcanzó 2.3 millones de toneladas, con un valor que rebasa los 22 mil 500 millones de pesos (SAGARPA, 2017). En la diversidad de chiles que se cultivan en el territorio nacional, el

chile manzano (*C. pubescens*) ha cobrado mayor importancia en la última década y de acuerdo con SAGARPA (2018), 4, 995.33 toneladas están destinadas solo para exportación a los Estados Unidos, de las cuales el 98 % es producido en el sur del Estado de México. En esta región el cultivo de chile manzano es intensivo. Sin embargo, tiene limitaciones agronómicas en la producción, como la susceptibilidad a la “marchitez”, enfermedad que daña a la raíz y causa la muerte de la planta. Esta enfermedad en *C. annuum* fue identificada por primera vez en Nuevo México por Leonian (1922), quien estableció a *Phytophthora capsici* como el agente causal, que ataca principalmente la raíz y es una de las enfermedades más destructivas en todo el mundo (Zhang et al., 2013). El patógeno puede afectar al cultivo en cualquier etapa de desarrollo, causa la pérdida de turgencia en la planta, seguido por la muerte de la misma (Kousik et al., 2012). Para *C. annuum* en México, se han reportado como agentes causales de la marchitez, además de *P. capsici*, a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Anaya-López et al., 2011; Uc-Arguelles et al., 2017).

De acuerdo con González-Pérez et al. (2014), *C. pubescens* cuenta con una baja diversidad génica como consecuencia de un efecto fundador durante su domesticación que lo hace una especie menos polimórfica. Sin embargo, en la zona sur del Estado de México, con un variado número de nichos ecológicos, se cultivan diferentes fenotipos de *C. pubescens*, que representan variación dentro de la especie y por lo tanto, un valioso reservorio de germoplasma que pudiera ser de utilidad en el mejoramiento de esta especie (Arias et al., 2017), no solo para aspectos morfológicos sino también en la resistencia a enfermedades. Con la presencia de variación natural, algunos individuos de la población pueden expresar ciertas características con mayor o menor grado que otros, las cuales pueden dar al individuo ciertas ventajas ligadas a su ciclo de vida. Estos individuos pueden variar en la producción de frutos, tanto en número como en tamaño, color, textura, sabor, maduración, apariencia y la calidad, así como la arquitectura de la planta y su capacidad de resistir estrés abiótico o biótico (Paran y Van der Knaap, 2007; Schubert et al., 2009). Debido a estos factores, ellos pueden tener mayor cantidad de descendientes que otros individuos, los cuales incrementan la frecuencia de su material genético en la población como un todo. Esto a través de un proceso de reproducción diferencial que provocan

cambios genéticos en las especies a través del tiempo, más acentuados a menor tamaño poblacional efectivo (Gliessman, 2002; Nora et al., 2011).

La diversidad genética dentro de las especies es la razón principal por la que una determinada especie tenga la oportunidad de evolucionar bajo condiciones cambiantes del ambiente y presiones de selección; asimismo, el conocimiento de la diversidad genética es indispensable para diversificar las fuentes de germoplasma, tratar de minimizar los riesgos de vulnerabilidad genética e incrementar las probabilidades de detectar alelos favorables. Por lo que de encontrarse algún material resistente se podrán generar variedades resistentes como estrategia para el control de la marchitez y tomando en cuenta la gravedad de las pérdidas en el país, es importante la incorporación de resistencia a una variedad de chile comercial con progenitores de resistencia genética que ayuden a disminuir el uso de productos químicos para una agricultura más amigable al ambiente. El Centro Universitario UAEM Tenancingo cuenta con 16 fenotipos colectados en el sur del Estado de México, de los cuales, 15 presentan variabilidad morfológica y estados únicos de interés genético y comercial (Martínez, 2016). Por lo que, con la finalidad de aprovechar los variantes fenotípicos de *C. pubescens*, el objetivo del presente trabajo fue identificar los patógenos y evaluar la variación en respuesta al daño del complejo fúngico de la marchitez en 16 fenotipos de chile manzano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado a 18° 58' 05.53'' N y 99° 36' 50.51'' O, a una altitud de 2068 msnm. En 2016, se colectaron muestras de plantas de chile manzano con síntomas de marchitez en 10 localidades del sur del Estado de México para el aislamiento, identificación y evaluación de los organismos fitopatógenos.

**Aislamiento del patógeno.** Tejidos de tallo y raíz se desinfectaron, y se sembraron acuerdo a López (1984) en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para hongos, para oomicetos en 20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimaricina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L<sup>-1</sup> de ampicilina, en agua destilada (3P), de acuerdo a López (2009). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 24°C bajo

oscuridad. Las siembras se revisaron cada 24 horas para observar el crecimiento y desarrollo del hongo. Una vez crecido el hongo y el oomiceto, se hicieron transferencias sucesivas hasta la obtención de cultivos puros, de los que se hicieron cultivos monospóricos y de punta de hifa. Las colonias se preservaron en tubos con PDA cubierto con aceite mineral estéril.

**Identificación morfológica de fitopatógenos.** Los microorganismos se identificaron por claves taxonómicas para hongos y oomicetos. Para hongos, se utilizaron las claves de Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006), para caracterizar el tamaño y la forma de micro y macroconidios, así como descripción de clamidosporas, estructuras importantes para la identificación; y las claves de Singleton et al. (1992) y Watanabe (2002), para la caracterización de esclerocios, micelio grueso, ángulos de ramificación, así como coloración del micelio. Para oomicetos, se usaron las claves de Erwin y Ribeiro (1996) y Gallegly y Hong (2008), en la identificación crecimiento arrosetado, micelio hialino, cenocítico y toruloso, esporangios ovalados, oogonios y clamidosporas intercalares.

**Identificación molecular de fitopatógenos.** La extracción del ADN se hizo por el método (CTAB) y Acetato de sodio. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos y oomicetos con los iniciadores ITS-1fu 5'-tccgtagtggaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (White et al., 1990); los cuales amplifican fragmentos de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb). La mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL fue de 10 µL de Agua ultrapura, 12 µL de MyTaq Mix® (Bioline), 1 µL de Primer F, 1 µL de Primer R y 1 µL de ADN. El programa térmico fue de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 s respectivamente y una extensión final a 72 °C por 5 min para oomicetos. Para hongos fue de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-58 y 60-72 °C durante 30-30-60 s respectivamente y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en TBE con geles de agarosa al 1.2 %.

**Secuenciación.** Productos de PCR se purificaron con el Kit EZ-10 Spin Column Handbook (Bio Basic Canada Inc.) y se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la FES- Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las secuencias en formato FASTA (Chromas versión 2.6.5) se alinearon para consenso e identidad con la base de datos del banco de genes del *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) – BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (disponible en <https://www.yeastgenome.org/blast-fungal>).

**Patogenicidad *in vitro*.** La patogenicidad se evaluó en el fenotipo M3 de *C. pubescens*, material más cultivado en la región. Las semillas se desinfestaron e inocularon de acuerdo a Apodaca-Sánchez et al. (2001) y después se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo Agar-Agua. Cada cepa obtenida de cultivo monospórico y de punta de hifa, fue considerada un tratamiento, con 5 repeticiones de 10 semillas cada una. El testigo fue semilla desinfestada y sumergida en agua destilada estéril. Se evaluó la patogenicidad mediante la incidencia y la severidad medidas a los 10 días de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012), y se registraron los síntomas de radícula e hipocótilo. La incidencia se determinó por el porcentaje de plántulas con manifestación de la enfermedad. La severidad se midió por la longitud de la lesión a lo largo de la plántula expresada en porcentaje. Los valores obtenidos se promediaron dentro de cada unidad experimental.

**Interacción patógeno-patógeno.** Semillas desinfestadas del fenotipo M3, se sembraron en un tubo de ensayo con agar-agua, se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y al germinar se establecieron a 12 horas de luz y 12 de oscuridad a 25°C. A los siete días de germinadas las semillas se inocularon de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012). Se aplicaron 100 µL de una suspensión de esporas  $1 \times 10^6$  y 100µL de la suspensión de micelio en forma individual y las mezclas de los microorganismos patógenos, con 10 repeticiones cada una. Se incubaron a 12 horas de luz y 12 de oscuridad a 25 °C y se observaron cada 24 horas para evaluar la severidad determinada por (longitud de la lesión/longitud de la plántula) x 100.

**Interacción patógenos-fenotipo.** Plántulas con cuatro hojas verdaderas de los fenotipos M1 a M16, materiales morfológicamente contrastantes a diferentes caracteres como flor y fruto, se inocularon con *F. oxysporum*; *P. capsici*; *R. solani*; *F. oxysporum* + *P. capsici* y *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solan*. El método de inoculación utilizado fue el descrito por Martínez et al. (1996). Las plantas inoculadas fueron trasplantadas en vasos de poliestireno de un litro, con sustrato de una mezcla desinfestada de turba y agrolita en proporción de 2:1 respectivamente, y con cinco repeticiones por tratamiento. La severidad de la enfermedad se midió por el porcentaje de daño en hipocótilo y raíz de la plántula según la escala 1-9, desarrollada en el CIAT (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). Los datos se transformaron

logarítmicamente para obtener el modelo lineal general utilizando el paquete estadístico InfoStat.

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza, los tratamientos se compararon mediante la prueba de Duncan ( $p= 0.05$ ), utilizando InfoStat (Di Rienzo et al., 2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Fitopatógenos aislados.** De las localidades muestreadas se aisló a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* (Cuadro 1). *F. oxysporum* fue constante casi en todos los muestreos (9/10) mientras que la presencia de *P. capsici* se limitó a las áreas con media y alta intensidad de cultivo. La presencia de *R. solani* en solo un área de muestreo lo que sugiere limitada participación en el daño por marchitez. Solo en una localidad se aislaron los tres patógenos, lo que denota la participación individual o colectiva en el ataque al huésped. Los resultados coinciden con lo reportado por Anaya-López (2011) quien menciona a *F. oxysporum* como el más común y en segundo turno a *R. solani* en cultivo de *C. annuum*. De acuerdo a Nelson et al. (1983), la variación en las frecuencias de éstos patógenos como responsables de la marchitez se ve afectada por diversos factores, donde las condiciones climáticas son determinantes. El potrero comunidad en la que se encuentran los tres patógenos, a diferencia de las otras comunidades presenta un clima más cálido y lluvioso lo que favorece el desarrollo de los patógenos. Por otra parte, las formas de cultivo, la utilización de fungicidas y el genotipo mismo del cultivo son determinantes para la presencia del complejo fúngico (Lozano et al., 2015). También una producción intensiva (Guijón-López et al., 2001) influye en la forma de adaptación de los diferentes patógenos y les facilita una mayor sobrevivencia (Nuez et al., 1996). También, es posible que también influya la etapa fenológica del cultivo en el momento de la colecta, además de la susceptibilidad de fenotipo.

Cuadro 1. Presencia de fitopatógenos aislados en cultivo de *C. pubescens* en localidades de tres municipios del de sur del Estado de México

Localidad		Microorganismo fitopatógeno		
Zona	IC	<i>F.oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>R. solani</i>
Ahuacatitlan	Baja	X		
Zarco	Media	X	X	
Santa Ana	Baja	X		
Tepoxtepec	Baja	X		
Matlazinca	Media	X	X	
San Miguel	Media	X	X	
Potrero	Alta	X	X	X
Ixtlahuaca	Alta	X	X	
San Nicolás	Baja	X		
Cabañas	Media		X	

IC= Intensidad de cultivo

**Descripción morfológica de patógenos identificados.** *Fusarium oxysporum* presentó micelio aéreo y abundante con un hábito de crecimiento radial y pigmentación naranja. Micelio hialino y septado, microconidios de forma ovalada, de tamaño promedio 8.6 X 4.3 µm con 0 ó 1 septos, abundantes en falsas cabeza y en monofialides; macroconidios en menor cantidad, con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie de 3 a 4 septos, de tamaño promedio 23.8 X 4.2 µm. También se observaron clamidosporas abundantes, terminales o intercalares en la hifa (Figura 1).

*Rhizoctonia solani* presentó micelio con coloración blanca los primeros cuatro días, a partir del quinto día el micelio se tornó café y mostró la presencia de esclerocios. Microscópicamente se logró observar ramificación próxima al septo distal en células vegetativas jóvenes, ángulo de 90°, estrechamiento de hifa y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro (Figura 1).

*Phytophthora capsici* presentó micelio color blanco, crecimiento arrosetado en medio de cultivo PDA, micelio cenocítico, hialino y toruloso; esporangios ovoides de forma

alimonada y poco papilados de 11 a 54  $\mu\text{m}$  de largo y 9 a 36  $\mu\text{m}$  de ancho, clamidosporas intercalares de 9.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1).

Dichos patógenos han sido reportados en *C. annum* como responsables de la marchitez por diferentes autores (López et al, 2009; Lozano et al, 2015). Éstos se han encontrado en el Norte y Centro de México (Anaya-López 2011), sin embargo para el caso de *C. pubescens*, aun cuando se encuentran los tres patógenos, la presencia de *P. capsici* se ve asociada al cultivo intensivo en la zona productora del Estado de México (Cuadro 1).

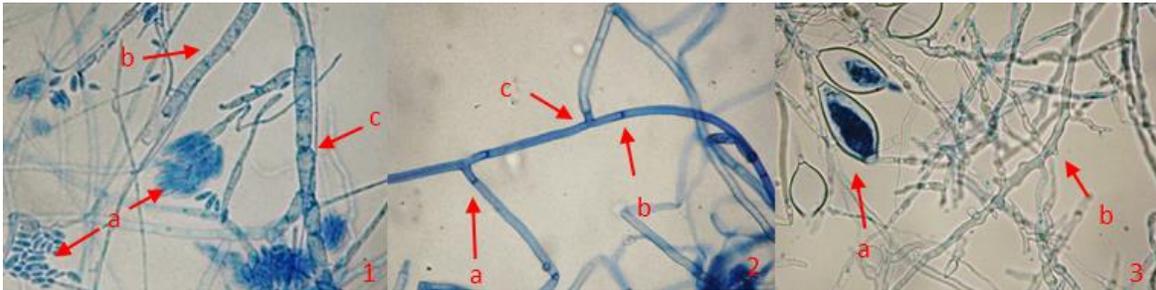


Figura 1. Patógenos causales de la marchitez de *C. pubescens*. 1. *F. oxysporum* a) Microconidios, b) Micelio hialino, c) Micelio septado. 2. *R. solani* a) Septo cercano al punto de origen a la ramificación hifal, b) Micelio grueso y septado, c) Angulo de 90°. 3. *P. capsici* a) Esporangios, b) Micelio hialino y toruloso.

**Identificación Molecularde los patógenos.** La amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de los tres patógenos confirmó la identidad, previamente establecida morfológicamente. El fragmento amplificado de *F. oxysporum* mostró peso molecular de 900 pares de bases (pb), mientras que *P. capsici* y *R. solani* mostraron un peso aproximadamente de 650 pb (Figura 2).

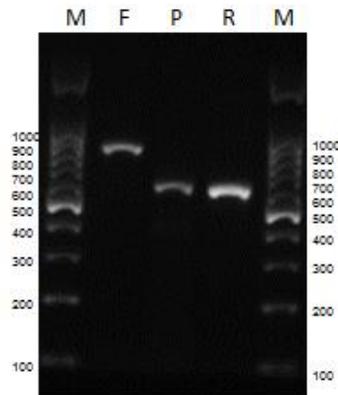


Figura 2. Electroforesis en gel de 1.2 % agarosa en TBE para fragmentos amplificados de ADN ITS de *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (P) y *R. solani* (R); carriles M corresponden al marcador molecular de 100 pb.

El fragmento secuenciado de la cepa de *F. oxysporum* se alineó con la secuencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* accesión CM000593.1, y en el consenso tuvo un 88 % de identidad en fragmentos de la región 248 a 270. El fragmento secuenciado de la cepa de *P. capsici* se alineó con la secuencia de *P. capsici*\_ LT1534, versión 11, accesión PcapLT1534\_SC064, con un 83 % identidad en consenso con fragmentos de la región 146 – 259. Similarmente el fragmento secuenciado de ADN de la cepa de *R. solani* se alineó con secuencias del Banco de genes NCBI y su mayor identidad, con un 90 % de consenso fue con *R. solani* accesión número JATN01000256.1 (Versión JATN01000256.1 GI: 576995022), con fragmentos de la región 144 – 292.

**Patogenicidad *in vitro*.** Los síntomas de la patogenicidad fueron necrosis en ápice de raíz, hipocótilo y/o cotiledones. Los aislamientos de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* resultaron patogénicos en las plántulas de chile manzano con variación temporal en la manifestación de los síntomas. La manifestación de los síntomas con inóculo de *F. oxysporum* varió de 8 a 12 días después de la siembra de acuerdo a la cepa. En el caso de las plántulas inoculadas con *P. capsici* y *R. solani* los síntomas se presentaron a los 10 días después de la inoculación.

En incidencia y severidad se observaron diferencias estadísticas entre colonias de *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$ ) y entre colonias de *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ) asociadas al lugar de colecta, lo que denota heterogeneidad intraespecífica posiblemente asociada, entre otros factores, a la dispersión natural del patógeno (Guzmán-Plazola et al., 2011) y desarrollo de resistencia del patógeno por la presión de selección ejercida con fungicidas (Silva-Rojas et al., 2009). La incidencia de los patógenos fue de 65 % en *F. oxysporum*, 56.4 % en *P. capsici* y del 76 % para *R. solani*. Por otra parte, los valores de severidad fueron de 81.4 % para *P. capsici*, 64.6 % *F. oxysporum* y 65.5 % para *R. solani* lo que denota un efecto más devastador del oomiceto, el cual procede de una zona altamente productora de chile manzano, donde el control de enfermedades es mediante constante productos químicos, lo cual de acuerdo a Silva-Rojas et al (2009), trae como consecuencia la resistencia de *P. capsici*.

El cociente severidad / incidencia (Figura 3) denota en *F. oxysporum* que, si bien existe un mayor número de plántulas dañadas, el daño no es tan grande, es decir el valor del cociente es muy cercano al valor de 1, excepto en la localidad de San Nicolas. Lo que podría estar indicando una mayor posibilidad de sobrevivencia del cultivo. Por el contrario,

el cociente severidad/incidencia calculado en *P. capsici* muestra valores mayores a 1 en todas las localidades muestreadas, indicativo de que el grado de daño es muy alto aun cuando pudieran estar infectadas pocas plantas. En el caso de *R. solani* el valor del cociente es similar al reportado en *F. oxysporum*. Los valores mayores del cociente severidad/incidencia (Figura 3) indican mayor patogenicidad, ya que aun cuando los patógenos mostraron incidencia relativamente similar, el proceso infeccioso en términos de superficie del tejido (severidad) fue más acelerado con valores superiores a la unidad.

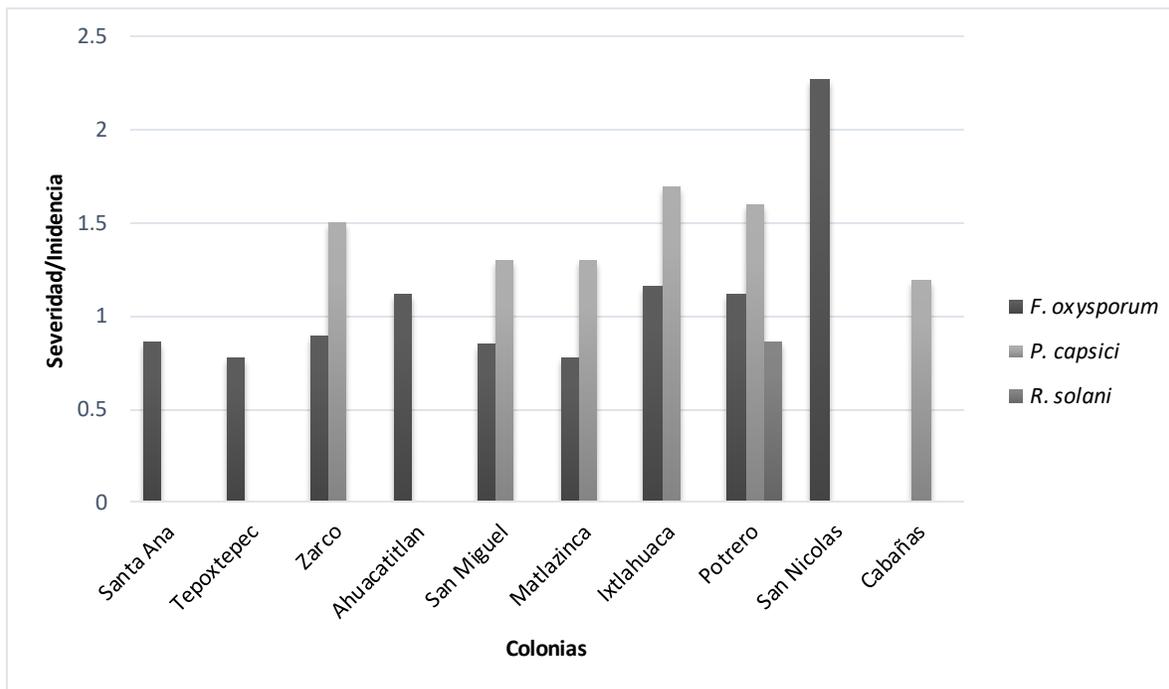


Figura 3. Cociente de severidad/incidencia de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* en plántulas de chile manzano en 10 localidades productoras del sur del Estado de México.

**Interacción patógeno-patógeno.** El proceso infeccioso después de la inoculación fue acelerado tanto individual como combinada, al manifestarse los síntomas a los tres días después de la inoculación (ddi). Cinco ddi todas las plantas infectadas con *P. capsici* murieron (Figura 4), esta situación identifica al patógeno como el más catastrófico en *Capsicum* spp., a nivel mundial (Lamour et al., 2012). Resultados similares fueron presentados por Sazón et al. (2012), quienes describen necrosis de raíz a 24 horas de la inoculación y muerte posterior a los cinco días, con evidencias de invasión de micelio y esporangios en la planta. Sin embargo, una vez que *P. capsici* se combina con otro

patógeno el daño disminuye, lo cual puede deberse a la competencia por nutrientes por parte de los patógenos (Abdullah et al., 2017). Los valores de severidad promediados a partir del tercer día (Figura 4), denotaron una variación significativa entre tratamientos, marcando también a *P. capsici* como el más severo al acumular más rápido el daño.

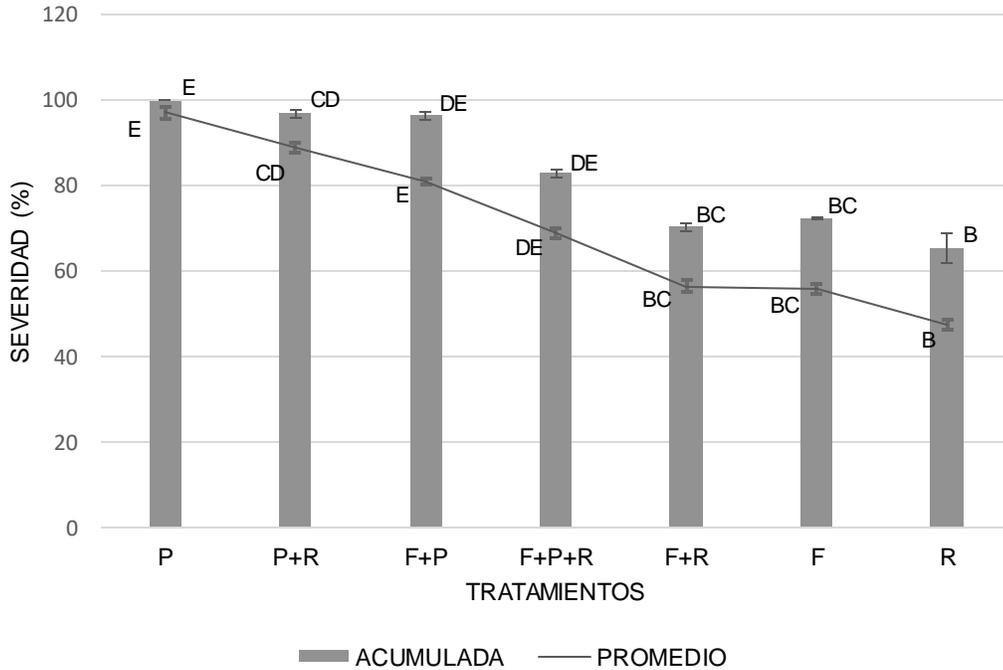


Figura 4. Patogenicidad acumulada y promedio de combinaciones de patógenos en plantas de *C. pubescens* 5 días después de infestación. P= *P. capsici*, P+R= *P. capsici* + *R. solani*, F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*, F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, F= *F. oxysporum* y R= *R. solani*. Barras de error corresponden al error estándar. Columnas con la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ).

En el caso de *F. oxysporum*, 5 ddi el hipocótilo de las plántulas mostraron manchas color marrón, las cuales de acuerdo a Sanzón et al. (2012), se deben a la mayor acumulación de polifenoles en tejido del tallo, que ocasionan que las células en contacto posteriormente mueran (Figura 5A). La degradación de las paredes celulares posiblemente se debe a la actividad de enzimas líticas producidas por patógenos (Roncero et al., 2000; Feng et al., 2010), y a que los mecanismos de defensa de las plantas no se activaron tan rápido ni con la magnitud necesaria para defenderse del ataque por el patógeno (Sanzón et al., 2012).

En la combinación *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* se observó una interacción de coinfección, donde la patogenicidad se redujo (Figura 5G) con respecto a *P. capsici* individual (Figura 5B). En este complejo de interacción la respuesta provocada por un

patógeno modificó la presencia del otro. Esta interacción compleja, tiende a alterar el curso de la enfermedad, ya que los patógenos coexistentes entran en competencia por crecimiento y por los nutrientes en el mismo huésped, y la nutrición subóptima conduce a la competencia por la cual algunas especies pueden dominar (Abdullah et al., 2017). No obstante, la gravedad y el tipo de competencia se determinan por el consumo de nutrientes a lo largo del tiempo (Chesson, 2000). Caso similar fue reportado por Fernández-Herrera et al. (2007); Sanzón et al. (2012).

En la interacción *F. oxysporum* + *R. solani* la patogenicidad se redujo a diferencia de cuando se encuentra por separado, lo cual puede ser resultado de una competencia entre especies por el huésped (Figura 5E), ya que las coinfecciones afectan la transmisión de ambos patógenos en una población y la virulencia de los patógenos, lo que influye dinámicamente en la enfermedad (Alizon et al., 2013).



Figura 5. Daños ocasionados en *C. pubescens* 5 días después de la inoculación por: A) *F. oxysporum*, B) *P. capsici*, C) *R. solani*, D) *P. capsici* + *R. solani*, E) *F. oxysporum* + *R. solani*, F) *P. capsici* + *F. oxysporum* y G) *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*.

**Interacción patógenos-fenotipo.** Los síntomas en las plantas inoculadas con patógenos individuales y combinados se observaron 15 ddi (Figura 6). Plantas con daños de *P. capsici* mostraron flacidez en la parte aérea y lesiones necróticas en la parte interna y externa de la

corona del tallo, así como radícula necrótica. Plántulas con daño por *R. solani* presentaron clorosis en la parte aérea y necrosis en raíz; en daño más avanzado la radícula presentó estrangulamiento, González (2008), menciona una pudrición no compacta con desprendimiento de epidermis. Las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron clorosis y en ocasiones rizados en el follaje y necrosis de la radícula. Las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P.capsici* mostraron clorosis foliar y marchitez, así como necrosis en corona del tallo y radícula.

En plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* se observó clorosis en hojas, corona del tallo y radícula necróticas. De acuerdo Velásquez-Valle et al (2001) el síntoma inicial más evidente es una ligera flacidez foliar, que es más notable al avanzar el día, así como un ligero amarillamiento del follaje. Estos síntomas se asociaron con la podredumbre de la raíz y ablandamiento de las puntas de las raíces, lesiones de la raíz que varían en tamaño y color, de rojizo a marrón y negro, recorte de la raíz y pudrición (Hamon et al, 2011).

En daño por *F. oxysporum* se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre fenotipos. Los fenotipos M8 y M9, mostraron resistencia a dicho patógeno. En plántulas inoculadas con *R. solani* se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) en el fenotipo M8, la cual mostró resistencia al mismo. En inoculación con *P. capsici* hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ), donde M8 fue diferente a los demás en términos de resistencia. En la combinación *F. oxysporum* + *P.capsici* también hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ), siendo el fenotipo M8 tolerante a dichos patógenos. Contrastante a *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* donde se lograron apreciar diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) siendo M8 el que mostró ser tolerante al complejo patogénico (Figura 6). De acuerdo a Martínez (2016), M8 cuenta con características de especies silvestres como lo es una ramificación densa, de ahí la importancia del fenotipo ya que la resistencia génica presente en plantas criollas y silvestres de Chile, representan un reservorio de genes que confieren resistencia o tolerancia contra dichos patógenos (Anaya-López, 2011).

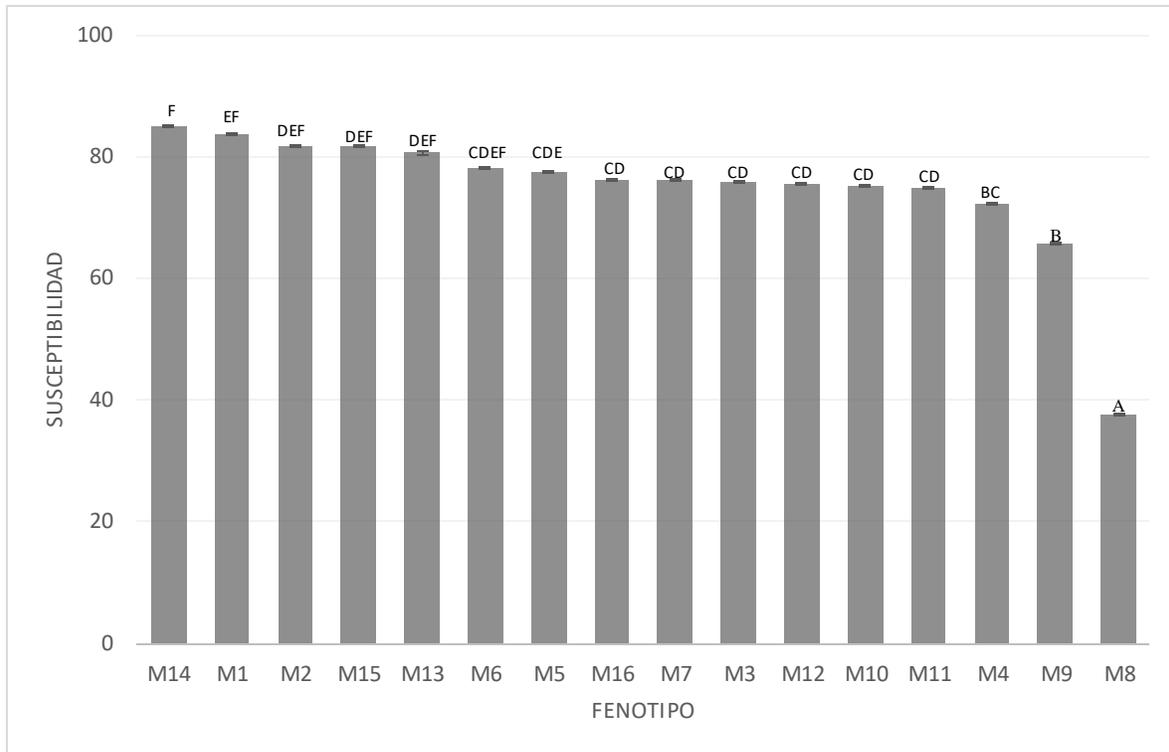


Figura 6. Susceptibilidad de 16 fenotipos (M1-M16) de chile manzano a daño por marchitez. Barras de error corresponden al error estándar. Barras de error corresponden al error estándar. Columnas con la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ).

Los fenotipos M8 y M9 que presentaron resistencia a *F. oxysporum* y *R. solani*, son una fuente de genética importante para el control de la marchitez; sin embargo, el éxito en el control de esta enfermedad podría depender de la incorporación de resistencia al patógeno *P. capsici*, ya que se encuentra presente en gran parte de las localidades analizadas. Por otra parte, el haber encontrado genotipos tolerantes a *F. oxysporum*, *R. solani* y las combinaciones de los tres de patógenos, indica la existencia de mecanismos de defensa propios contra cada uno de los hongos presentes, así como en el síndrome ocasionado por la interacción de los tres géneros. Por lo tanto, es probable la presencia de mecanismos de resistencia en común e individuales a los tres patógenos (Anaya-López, 2011).

## CONCLUSIONES

Se detectaron tres patógenos asociados a la marchitez de chile manzano del sur de México; de ellos *Fusarium oxysporum* fue el más frecuentemente aislado, seguido por *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

La identificación molecular permitió determinar que *F. oxysporum* pertenece a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2. *P. capsici* pertenece a *P. capsici*\_LT1534, versión 11, y *R. solani* pertenece al grupo anatómico 3 (AG-3).

De los tres patógenos encontrados, *Phytophthora capsici* es el causante de la marchitez en la región sur de México, aunque *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* reducen la producción de la planta de chile manzano hasta ocasionar su muerte.

Los fenotipos de chile manzano M8 y M9 presentaron resistencia a *F. oxysporum* y M8 a *R. solani*. El fenotipo M8 fue tolerante a *P. capsici* y a la inoculación individual y en mezcla de los tres patógenos, por lo que representan fuentes de genes de tolerancia potencialmente útiles en programas de mejoramiento genético, orientados al control de la marchitez del chile manzano en la región productora del centro de México.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), por la beca escolar otorgada a Alma Janeth Vallejo Gutiérrez para estudios de maestría.

### **LITERATURA CITADA**

- Abawi SG. and Pastor, CMA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 114p.
- Abdullah AS, Moffat CS, Lopez-Ruiz, FJ, Gibber MR, Hamblin J and Zerihun A. 2017. Host-Multi-Pathogen warfare: Pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 8:1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Alizon S, de Roode JC and Michalakis Y. 2013. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters* 16:556–67. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>

- Anaya-López J.L., González-Chavira MM, Pineda-Villordo E, Rodríguez-Guerra R, Rodríguez-Martínez R, Guevara-González RG, Guevara-Olvera L, Montero-Tavera V. y Torres-Pacheco I. 2011. Selección de genotipos de chiles resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:373-383. Disponible en línea: <https://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/2631/263119714006/1>
- Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, García-Espinosa R, Osada-Kawasoe S. y Valenzuela-Ureta JG. 2001. Comparación de técnicas para evaluar *in vitro* la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:197-2002. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219210.pdf>
- Arias AB, Mejía J, Estrada MI, Arriaga, RM y García, VLM. 2017. Caracterización morfológica de híbridos de chile manzano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:825-836. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/2631/263152088006/>
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute . Kew, Surrey, England. 237 p.
- Carrizo GC, Barfuss HJM, Sehr EM, Barboza GE, Rosabelle S, Eduardo A. and Ehrenderfer F. 2016. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany* 118:35-51. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27245634>
- Chesson P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:343–366. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.343>
- Feng B, Li P, Wang H and Zhang X. 2010. Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis* 49:23-31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.03.004>
- Fernández-Herrera E, Acosta RM, Ponce GF y Pinto VM. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici*., *Fusarium oxysporum* Schlechtend:FR. y *Rhizoctonia solani* Kuhn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 35-41. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225105.pdf>

- Gallegly ME and Honh Ch. 2008. *Phytophthora capsici*. En identifying species by morphology and ADN fingerprints. St. Paul, Minnesota 55121, Estados Unidos de America: APS PRESS. 165 p.
- Gliessman SR. 2002. Agroecología. Procesos Ecológicos en Agricultura Sostenible. Litocat, Turrialba, Costa Rica. 380 p.
- González GM. 2008. Reseña de “Aspectos de sistemática y biología del complejo Rhizoctonia”. Fitosanidad 12:147-159. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209115572003.pdf>
- González-Pérez S, Garcés-Claver, A, Mallor C, Sáenz de Miera LE, Fayos O, Pomar F, Merino F and Silvar C. 2014. New insights into *Capsicum* spp. relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. Plos one 9:e116276. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278865/pdf/pone.0116276.pdf>
- Guzmán-Plazola RA, Fajardo-Franco ML, García-Espinosa R. and Cadena-Hinojosa MA. 2011. Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México. *Agrociencia* 45:363-378. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n3/v45n3a9.pdf>
- Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, Mcgee RJ, Le Goff IL, L'anthoëne V, Esnault R and Pilet-Nayel ML. 2011. New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple field and controlled environments from France and the United States. *Theoretical and Applied Genetics* 123:261-281. DOI: [10.1007/s00122-011-1582-z](https://doi.org/10.1007/s00122-011-1582-z)
- Herrera I y Laurentin H. 2012. Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*). *Revista Científica UDO Agrícola* 12:639-643. Disponible en línea: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg12072>
- Kousik ChS, Donahoo RS. and Hassell R. 2012. Resistance in watermelon rootstocks to crown rot caused by *Phytophthora capsici*. *Crop Protection*. 39: 18–25. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219412000907>

- Lamour HK, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Leonian LH. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12:401-408. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19231100138>
- Leslie JF and Sumerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First edition. State Avenue, Ames, Iowa, USA. Blackwell Publishing. 388. p. Disponible en línea: <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- López AGF. 1984. Manejo de Hongos Fitopatógenos. Departamento de Enseñanza e Investigación en parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp. 106-115.
- López VA, Tlalpal, BBM, Yáñez, MMJ, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca México. *Revista de Fitotecnia* 32:127-134. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n2/v32n2a8.pdf>
- Lozano AN, Guzmán-Plazola, R.A., Zavaleta, M.E., Aguilar, R.V.H. y Ayala, E.V. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en la Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:31-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61240687003.pdf>
- Martínez GE, Albarracin N, Arcia A, Subero L y Albarracin M. 1996. Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Tropical* 46:265-273.
- Martínez EI. 2016. Caracterización morfológica y molecular de 15 colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del Estado de México. Tesis de Maestría. Centro Universitario UAEM Tenancingo, México. P.43-56. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/40647>
- Nelson PE, Tousson TA and Marasa WFO. 1983. *Fusarium speies: an illustrated manual for identificaction. The Pennsylvania State University, University Park. Pennsylvania, USA. 193 p.*
- Nora S, Albaladejo RG, González MSC, Robledo-Arnuncio JJ y Aparicio A. 2011. Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas.

- Ecosistemas 20:35-45. Disponible en línea:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54022121004>
- Paran I and Van der Knaap E. 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* 58:3841-3852. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm257>
- Pickersgill B. 2007. Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100: 925–940. <http://doi:10.1093/aob/mcm193>
- Roncero MI, Di Pietro A, Ruiz-Roldan MC, Huertas-González MD, García-Maceira FI, Meglecz E, Pérez JA, Caracuel Z, Sancho-Zapatero R, Hera C, Gómez-Gómez E, Ruiz-Rubio M, González-Verdejo, CI. and Paez MJ. 2000. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:47-53. Disponible en línea:  
[https://www.researchgate.net/publication/242684157\\_Papel\\_de\\_enzimas\\_liticas\\_de\\_la\\_pared\\_celular\\_en\\_la\\_patogenicidad\\_de\\_Fusarium\\_oxysporum](https://www.researchgate.net/publication/242684157_Papel_de_enzimas_liticas_de_la_pared_celular_en_la_patogenicidad_de_Fusarium_oxysporum)
- Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI y Zavaleta ME. 2012. Cambios Morfológicos en Células de Chile CM334 Inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:66-71. Disponible en línea:  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a6.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Producción nacional de Chile alcanza 2.3 millones de toneladas.  
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/navarit/boletines/Paginas/BNSAGENE052017.aspx#> (consulta, junio 2018).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2018. Relación de Huertos de Chile Manzano registrados para Exportación del Estado de México a los Estados Unidos de América con tratamiento de Irradiación.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/332452/CHILE\\_MANZANO\\_EDO\\_MEX\\_04\\_06\\_2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/332452/CHILE_MANZANO_EDO_MEX_04_06_2018.pdf) (consulta, junio 2018).
- Schubert S, Neubert A, Schierholt A, Sümer A and Zörb C. 2009. Development of salt-resistant maize hybrids: The combination of physiological strategies using conventional breeding methods. *Plant Science*. 177(3): 196-202.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.011>

- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavia, SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada GD. 2009. Distribución Espacio Temporal de la Marchitez del Chile (*Capsicum Annuum* L.) en Chihuahua e Identificación del Agente Causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología. 27: 134-147. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61212195006>
- Singlenton L, Mihail JD and Rush MCh. 1992. Methods for research on soil borne Phytopathogenic Fungi. APS Press. St. Paul, Minesota, USA. 264p.
- Uc-Arguelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V and Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*). Revista Mexicana de Fitopatología 35:263-283. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmf/v35n2/2007-8080-rmf-35-02-00263.pdf>
- United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (USDA-ARS) 2011. Grin species records of Capsicum. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory. <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-barc/beltsville-agricultural-research-center/national-germplasm-resources-laboratory/> (consulta, febrero 2018)
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM y Luna-Ruiz JJ. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:175-181. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219207>
- Watanabe T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphogies of Cultures Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p. Disponible en línea: <http://www.e-agriculture.biz/download/Soil/Pictorial%20Atlas%20of%20Soil%20and%20Seed%20Fungi%20-%20Morphologies%20of%20Cultured%20Fungi%20and%20Key%20to%20Species.pdf>
- White TJ, Bruns T, Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. PCR Protocols. Academic Press. San

Diego, CA Pp.315- 322. Disponible en línea:  
<https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>

Zhang YL, Jia QL, Li DW, Wang JE, Yin YX. and Gong H. 2013. Characteristic of the pepper CaRGA2 gene in defense responses against *Phytophthora capsici* Leonian. International Journal of Molecular Sciences 14: 8985–9004. [https://doi: 10.3390/ijms14058985](https://doi.org/10.3390/ijms14058985)

### 7.7.1. Envío de Artículo

#### Recibido Manuscrito para rev por conformidad J.Mejia. 16Sep18

**From:** Editor RMF G Mora <[revmexfitopatologia@gmail.com](mailto:revmexfitopatologia@gmail.com)>  
**Sent:** Sunday, September 16, 2018 11:56:11 AM  
**To:** Jaime Mejia Carranza  
**Subject:** Recibido Manuscrito para rev por conformidad J.Mejia. 16Sep18

Estimado Dr. Jaime Mejia Carranza:

Gracias por el envío del manuscrito: **Respuesta de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez** para su posible publicación en la Revista Mexicana de Fitopatología.

Revisaremos de conformidad con la Guía de Autores de la RMF y le comunicaremos lo pertinente.

Aprovecho para solicitarle que con el fin de llevar una correcta trazabilidad de recepción de documentos usar el correo oficial de la Revista Mexicana de Fitopatología:

[revmexfitopatologia@gmail.com](mailto:revmexfitopatologia@gmail.com)

Reciba un cordial saludo

Atentamente  
Yanet Hidalgo  
Asistente RMF

Dr. Gustavo Mora Aguilera  
Editor en Jefe de la Revista Mexicana de Fitopatología  
Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas  
Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología  
LANREF  
Km 36.5 Carr. Méx.-Texcoco, Edo. de México  
CP 56230

## 8. CONCLUSIONES

Se detectaron tres patógenos asociados a la marchitez en la región productora de chile manzano del sur del estado de México; de ellos *Fusarium oxysporum* fue el más frecuentemente aislado, seguido por *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

Los fenotipos de chile manzano 8 y 9 presentaron resistencia a *F. oxysporum* y el 8 a *R. solani*. El fenotipo 8 fue tolerante a *P. capsici* y a la inoculación individual y la mezcla de los tres patógenos, por lo que representan fuentes de genes de tolerancia potencialmente útiles en programas de mejoramiento genético, orientados al control de la marchitez del chile manzano en la región productora del sur del Estado de México.

La identificación molecular permitió observar que *F. oxysporum* pertenece a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2. *P. capsici* pertenece a *P. capsici*\_ LT1534, versión 11, y *R. solani* presenta anastomosis con el grupo 3 (AG-3).

Se observó que *Phytophthora capsici* es el causante de la marchitez en la región sur del Estado de México, aunque *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* también son responsables de las mermas en la producción de chile manzano.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abawi, G.S., Pastor-Corrales, M.A. (1990).** Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. CIAT, Cali, Colombia.
- Abdullah, A. S., Moffat, C.S., Lopez-Ruiz, F.J., GibberD, M.R., Hamblin, J. and Zerihun, A. (2017).** Host-Multi-Pathogen warfare: Pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science*. 8:1806. doi: 10.3389/fpls.2017.0180
- Adee, S., Pfender, W. and Hartnett, D. (1990).** Competition between *Pyrenophora tritici-repentis* and *Septoria nodorum* in the wheat leaf as measured with de wit replacement series. *Phytopathology*. 80: 1177–1182. doi: 10.1094/Phyto80-1177
- Agrios, G. N. (1985).** Fitopatología. Editorial Limusa, S.A. de C.V. MEXICO DF.755 pp.
- Agrios, G.N. (2008).** Fitopatología. Editorial Limusa. S.A. de C.V. MEXICO DF.755. pp.
- Agrios, G.N. (2008).** Fitopatología. Editorial Limusa. S.A. de C.V. MEXICO DF.755. pp.
- Alizon, S., de Roode, J.C. & Michalakis, Y. (2013).** Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters*. 16:556–67.
- Alfonso, C., Raposo, R., Melgarejo, P. (2000).** Genetic diversity in sarita *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*. 49:243-251

- Anaya-López, J.L., González-Chavira, M.M., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., Rodríguez- Martínez, R., Guevara-González, R.G., Guevara-Olvera, L., Montero-Tavera, V. y Torres-Pacheco, I. (2011).** Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 373-383
- Andres, G.M. (2015).** Respuesta de genotipos de chile (*Capsicum annum* L.) al ataque de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de marchitez en la Comarca Lagunera de Coahuila (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. p. 20
- Aoki, T., O'Donnell, K. and Scandiani, M.M. (2005).** Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. Nov., *F. cuneirostrum* sp. Nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*. 46: 162-183.
- Apodaca-Sánchez, M.A., Zavaleta-Mejía, E., García-Espinosa, R., Osada-Kawasoe, S. y Valenzuela-Ureta, J.G. (2001).** Comparación de técnicas para evaluar in vitro la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19:197-2002.
- Apodaca-Sánchez, M.A., Zavaleta-Mejía, E., Osada-Kawasoe, S. y García-Espinosa, R. (2004).** Pudrición de la Corona del Chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 1: 22-29.
- Ayala, A.B. (2015).** Caracterización de híbridos de chile manzano (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de México. 121 p.

- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. and Preston, C.A. (2006).** Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking trees” in the genomic era. *Science*. 311: 812-815.
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., Ausubel, F.M. and Bolwell, G.P. (2006).** Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant Journal*. 47: 851–863.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. and Kunkel, B.N. (2005).** The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*. 6: 629-639.
- Booth, C. (1971).** The genus *Fusarium* Commonwealth Mycological Institute . Kew, Surrey, England. 237 p.
- Bustamante, E.G. y Rivas, P. (1999).** Elementos e importancia del diagnóstico de problemas fitosanitarios. *Manejo Integrado de Plagas*. 52:1-15.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R. and Brückner, B., Tudzynski. (1994).** Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics*. 25:445-450.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P. and Piazza, A. (1993).** Demic Expansion and Human Evolution. *Science*, 259:639–646.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.8430313>.
- Cameron, R.K., Paiva, N.L., Lamb, C.J. and Dixon, R.A. (1999).** Accumulation of salicylic acid and *PR* gene transcripts in relation to the systemic acquired

resistance (SAR) response by *Pseudomonas syringae* pv tomato in *Arabidopsis*.  
Physiological and Molecular Plant Pathology. 55: 121-130.

**Chardonnet, C.O., Sams, C.E., Trigliano, R.N. and Conway, W.S. (2000).**

Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology. 90:769-774

**Chaturvedi, R. and Shah, J. (2007).** Salicylic acid in plant disease resistance. En:

Salicylic Acid—A Plant Hormone. The Netherlands. Springer. 335-370.

**Chesson, P. (2000).** Mechanisms of maintenance of species diversity. Annual

Review of Ecology and Systematics. 31:343–366.

doi:10.1146/annurev.ecolsys.31.1.343

**Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006).** Host microbe

interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell. 124: 803-814.

**Conhard, U., Beckers, G., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F.,**

**Newman, M.A., Pieterse, C., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin A., Schaffrath,**

**U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. and Mauch-Mani, B. (2006).**

Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19:1062-1071.

**Coe, S. D. (1994).** *America's First Cuisines*. Austin: University of Texas Press.

**Dangl, J.L. and Jones, J.D. (2001).** Plant pathogens and integrated defence

responses to infection. Nature. 411: 826–833.

**Darwin, C. (1859).** On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the

Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London: John

Murray. [1st edition]. **Deese, D.C. and Stahmann, M.A. (1962)**. Pectic enzymes in *Fusarium*-infected susceptible and resistant tomato plants. *Phytopathology*. 52: 255-260.

**De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R. M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Van Loon, L.C., Dicke, M. and Pieterse, C.M.J. (2005)**. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 923-937.

**Díaz-Nájera, J.F., Várgas-Hernández, M., Leyva-Mir, S.G., Ayvar-Serna, S., Michel-Aceves, A.C. and Alvarado-Gómez, O.G. (2015)**. Morphological and molecular identification of *Phytophthora capsici* L. in pipiana pumpki and its greenhouse management. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 21: 157-168

**Dicke, M. and Hilker, M. (2003)**. Induced plant defenses: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic and Applied Ecology*. 4: 3-14.

**Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., InfoStat versión (2016)**. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

**Duarte, L.Y., Echevarría, H.A. y Martínez, C.B. (2016)**. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Protección Vegetal*. 31: 173-183.

**Durrant, W.E. and Dong, X. (2004)**. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42: 185-209.

- Edmonds, C.A., Lillie, A.S. and Cavalli-Sforza, L.L. (2004).** Mutations arising in the wave front of an expanding population. *Proceedings of the National Academy Science of the United States.* 101:975–979.
- Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R. and Gribaldo, S., (2009).** A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biology Direct.* 4:7. Doi:10.1186/1745-6150-4-7
- Elena, S.F. and Lenski, R.E. (2003).** Microbial genetics: Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics.* 4:457–469.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. (1996).** *Phytophthora Diseases Worldwide.* American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Espinosa, T.L.E. (2005).** Los Sistemas de Producción de Chile Manzano en México. Una evaluación técnica, financiera y comercial (Tesis de Maestría). Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. 134 p.
- Espinosa, T.L.E. (2010).** Cultivo en invernadero, postcosecha y Mercado del chile manzano (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Chapingo. 94 p.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999).** Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacer. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 49: 329-37
- Feng, B., Li, P., Wang, H. and Zhang, X. (2010).** Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis.* 49: 23-31.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO-FAOSTAT.**

Trade. Consultado 31 de enero de 2012. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>.

**Fredricks, D.N., Smith, C. and Meier, A. (2005).** Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5122-8

**Gallegly, M.E. y Honh, Ch. (2008).** *Phytophthora capsici*. En *Identifying Species by Morphology and ADN Fingerprints*. St. Paul, Minnesota 55121, Estados Unidos de America: APS PRESS. 165 p.

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

**Glazebrook, J. (2005).** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopatology* 43: 205-227.

**Gliessman, S.R. (2002)** Agroecología. Procesos ecológicos en agricultura sustentable. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 359 pp.

**González-Pérez, E., Yañez-Morales, M.J., Santiago-Santiago, V. y Montero-Pineda, A. (2004).** Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José manzano, el verde, Puebla. *Agrociencia*. 38:635-661.

**GRIN 2014.** National Plant Germplasm System: Peppers. Germplasm Resources Information Network <http://www.ars-grin.gov/npgs/stats/>. Fecha de consulta 5 de enero de 2014

**Gust, A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M. and Nürnberger, T. (2012).**

Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. Trends in Plant Science. (In press).

**Guzmán-Plazola, R.A., Fajardo-Franco, M.L., García-Espinosa, R., y Cadena-**

**Hinojosa, M.A. (2011).** Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México. Agrobiencia. 45: 363-378.

**Hallatschek, O. and Nelson, D.R. (2007).** Gene surfing in expanding populations.

Theoretical Population Biology, 73:158-70 doi:10.1016/j.tpb. 2007.08.008.

**Hamon, C., Baranger A., Coyne, C.J., Mcgee, R.J., Le Goff, I.L., L'anthoëne,**

**V., Esnault, R., Rivière, J.P., Klein, A., Mangin, P., McPhee, K.E., Roux-Duparque, M., Porter, L., Miteul, H., Lesné, A., Morin, G., Onfroy, C., Moussart, A., Tivoli, B., Delourme, R. and Pilet-Nayel, M. L. (2011).** New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple field and controlled environments from France and the United States. Theoretical and Applied Genetics. 123: 261-281. doi: 10.1007/s00122-011-1582-z. Epub 2011 Apr 11.

**Harrison M.J. 2005.** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual

Review of Microbiology. 59:19-42.

**Hartl, D.L. and Clark, A.G. (1997).** Principles of Population Genetics. 3rd ed.

Sunderland, MA: Sinauer, Associates. 519 p.

**Heiser, C.B., and Smith, P.G. (1953).** The cultivated *Capsicum* peppers.

Economic Botany. 7: 214–227.

- Heil, M. and Silva, B.J.C. (2007).** Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104: 5467-5472.
- Hendrix, F.F. and Campbell, W.A. (1970).** Distribution of *Phytophthora* and *Pythium* species in soil in the continental United States. Canadian Journal of Botany. 48: 377-384.
- Hernández, S., Guevara, R.G., Rivera, R.F., Vázquez, C. y Oyama, K. (1998).** Los parientes silvestres de Chile (*Capsicum* spp) como recurso genético. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 62: 171-181.
- Herrera, I. y Laurentin, H. (2012).** Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*). Revista Científica UDO Agrícola. 12: 639-643.
- Howe, G.A. (2004).** Jasmonates as signals in the wound response. Journal of Plant Growth Regulation. 23: 223-237.
- Jung, Y.S., Kim, Y.T., Yoo, S. J. and Kim, H.G. (1999).** Mycological characteristics of *Fusarium solani* f. sp. *Pisi* isolated from pea, ginseng and soybean in Korea. Plant Pathology Journal. 15: 44-47.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J. and Greenberg, J.T., 2009.** Priming in Systemic Plant Immunity. Science. 324: 89-91.
- Kauss, H., Jeblick, W., Ziegler, J. and Krabler, W. (1994).** Pretreatment of parsley (*Petroselinum crispum* L) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. Plant Physiology. 105: 89-104.

- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H. and Wormald, P. J. (2006).** An assessment of the efficiency of fungal DNA methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 65: 48-48.
- Keller, S. (2001).** Fungal growth, production, and sporulation during leaf decomposition in two streams. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5063-5068.
- Kessler, A., Halitschke, R., Diezel, C. and Baldwin, I.T. (2006).** Priming of plant defenses responses in nature by airborne signaling between *Artemisa tridentate* and *Nicotiana attenuate*. *Oecologia*. 148: 280-292
- Lafuente-Rincón, D.F., Barboza-Corona, J.E., Salcedo-Hernández, R., Abraham-Juarez, R., Valadez-Lira, J.A., Quistián-Martínez, D., De la fuente-Salcido, N.M. (2016).** Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS y EF-1 $\alpha$ ) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencias y Tecnología de Alimentos*. 1:417-422.
- Lamb C., Dixon R.A. (1997).** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 251–275.
- Latournerie-Moreno, L., López-Vázquez, J.S., Castañón-Nájera, G., Mijangos-Cortéz, J.O., Espadas-Villamil, G., Pérez-Gutiérrez, .A. y Ruiz-Sánchez, E. (2015).** Evaluación agronómica de germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agroproductividad*. 1: 24-29
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H. and Kunkel, B.N., 2006.** The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for

suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19: 789-800.

**Leonian, L.H. (1922).** Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*. 12: 401-408.

**Leslie, J.F. and Sumerell, B.A. (2006).** The *Fusarium* Laboratory Manual. First edition. State Avenue, Ames, Iowa, USA. Blackwell Publishing. 388. p.

**Liu, J., Maldonado I., Lopez, M., Cheung, F., Town, C. and Harrison M. (2007).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal*. 50: 529-544.

**Long-Solís, J. (1986).** *Capsicum* y cultura, la historia del chilli. Fondo de cultura económica. México. pp. 22

**Long-Solís, J. (2012).** *Capsicum* y cultura. La historia del chilli. México, D.F: Fondo de Cultura Económica.

**López, A. G. F. 1984.** Manejo de Hongos Fitopatógenos. Departamento de Enseñanza e Investigación en parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp. 106-115.

**López, V.A., Tlapal, B.B., Yáñez, M.M.J., Pérez P.R. y Quintos, E.M. (2009).** Etiología de la marchitez del chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca México. *Revista de Fitotecnia* 32: 127-134.

**Lozano AN, Guzmán-Plazola, R.A., Zavaleta, M.E., Aguilar, R.V.H. y Ayala, E.V. (2015).** Etiología y evaluación de alternativas de control de marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en la Vega de Metztitlán, Hidalgo,

México. Revista Mexicana de Fitopatología. 33: 31-53. Disponible en línea:

<http://www.redalyc.org/pdf/612/61240687003.pdf>

**Lazarotto, M., Mezzomo R., Caciara, G.M., Finger G. and Briao M.M.F. (2014).**

Mycelia growth and sporulation of *Fusarium chlamydosporum* species complex under different culture conditions. Revista de Ciencias Agrarias. 57: 35-40.

**Marshall, D.S. and M.C. Rush. 1980.** Infection cushions formation on rice sheaths

by *Rhizoctonia solani* Histological aspects of cultivar resistance. Phytopathology. 70. 947-950.

**Martínez, G., Albarracin, N., Arcia, A., Subero, L. y Albarracin, M. (1996).**

Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. Agronomía Tropical. 46: 265-273.

**Martínez, E.I. (2002).** Caracterización morfológica de tres colectas de chile

manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del Estado de México. Tesis de Licenciatura. Centro Universitario UAEM Tenancingo, México. 103 p.

**Martínez, E.I. (2016).** Caracterización morfológica y molecular de 15 colectas de

chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del estado de México. Tesis de Maestría. Centro Universitario UAEM Tenancingo, México. P.43-56.

**Masuelli, R., and Marfil, C. (2011).** Variabilidad epigenética en plantas y

evolución. BAG. Journal Of Basic And Applied Genetics. 22: 1-8. Consultado de <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/bag/article/view/53>

**Mayr, E. (1963).** Animal Species and Evolution. Belknap, Cambridge. P. 797

**McClintock, B. (1984).** The significance of responses of the genome to challenge.

Science 226: 792-801.

**Monod, J. (1949).** The growth of bacterial cultures. Annual Review Microbiology.

3, 371–394. doi: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

**Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R. and Melgarejo, P. (2003).**

Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. European Journal of Plant Pathology, 109: 515-522.

**Mumm, R., Posthumus, M.A., and Dicke, M. 2008.** Significance of terpenoids in

induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. Plant, Cell and Environment. 31: 575–585. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01783.x.

PMID:18208515.

**Mur, L.A.J., Brown, I.R., Darby, R.M., Bestwick, C.S., Bi, Y.M., Mansfield, J.W.**

**and Draper J. (1996).** Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. The Plant Journal. 9: 559-571.

**Mur, L., Kenton, A., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C. (2006).** The

outcomes of concentration-specific interaction between salicylate and jasmonate signal include synergy, antagonism and oxidative stress leading to cell death.

Plant Physiol. 140: 249-262.

**Nei, M., Maruyama, T. and Chakraborty, R. (1975).** The bottleneck effect and

genetic variability in populations. Evolution. 29: 1–10.

- Nei, M. (2005).** Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 2318–2342.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983).** *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University, University Park. Pennsylvania, USA. 193 p.
- Nomura, K., Melotto, M. and He, S.Y. (2005).** Suppression of host defense in compatible plant- *Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 361-368.
- Nozaki, M. H., Camargo, M. E. and Barreto, M. (2004).** Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 429-432.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000400012>
- Orberá R. T. (2004).** Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 15-19
- Owen-Going, T.N. (2002).** Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in commercial-scale and small-scale hydroponic systems. Thesis of Masters in Environmental Biology. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Owen-Going, N., Sutton, J.C. and Grodzinski, B. (2003).** Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa. 25:155-167.

- Palomo-Rodríguez, M., Lujan-Favela, M., Ávila-Quezada, G. y Berzoza-Martínez, M. (2003).** Enfermedades radicales del cultivo de chile (*Capsicum annuum*) y medidas de control. Fundación Produce Chihuahua-SAGARPA-INIFAP. Publicación especial. p. 11-121
- Perry, L. and Flannery, K. V. (2007).** Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 11905–11909.
- Pérez, G. y Castro, B. (2008).** El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). 1ª. Reimpresión. 135 p.
- Pieterse, C. and Dicke, M. (2007).** Plant interactions with microbes and insects from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science*. 12 (12): 564-569.
- Powis, T. G., Gallaga M.E., Lesure, R., López B.R., Grivetti, L., Kucera, H. and Gaikwad, N. W. (2013).** Prehispanic use of chili peppers in Chiapas, Mexico. *PLOS ONE*, 8, 1–10.
- Pozo, M., Van Loon, L. and Pieterse, C. (2005).** Jasmonates Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23: 211-222.
- Pupilli, F., Labombarda, P., Scotti, C. and Arcioni, S. (2000).** RFLP analysis allows for identification of alfalfa ecotypes. *Plant Breeding* 119: 271-276.
- Ram, L.J., Durr, C., Schawanck, A.A., Robin, M.H., Jean-Perrie S., Cellier, V., Messéan, A. and Jean-Noel, A. (2017).** Integrated management of damping-off diseases. A review *Agronomy for Sustainable Development*. 37: 10. DOI: 10.1007/s13593-017-0417-y

- Ramachandran, S., Deshpande, O., Roseman, C.C., Rosenberg, N. A., Feldman, M.W. and Cavalli-Sforza, L.L. (2005).** Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. Proceedings of the National Academy Sciences of the United states of America 102:15942–15947. DOI: [10.1073/pnas.0507611102](https://doi.org/10.1073/pnas.0507611102)
- Redondo, E. (1974).** Estudio preliminar en la obtención de posibles plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas del hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Agricultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp. 22.
- Richards, E.J. (2006)** .Inherited epigenetic variation - revisiting soft inheritance. Nature Reviews Genetic. 7:395-401
- Ristaino, J.B. and Johnston, S.A. (1999).** Ecologically based line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. Phytopathology. 98: 867-870.
- Romero, C.S. (1993).** Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 347 p.
- Roncero, M.I.G., Di Pietro, A., Ruiz-Roldan, M.C., Huertas-González, M.D., García, M.F.I., Meglec, E., Jiménez, A., Caracuel, Z., Zanco-Zapatero, R., Hera, C., Gomez-Gomez, E., Ruiz-Rubio, M., Gonzalez-Verdejo, C.I. and Paez, M.J. (2000).** Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. Revista Iberoamericana de Micología. 17:47-53.

**Sanzón, G.D., Valdovinos, P.G., Rojas, M.R.I. y Zavaleta, M. E. (2012).** Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología. 30: 66-71.

**Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2018).** Relación de Huertos de Chile Manzano registrados para Exportación del Estado de México a los Estados Unidos de América con tratamiento de Irradiación. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/332452/CHILE\\_MANZANO\\_E\\_DO\\_MEX\\_04\\_06\\_2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/332452/CHILE_MANZANO_E_DO_MEX_04_06_2018.pdf) (consulta, junio 2018).

**Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015).** Producción del chile mexicano. Consultado 22 de agosto 2017. <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/produccion-del-chile-mexicano>

**Shah, J. (2009).** Plants under attack: systemic signals in defence. Current Opinion in Plant Biology. 12: 459–464.

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

**Silva, R.H.V. Uribe, C.T.B. Aguirre, R.J.M. y García, M.S. (2015).** Extracción de ADN y Amplificación de genes ribosomales, cloroplastos, mitocondriales y huesekeeping. Colegio de posgraduados Campus Montecillo. 35p.

- Silvar, C., Merino, F. and Díaz, J. (2006).** Diversity of *Phytophthora capsici* en Northwest Spain: analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease*. 90: 1135-1142.
- Singlenton, L.L., Mihail, J.D. and Rush, Ch.M. (1992).** Methods for research on soil borne Phytopathogenic Fungi. APS Press. St. Paul, Minesota, USA. 264 p.
- Slemmons, C., Johnson, G. and Connell, L.B. (2013).** Application of an automated ribosomal intergenetic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. *Antarctic Science* 25: 44-50.
- Solomon, B.M. (2008).** Biología. Octava Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. P. 1234.
- Spoel, S.H. and Dong, X. (2012).** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunol.* 12: 89–100.
- Takken, F. and Rep, M. (2010).** The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*. 11: 309- 314.
- Thomas, E., Pakala, S., Fedorova, N.D., Nierman, W.C. and Cubeta, M.A. (2012).** Triallelic SNP-mediated genotyping of regenerated protoplasts of the heterokaryotic fungus *Rhizoctonia solani*. *Journal of Biotechnology*. 158: 144–150. 10.1016/j.jbiotec.2012.01.024.
- Traw, M.B., Kim, J., Enright, S., Cipollini, D.F. and Bergelson, J. (2003).** Negative cross – talk between salicylate- and jasmonate- mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*. 12: 1125-1135

**Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C. and Grant, M. (2007).**

*Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. 104: 1075-1080.

**Turlier, M.F., Epavier, A. and Alabouvette, C. (1994).** Early dynamic interactions

between *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic GUS-marked hyphae. Canadian Journal of Botany. 72: 1605-1612

**Vander Vlugt-Bergmans, C.J.B. Brandwagt, B.F., Vant't Klooster, J.W.,**

**Wagemakers, C.A.M. and Van Kan, J.A.L. (1993).** Genetic variation and segregation of ADN polymorphism in *Botrytis cinérea*. Microbiological Research. 97: 1193-1200.

**Van Loon, L., Bakker, P. and Pieterse, C. (1998).** Systemic resistance induced by

rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology. 36: 453-483.

**Van Poecke, R.P.M. and Dicke, M. (2004).** Indirect defense of plants against

herbivores using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. Plant Biology. 6: 387-401.

**Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M.M. and Luna-Ruiz, J.J. (2001).**

Symptomatology and genera of pathogens associated with pepper (*Capsicum annum* L.) root rots in North-Central Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología. 19: 175-181.

**Velásquez, V.R.M., Medina, A.M.M. y Luna, R.J.J. (2001).** Sintomatología y

géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile

(*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 175-181.

**Velásquez, V.R. y Medina, A.M.M. (2002).** La Pudrición de la Raíz de Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. Folleto Científico No. 14. INIFAP. Centro de Investigación Regional Norte-Centro, Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 26 p.

**Verhagen, B., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H., Van Loon, L. and Pieterse, C. (2004).** The transcriptome of rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 17: 895-908.

**Vlot, A.C., Klessig, D. F., Park, S.W. (2008).** Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). Current Opinion in Plant Biology. 11: 436-442.

**Votava, E.J., Baral, J.B. and Bosland, P.W. (2005).** Genetic diversity of chili (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from Northern New Mexico, Colorado and Mexico. Economic Botany. 59: 8-17.

**Watanabe, T. (2002).** Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultures Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.

**White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. PCR Protocols. Academic Press. San Diego, CA Pp.315- 322.

**Yourman, L.F., Jeffers, S.N. and Dean, R.A. (2000).** Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology. 8. 561-581.

**Yousaf, I. and Khalid, A.N. (2007).** In vitro biological control of *Fusarium oxysporum* causing wilt in *Capsicum annuum* . Mycopath. 5: 85-88.

## 10. GLOSARIO

**Anastomosis:** Término usado para aquellos individuos de la misma especie de hongos que, con caracteres de virulencia diferentes (por ejemplo), son capaces de unir sus hifas y producir plasmogamia (unión de contenido citoplasmático). Así pueden presentar sintomatología diferente de la que produciría un grupo individualmente.

**Basic Local Alignment Search Tool (BLAST):** Encuentra regiones de similitud entre las secuencias biológicas. Es un programa que compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos de secuencias y calcula la significación estadística.

**Clorosis:** Amarillamiento de los tejidos normalmente verdes, debido a la destrucción de la clorofila o a la imposibilidad de sintetizarla.

**Coinfección:** Infección simultánea de un organismo huésped por dos o más patógenos.

**Cultivo monospórico:** Son cultivos desarrollados de una espora simple.

**Cultivo de punta de hifa:** Cultivos que se desarrollan a partir del ápice de una hifa.

**Daño:** Perjuicio de la fisiología de la planta debido a una irritación momentánea o transitoria, pero en cualquier caso no continúa.

**Enfermedad:** Se define como una alteración del metabolismo normal de una planta y de su productividad potencial debido a la presencia de un patógeno que interfiere en los procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y desarrollo reproductivo. Es decir que la enfermedad es el resultado de una interacción entre la planta hospedante y el patógeno en determinadas condiciones ambientales y en un tiempo.

**Esclerocio:** Masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias, su función es sobrevivir en periodos ambientales extremos hasta que se den las condiciones favorables para el desarrollo de un nuevo micelio.

**Fenotipo:** Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

**Fitopatógeno:** Término que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas

**Gravedad:**

**Incidencia:** Es la cantidad de individuos o partes contables de un individuo (plantas, frutos, hojas, etc.) afectados por una determinada enfermedad respecto al total analizado expresada en %.

**Inoculación:** proceso mediante el cual un patógeno y un hospedante entran en contacto

**Inocular:** Acción que pone en contacto un patógeno con una planta hospedante o un órgano de ella.

**Inoculo:** Patógeno o partes de él que ocasiona enfermedad

**Infección:** Establecimiento de un parásito dentro de una planta hospedante.

**“In vitro”:** En el medio de cultivo.

**“In vivo”:** En el hospedante.

**Marchitez:** Pérdida de rigidez y caída de los órganos de la planta que por lo general se debe a la falta de agua en su estructura.

**Micelio hialino:** Incoloro, transparente.

**Micelio torulosos:** Micelio hinchado

**Micelio Vegetativo:** Es aquél destinado a dar sostén, protección y nutrición al hongo.

**Micelio Reproductivo:** Es el conjunto de hifas fértiles que nacen del micelio vegetativo pero que se diferencian biológica y morfológicamente para las funciones de reproducción

**Medio de cultivo:** Medio nutritivo preparado para el cultivo de microorganismos.

**Morfotipo:** Grupo de organismos de cualquier taxón con características morfológicas comunes, que pueden ser de una misma especie o de diferentes especies.

**Necrosis:** Síntoma de enfermedad en las plantas caracterizado por la muerte prematura de las células de un tejido u órgano.

**Patogenicidad:** Es la capacidad potencial de un microorganismo para producir una enfermedad.

**Patosistema:** Subsistema ecológico definido por el fenómeno de parasitismo. Un patosistema vegetal puede abarcar una o más especies de plantas más las diversas especies de parásitos: insectos, hongos, bacterias y otros, que utilizan a las plantas. Sin embargo, las aves y mamíferos herbívoros no se consideran parásitos.

**Priming:** Es la activación de respuesta de defensa acompañada de una estrategia efectiva para control de plagas y enfermedades, en la cual un estímulo recibido facilita la respuesta de otro estímulo relacionado y actúa como un mecanismo de memoria.

**Resistencia:** Capacidad de la planta para retardar el desarrollo de un enfermedad.

**Severidad:** Es una estimación visual en la cual se establecen grados de infección en una determinada planta, sobre la base de la cantidad de tejido vegetal enfermo.

**Susceptibilidad:** Incapacidad de una planta para resistir el efecto de un patógeno u otro factor perjudicial.

**Tolerancia:** Capacidad de la planta para minimizar el impacto de la enfermedad en su fisiología, sin interferir con el desarrollo y la multiplicación del patógeno.

**Variabilidad:** Capacidad que tienen los organismos para cambiar sus características de generación en generación.

**Virulencia:** Grado de patogenicidad que posee un microorganismo en función de la gravedad de las lesiones que provoca y de la capacidad que posee para invadir nuevos tejidos.