

46  
2 ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BUSQUEDA DE MARCAS GENETICAS DE  
AISLAMIENTOS DE *Phytophthora capsici* Leo.  
PROVENIENTES DE CHILE.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O  
P R E S E N T A :

MARGARITA DIAZ VALASIS

FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS .....	i
RESUMEN .....	iv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
3.1. Variación Natural de las Cepas .....	11
3.1.1. Colección de Cepas .....	11
3.1.2. Esporulación de las Cepas de <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	12
3.1.3. Reacciones de Auto-Repulsión y Auto-Estimulación .....	12
3.1.4. Patogenicidad de las Cepas de <i>Phytophthora capsici</i> Leo. en Chile .....	13
3.1.5. Reacción de las Cepas de <i>Phytophthora capsici</i> Leo. al Verde de Malaquita .....	14
3.2. Inducción de Variabilidad de la Cepa 6554 de <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	15
3.2.1. Irradiación de Zoosporas con Luz Ultravioleta ....	16
3.2.2. Porcentaje de Germinación de Zoosporas Irradiados .....	17
3.2.3. Aislamiento de Colonias Resistentes a Metalaxyl ..	17
3.2.4. Tasa de Crecimiento de los Aislamientos con Resistencia Natural e Inducida a Metalaxyl .....	18
3.2.5. Prueba de Estabilidad de la Resistencia a Metalaxyl de un Aislamiento con Tasa de Crecimiento Alta .....	19
3.2.6. Variación en la Esporulación de la Cepa 6554 y Aislamientos con Resistencia a Metalaxyl .....	19
3.2.7. Variación en la Morfología de las Colonias de los Diferentes Aislamientos .....	20
3.2.8. Patogenicidad en Chile <i>Capsicum annum</i> L. de los Aislamientos Resistentes a Metalaxyl Procedentes de la Cepa 6554 .....	20

	<i>Pág.</i>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>68</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>76</b>

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO

Pág.

1	CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. DE LA COLECCIÓN DEL CENTRO DE FITOPATOLOGIA C.P., MONTECILLOS, MEX. ....	11
2	ESPORULACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	30
3	ÁREA DE REPULSIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	31
4	PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. EN CHILE ....	34
5	PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. DE LA COLECCIÓN DEL CEFIT EN PLANTAS DE CHILE MULATO V-2, PROCEDENTES DE SEMILLA DE UNA SOLA PLANTA P <sub>1</sub> ....	35
6	PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. DE LA COLECCIÓN DEL CEFIT EN PLANTAS DE CHILE MULATO V-2, PROCEDENTES DE SEMILLA DE UNA SOLA PLANTA P <sub>2</sub> ....	36
7	CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. EN VERDE DE MALAQUITA (VM) ....	38
8	MORFOLOGÍA DE COLONIAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. CULTIVADAS EN PDA CON VERDE DE MALAQUITA. ....	39
9	EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y DEL METALAXYL EN LA GERMINACIÓN DE ZOOSPORAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	43
10	EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y DEL METALAXYL EN LA GERMINACIÓN DE ZOOSPORAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. 24 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ....	44
11	EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y DEL METALAXYL EN LA GERMINACIÓN DE ZOOSPORAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. 48 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ....	45

CUADRO	Pág.
12	CRECIMIENTO DE COLONIAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. PROCEDENTES DE ZOOSPORAS IRRADIADAS Y NO IRRADIADAS EN MEDIO V-8 AGAR CON METALAXYL ..... 46
13 y 14	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS PROCEDENTES DE ZOOSPORAS IRRADIADAS CULTIVADAS EN MEDIO V-8 AGAR CON Y SIN METALAXYL (2a.-6a. transf.) ..... 50 y 51
15 y 16	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS PROCEDENTES DE ZOOSPORAS NO IRRADIADAS CULTIVADAS EN MEDIO V-8 AGAR CON Y SIN METALAXYL (4a. - 5a. transf. )..... 53 y 54
17	CRECIMIENTO EN V-8 CON Y SIN METALAXYL DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A METALAXYL, INDUCIDOS POR RADIACION ULTRAVIOLETA (análisis estadístico) ..... 55
18	CRECIMIENTO EN V-8 CON Y SIN METALAXYL DE AISLAMIENTOS CON RESISTENCIA NATURAL A METALAXYL (análisis estadístico) ..... 57
19	ESTABILIDAD DEL AISLAMIENTO 7-1 CON RESISTENCIA A METALAXYL INDUCIDA POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA ..... 58
20	ESPORULACIÓN Y TASA DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS RESISTENTES DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. A METALAXYL ..... 59
21	MORFOLOGÍA DE COLONIAS CON RESISTENCIA INDUCIDA A METALAXYL ..... 60
22	MORFOLOGÍA DE COLONIAS CON RESISTENCIA NATURAL A METALAXYL ..... 63
23	INOCULACIÓN DE CHILE ( <i>Capsicum annuum</i> Leo.) VARIETADES EARLY JALAPEÑO Y SERRANO CON AISLAMIENTOS RESISTENTES A METALAXYL, PROCEDENTES DE LA CEPA ORIGINAL ..... 66
24	INOCULACIÓN DE CHILE ( <i>Capsicum annuum</i> L.) VARIETADES EARLY JALAPEÑO, POR AISLAMIENTOS ATENUADOS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. . . . . 67

FIGURA		Pág.
1	FENÓMENO DE AUTO-REPULSIÓN EN DIFERENTES CEPAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	32
2	CEPA QUE PRESENTÓ UN MENOR GRADO DE AUTO- REPULSIÓN .....	33
3	CEPA CON GRADO INTERMEDIO DE AUTO-REPULSIÓN	33
4	SÍNTOMAS CAUSADOS POR <i>Phytophthora capsici</i> Leo. EN CHILE VARIEDAD EARLY JALAPEÑO .....	37
5 y 6	EFFECTO DE INHIBICIÓN POR VERDE DE MALAQUITA EN LAS CEPAS C-22 Y 6558 .....	41
7 y 8	CONTRASTE EN INHIBICIÓN POR EFECTO DEL VER- DE DE MALAQUITA .....	42
9	EFFECTO DE LA IRRADIACIÓN DE ZOOSPORAS EN LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo.	47
10	EFFECTO DEL METALAXYL EN LA FORMACIÓN DE CO- LONIAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo. ....	48
11	EFFECTO DE LA IRRADIACIÓN Y DEL METALAXYL EN LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE <i>Phytophthora capsici</i> Leo .....	49
12	EFFECTO INHIBIDOR DEL METALAXYL EN EL CRECI- MIENTO DE COLONIAS RESISTENTES AL MISMO .....	52
13	DIFERENTE TASA DE CRECIMIENTO OBSERVADA POR 10 COLONIAS RESISTENTES A METALAXYL, AISLADAS DEL TRATAMIENTO IRRADIADO .....	52
14	AISLAMIENTO (7-1) PROCEDENTE DEL TRATAMIENTO IRRADIADO CON TASA DE CRECIMIENTO ALTA .....	56
15	CEPA ORIGINAL 6554 EXPUESTA POR VEZ PRIMERA A METALAXYL .....	56
16 y 17	AISLAMIENTOS RESISTENTES INDUCIDOS CULTIVADOS EN MEDIO V-8 AGAR CON Y SIN METALAXYL .....	62
18 y 19	AISLAMIENTOS RESISTENTES NATURALES CULTIVADOS EN MEDIO V-8 AGAR CON Y SIN METALAXYL .....	65

## RESUMEN

En trabajos del género *Phytophthora* realizados por otros investigadores principalmente en torno a estudios básicos de Genética y Citología, se ha visto la necesidad de contar con marcadores genéticos estables que puedan ser utilizados en los mismos. El propósito de este trabajo fue el de caracterizar algunas cepas de *Phytophthora capsici* Leo. de la colección del Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados e inducir variabilidad en el hongo mediante la radiación ultravioleta (UV) con la finalidad de obtener cepas de comportamiento contrastante a la cepa original.

La esporulación, reacciones de auto-repulsión y auto-estimulación, patogenicidad en chile (variedades V-2, jalapeño, serrano) y crecimiento en verde malaquita (VM), fueron los caracteres evaluados en casi todas las cepas. A partir de la cepa 6554 se obtuvieron concentraciones de 500,000 zoosporas por mililitro, las cuales fueron irradiadas con luz ultravioleta de 11 W a 254 nm durante 3 min y se incubaron en medio V-8 agar con metalaxyl a 250  $\mu\text{g/ml}$ , durante 24 horas, con la idea de aislar mutantes resistentes al producto.

En la esporulación se obtuvo un intervalo de variación entre las cepas, que fluctuó desde cero en la cepa 6557, hasta 125,500 esporangios por ml en la cepa 6552. Todas las cepas presentaron autorrepulsión, variando desde un valor de 1.66 por la cepa 6563 hasta 5.76, por la cepa 6554. Se observaron diferencias en patogenicidad obteniéndose



cepas no patógenas a ninguna estirpe de Chile como fue el caso de la cepa 6553; en contraste con otras cepas como la 6554, 84 y 6550 que fueron patógenas a las 3 variedades de Chile probadas.

Cuando se inocularon plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) variedad V-2 procedentes de semilla de una sola planta, hubo cierta constancia en patogenicidad, observándose diferencias marcadas en cepas agresivas, medianamente agresivas y no patógenas.

Se presentó variación en inhibición de crecimiento micelial entre las cepas por efecto del (VM), obteniéndose que la cepa 6551 presentó 0% de inhibición con relación al testigo, en comparación con la cepa 6557 con 89.4%. Las cepas 6551, 84, C-23, 6563, C-22 y 6564 formaron colonias con límites regulares por efecto del (VM).

El tipo de colonia de las diferentes cepas en PDA (papa, dextrosa, agar) fluctuó entre formas arrosadas, uniformes aplanadas, de aspecto "aborregado" y con límites irregulares en general.

Se aislaron 11 colonias resistentes a metalaxyl, inducidas por irradiación y 10 colonias procedentes del tratamiento no irradiado. La mayor tasa de crecimiento se presentó en aislamientos provenientes del tratamiento irradiado (7-1, 52-1, 6-VI, 39-1), observándose un aumento de ésta a mayor número de transferencias.

La estabilidad del aislamiento 7-1, con resistencia inducida a metalaxyl, perdió parcialmente ésta última después de transferencias sucesivas en V-8 agar sin fungicida.

*Algunos aislamientos procedentes de la cepa 6554 (patógena) no dieron lesión en Chile después de irradiación ultravioleta y/o varias transferencias en metalaxyl (22-I; 6-X; 11-RN; 10-bRN).*

## I. INTRODUCCIÓN

Se ha visto que para llevar a cabo estudios de investigación básica en torno a la genética o citología del género *Phytophthora* se requiere contar con información preliminar sobre el comportamiento de las cepas en estudio; es decir, caracterizar y buscar marcadores genéticos estables de referencia.

En otros hongos, el contar con cepas que presentan un comportamiento contrastante o antagónico, ha permitido realizar estudios más específicos donde se ha obtenido información con respecto a requerimientos nutricionales, velocidad de crecimiento, producción de pigmento y propiedades antibióticas como fue el caso del hongo *Streptomyces violaceoruber* 23, cepa mutante obtenida por irradiación ultravioleta. Estas diferencias han ayudado incluso a iniciar estudios encaminados hacia la determinación de la relación taxonómica que guardan las cepas una vez ocurrida la mutación.

En el caso de *Phytophthora*, la gran variabilidad del hongo observada a nivel morfológico, fisiológico, patógeno y de cultivo, dificulta el contar con marcadores estables pues aún a partir de cultivos monozoospóricos se presenta variabilidad. Sin embargo, se ha reportado la utilidad de los marcadores genéticos, en trabajos realizados con *Phytophthora*, para tratar de entender aspectos genéticos del hongo. La variabilidad del hongo es tan amplia que el concepto de especie para *Phytophthora* no se encuentra bien delimitado, pues se --

*requiere obtener mayor conocimiento del rango normal de variación de muchas especies.*

*Por otra parte los mecanismos de variación no podrán ser dilucidados si no se cuenta con mutantes de un solo gen que permitan describir los patrones de la herencia.*

### **1.1. OBJETIVOS**

- *Caracterizar algunas cepas de *Phytophthora capsici* L. de la colección del Centro de Fitopatología (CEFIT), con el propósito de contar con información de referencia útil en estudios posteriores de investigación básica.*
- *Inducir variabilidad en el hongo, mediante agentes físicos (radiación ultravioleta), con la finalidad de obtener cepas de comportamiento contrastante a la cepa original.*

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### Variabilidad Natural de *Phytophthora*

Se han realizado un gran número de trabajos relacionados con la variabilidad en *Phytophthora* tanto en diferentes especies como en la misma especie. Estos trabajos involucran aspectos morfológicos, de cultivo, fisiológicos y patógenos. Es tal la variación que se presenta en *Phytophthora* que la mayoría de los investigadores reconocen que el concepto de especie se encuentra borroso o vago, pues no existe una definición lo suficientemente clara de lo que debería de ser una especie para *Phytophthora*.

Existe la tendencia a aceptar el concepto de que todos los aislamientos deban ajustarse a la descripción morfológica exacta dada para la llamada "especie", sin embargo, Leonian, 1934, menciona que: "El accidente del primer descubrimiento y descripción determina el aislamiento típico, mientras que un descubrimiento subsecuente y observación de otro aislamiento, el cual puede diferir notablemente del original, determina el aislamiento atípico. Por lo tanto esto sólo representa nada más tangible que un mero estado mental". Este mismo autor también dice que: "no hay tal cosa como típico o atípico sino meramente variabilidad de cosas vivientes".

Leonian, 1934, encontró variación en tamaño de esporangios a partir de un aislamiento monozoospórico del patógeno *P. parasitica* Dast. var. rhei.

Zentmyer et al., 1976, demostró que los diámetros de las colonias de 187 aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* Rands provenientes de diferentes regiones del mundo, variaron en un rango de 47.5 a 82.5 mm a los cuatro días de cultivo a 25°C, obteniéndose una media de 67.5 mm.

Shepherd y Pratt, 1974, estudiaron 361 aislamientos monozoosporicos de *P. cinnamomi* provenientes de Australia y encontraron considerable variación en cuanto a tasa de crecimiento en medio de cultivo avena agar.

Waterhouse, 1974, revisó la característica de escisión de esporangios en el género, explicando que en algunas especies los esporangios son desprendidos tanto en el aire como en el agua como es el caso de *P. infestans* (Mont.) de By. y *P. phaseoli* Thaxt. y en algunas otras especies son desprendidos sólo en el agua como *P. palmivora* Butl. y 17 especies más.

Kaosiri et al., 1978, reportaron la longitud del pedicelo como un criterio taxonómico estable para aislamientos de *P. palmivora* a partir de cacao.

Al-Hedaihy y Tsao, 1979, reportaron que la edad del cultivo afecta grandemente el grado de desprendimiento de esporangios, debido a que éstos tienden a desprenderse del micelio sólo cuando éste está maduro. Aunque el porcentaje de esporangios deciduos fue bajo en algunas especies y variaba en diferentes medios, la longitud del pedicelo fue siempre marcadamente uniforme.

### Variabilidad Fisiológica

Zentmyer et al., 1979, demostraron que las zoosporas obtenidas a partir del extracto de raíz y aquellas en medio sintético (Ribeiro et al., 1975) eran consistentemente más grandes que las obtenidas a partir de la cruz en agar zonahoria, avena agar, agar jugo V-8 clarificado o jugo V-8 clarificado sin agar. Por lo tanto el tamaño de los organismos para propósitos taxonómicos debe ser manejado con precaución.

También se ha consignado variación en cuanto a temperatura de crecimiento para *P. cinnamomi* y se tiene de 5 a 16°C (mínima), de 20 a 32°C (óptima) y de 30 a 36°C (máxima) estos rangos fueron considerablemente más amplios que los reportados en la clave de Waterhouse, 1963, en la cual la temperatura mínima es de 5°C, una óptima de 24-28°C y como máxima de 32-34°C.

Shepherd y Pratt, 1973, reportaron que un ecotipo de *P. drechsleri* Tucker de la parte norte de Australia tenía un límite de temperatura más alto de 36-37.5°C, mientras que el límite para el ecotipo del sur era 33-36°C.

L. Erselius (comunicación personal a D.C. Erwin) ha desarrollado un método más refinado con enfoque isoeléctrico para diferenciar biotipos dentro de las especies. Estas herramientas son de gran valor para considerar inter-relaciones entre especies similares.

Boccas y Zentmyer, 1976; Boccas, 1981, utilizaron electroforesis en gel y Halsall, 1976, utilizó serología para diferenciar patrones de proteínas de aislamientos y especies de *Phytophthora*.

Gallindo y Zentmyer, 1967, emplearon la característica de producción de pigmento para diferenciar variantes dentro de la progenie de cruza de aislamientos de  $A_1$  y  $A_2$  de *P. drechsleri*, sin embargo, este parece ser un criterio demasiado variable para ser utilizado como herramienta en la identificación de especies de *Phytophthora*.

Timmer et al., 1970, utilizando un medio de cultivo sintético con tirosina, reportaron la variación en la producción de un pigmento melanínico entre varios cultivos mono-oospóricos de *P. capsici*. Por otra parte observó que dicho pigmento era producido por algunas especies, pero no por otras.

Shepherd, 1976, encontró que *P. cinnamomi* produjo poco o nulo pigmento en un medio que contenía tirosina, pero que la producción del pigmento por el tipo de compatibilidad  $A_1$  de *P. parasitica* era el doble del que producían los aislamientos  $A_2$ , por lo tanto concluyó que la producción de pigmento sería un criterio taxonómico pobre pero podría utilizarse como técnica de prueba o de investigación primaria.

### Variabilidad Patogénica

La variación en la patogenicidad entre aislamientos dentro de las especies se ha reconocido desde hace tiempo.

Caten, 1971; Erwin, 1966 y Jeffrey et al., 1962; han reportado el fenómeno sobre la pérdida de virulencia en el cultivo continuo, pues se sabe que puede variar el tipo de raza patógena o el grado de agresividad. Según Robinson, 1969, la agresividad es un término aplicado a un patógeno para describir los diferentes grados de habilidad del --



mismo para parasitar a la hospedera, tiene una connotación cuantitativa y se considera sea la contraparte de la resistencia horizontal en la hospedera.

Galindo en 1962 determinó grupos de *P. capsici* con diferentes grados de patogenicidad en Chile, pero no le fue posible la determinación precisa de razas debido a la falta de plantas homocigóticas para resistencia, que sirvieran como diferenciales.

Romero en 1962 menciona la posible existencia de cierta especialización fisiológica de *P. capsici* al inocular material de Chile diferente con una suspensión de zoosporas de 20 cepas del hongo.

Polach y Webster en 1972 probaron 23 aislamientos de *P. capsici* en tomate, berenjena, calabaza, melón, calabaza dulce y 6 líneas de Chile, estableciendo 14 grupos de patogenicidad con base en la reacción presentada por los aislamientos en las plantas probadas.

Redondo en 1974 agrupó 44 cepas de *P. capsici* en siete razas patógenas, de acuerdo a la respuesta que daban en seis plantas de Chile que utilizó como diferenciales, observando un rango de patogenicidad del 0-76.1%.

Se ha detectado variabilidad entre aislamientos mediante la introducción de sustancias químicas al medio de cultivo. Galindo y Zentmyer, 1967, diferenciaron el comportamiento de dos aislamientos de *Phytophthora* por la respuesta de éstos al verde de malaquita adicionado al medio de papa dextrosa agar en una concentración de 0.3 ppm; el aislamiento 6500 produjo una colonia pequeña con margen irregular mientras que el 6503

formó una colonia grande y con márgenes irregulares. Observaron además del grupo de compatibilidad sexual, las reacciones de auto-repulsión y auto-estimulación mostradas por los aislamientos 6503 y 6500 respectivamente; éste último fenómeno se presentaba cuando dos o más colonias del mismo aislamiento crecían en la misma caja y al aproximarse los micelios de ambas se formaba un espacio (auto-repulsión) o una mayor concentración de micelio (auto-estimulación).

Coffey y Bower, 1984, observaron la respuesta de un gran número de aislamientos de 6 especies de *Phytophthora* al metalaxyl, obteniendo una diversidad marcada de respuesta al mismo en cuanto a inhibición de micelio se refiere; pero detectando diferencias entre especies. Sugieren que el metalaxyl podría ser útil como herramienta o elemento de ayuda en la identificación de las especies de *Phytophthora*.

Coffey et al., 1984, determinaron la variación en sensibilidad al metalaxyl en aislamientos de *P. cinnamomi* y *P. citricola* Sawada mediante diferencias de crecimiento micelial, producción de clamidosporas, producción de esporangios, germinación de zoosporas enquistadas y formación de oosporas.

Coffey y Young, 1984, estudiaron la respuesta de 3 cepas de *P. infestans* (1 sensible y 2 resistentes) al metalaxyl y el efecto que produce en diferentes concentraciones en: crecimiento micelial, germinación de zoosporas, esporulación "in vitro" y efecto "in vitro" sobre la estructura fina de *P. infestans*.

Stack y Millar, 1985, de 40 aislamientos de *P. megasperma*, obtuvieron un aislamiento insensible a metalaxyl; con excepción de la - - -

insensibilidad a metaloxyl, dicho aislamiento no difería de la cepa original en cuanto a crecimiento total, tasa de crecimiento, esporulación, germinación de propágulos y patogenicidad a alfalfa.

Coffey y Bower, 1984, determinaron la variabilidad entre 8 especies de *Phytophthora* con relación a la respuesta que presentaron al ácido fosfórico. Reportaron entre las especies más sensibles a: *P. citricola*; *P. citrophthora* (Sm. and Sm.) Leo., *P. cinnamomi* y la más tolerante *P. megasperma* Drechsler f.sp. *medicaginis*; fue posible diferenciarlas a nivel de especie en términos de respuesta en crecimiento al  $H_3PO_3$ .

#### Inducción de Variabilidad

Castro, 1968, indujo la producción de mutantes auxotróficos, mediante irradiación de zoosporas; obtuvo 1 mutante de *P. capsici* dependiente de metionina y 2 mutantes de *P. drechsleri* dependientes de tripofano.

Shattock y Shaw, 1975, después de haber tratado a las zoosporas con el mutágeno N-methyl-N'nitro-N-nitroso-guanidina obtuvieron 2 cepas de *P. infestans*, una resistente a cloramfenicol y la otra resistente a estreptomycin.

Bruin y Edgington, 1982, obtuvieron mutantes resistentes de *P. capsici* y de *P. ultimum* Trow por irradiación ultravioleta (UV), utilizando concentraciones de zoosporas del orden de  $3 \times 10^6$ , irradiándolas durante 3 minutos.

*Joseph y Coffey, 1984, indujeron resistencia a metalaxyl "in vitro" mediante el tratamiento a zoosporas con (UV), o con la substancia mutágena N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidina, ambos métodos produjeron un número similar de mutantes resistentes.*

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Variación Natural de las Cepas

##### 3.1.1. Colección de Cepas

Las cepas que se utilizaron en el presente trabajo fueron obtenidas a partir de la colección de cepas de *P. capsici* Leo. del Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados. En el Cuadro 1 se puede ver la procedencia de cada una, así como la parte de la planta de chile de donde fueron aisladas.

CUADRO 1. CEPAS DE *Phytophthora capsici* Leo. DE LA COLECCION DEL CENTRO DE FITOPATOLOGIA, C.P. MONTECILLOS, MEX.

Núm. de cepa	Parte de la planta de donde se aisló	Lugar de procedencia
6554	Rama	San Pablo Tolimán, Qro.
C-22	-	Delicias, Chih.
6551	Tallo	Zacatecas, Zac.
6518	Rama	Guadalupe. Edo. de México
6522	Fruto	Xaltepa Chapingo, Méx.
6552	Fruto	Zacatecas, Zac.
6550	Raíz	Zacatecas, Zac.
6558	Rama	Hacienda El Roble Celaya, Gto.
6553	Fruto	Zacatecas, Zac.
6557	Tallo	Hacienda El Roble Celaya, Gto.
6564	Fruto	San Martín Texm., Puebla
C-23	-	Delicias, Chih.
6563	Fruto	San Luis de la Paz, Gto.
84	-	-

### 3.1.2. Esporulaci3n de las Cepas de *Phytophthora capsici* Leo.

Para cuantificar la producci3n de esporangios de cada cepa se hizo lo siguiente:

El hongo se cultiv3 bajo condiciones ambientales en medio V-8 agar y cuando la colonia tena aproximadamente 7 cm de diámetro, con un sacabocados de 5 mm de diámetro se cortaron 10 círculos a partir de cada cepa cultivada en una caja petri; éstos se colocaron nuevamente en cajas agregándoles agua destilada estéril y sometiéndolos despu3 a la luz constante y a temperatura entre 27 y 28°C para inducir la producci3n de esporangios. Al octavo día se depositaron los círculos de cada cepa por separado en un tubo de ensayo conteniendo 2 ml de agua destilada estéril y una gota de tween 20. Se agitó en Vortex durante minuto y medio tomándose posteriormente 8 lecturas a partir de cada tubo mediante el hematocítmetro; en cada lectura se contó el total de esporangios encontrados en 5 cuadrantes de la cámara (4 externos y uno central), obteniendo así el número de esporangios por mililitro. A estos datos se les practicó análisis de varianza y prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3.1.3. Reacciones de Auto-Repulsi3n y Auto-Estimulaci3n

Para realizar esta prueba se utilizaron 13 cepas de *P. capsici* disponibles, las cuales se pusieron a crecer en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y antes de que el micelio cubriera la caja, se tomaron discos con un sacabocados de 5 mm de diámetro a partir de los límites de la colonia. Se prepararon cajas con medio PDA y se marcaron en la base de la misma en 5 puntos, uno en el centro y 4 distribuidos

de manera equidistante unos de otros formando un cuadrado. Se sembraron 5 colonias de la misma cepa en cada caja de PDA en los puntos previamente marcados, colocando el micelio del disco en contacto con la superficie del agar.

Se hicieron 3 repeticiones de cada tratamiento y se dejaron crecer bajo condiciones de laboratorio, tomándose las lecturas u observaciones 7 días después.

Para cuantificar el grado de repulsión entre los diferentes aislamientos, se utilizó mica de plástico transparente la cual fue colocada y fijada con tela adhesiva debajo de cada caja petri. Después con la ayuda de una caja de transiluminación se fue delimitando el contorno del área por donde pasaba la luz a través de la zona de repulsión, donde no se presentó crecimiento de micelio. Posteriormente esta área fue recortada y pesada en balanza de precisión como una forma de cuantificar el porcentaje de área de repulsión de cada cepa. Se realizó análisis de varianza y prueba de Tukey  $\alpha = 0.05$ .

#### 3.1.4. Patogenicidad de las Cepas de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile

Se inocularon 3 plantas de chile de cada una de las siguientes variedades: serrano, jalapeño y mulato V-2 de 4 a 5 semanas de edad y una altura de 30 cm, cada planta fue inoculada con 13 cepas disponibles del hongo.

Las diferentes cepas fueron cultivadas en medio PDA y se dejaron incubar a temperatura de 25°C hasta que el micelio cubrió las 3/4 partes de la caja. Con un sacabocados de 5 mm de diámetro se cortaron discos

de cada cepa, empleando la técnica de inoculación sobre la hoja establecida anteriormente por Galindo en 1962 con resultados satisfactorios.

Se introdujeron las plantas de Chile en una cámara húmeda, hasta que se formó una película de agua sobre la hoja, se procedió a colocar el disco de agar con micelio del hongo, poniendo en contacto el micelio sobre el haz de la hoja. Para asegurar la infección se utilizó un humidificador con objeto de evitar que se seque el rocío de las hojas por lo menos en 24 horas.

Las lecturas de patogenicidad fueron tomadas 72 horas después de la inoculación.

Una segunda inoculación se llevó a cabo con la idea de encontrar mayor consistencia en la patogenicidad de las cepas; para lo cual se conservó la semilla de plantas de Chile mulato V-2 inoculadas la primera ocasión.

Una vez obtenidas las nuevas plantas, se seleccionaron 10 provenientes de un progenitor y 10 más de otro. Cada planta fue inoculada con las 14 cepas del hongo y siguiendo la técnica de inoculación por micelio descrita anteriormente; asimismo las lecturas se tomaron 72 horas después de inoculadas las plantas.

### 3.1.5. Reacción de las Cepas de *Phytophthora capsici* Leo. al Verde de Malaquita

Se preparó una solución base de verde de malaquita a una concentración de 300 ppm de la cual se añadió al medio la cantidad necesaria para que diera una concentración final de 0.3 ppm.



Se sembraron 3 cajas de cada cepa en medio con verde de malaquita (VM) y otras tres cajas sin VM como testigo, dejándose crecer en una estufa a una temperatura constante de 24-25°C.

Periódicamente se tomaron lecturas de crecimiento micelial, midiendo el diámetro, el tipo y la forma de colonia de cada cepa.

Se efectuó análisis estadístico de varianza de las medias de crecimiento correspondientes a los diámetros, las cuales fueron comparadas con la prueba de Tukey  $\alpha = 0.05$ .

### 3.2. Inducción de Variabilidad de la Cepa 6554 de *Phytophthora capsici*

#### a) Selección de la Cepa 6554 de *P. capsici*

Para aumentar la posibilidad de obtener mutantes en *P. capsici* después de la irradiación con luz ultravioleta, se utilizaron en este trabajo concentraciones de 500,000 zoosporas por mililitro.

Se efectuó un bioensayo el cual consistió en seleccionar primeramente tres cepas que hubiesen producido mayor número de esporangios por mililitro, para después inducir la liberación de zoosporas con el propósito de determinar aquella que tuviera mayor capacidad para hacerlo.

#### b) Preparación del Medio con Metalaxyl

Para la preparación del medio con metalaxyl se utilizó metalaxyl en polvo grado técnico 100% puro, esta sustancia fue provista por CIBA-GEIGY. Se agregó 0.25 g de la misma a un litro de medio V-8 agar para obtener una concentración final de 250  $\mu\text{g/ml}$ ; esta concentración inhibe

el crecimiento del micelio de *P. capsici* en un 90% (Bruin y Edgington 1982).

Para disolver el metalaxyl en polvo se utilizó un mililitro de etanol al 70% y se aforó a 1 lt de medio V-8 agar.

### 3.2.1. Irradiación de Zoosporas con Luz Ultravioleta

Siguiendo la técnica de Bruin y Edgington, 1982, con algunas modificaciones, se indujo el crecimiento del hongo en agar V-8 conteniendo 250 ml de jugo V-8 (clarificado mediante centrifugación por 5 minutos a 5,000 rpm); 4.5 g de  $\text{CaCO}_3$  y 16 g de agar por litro. Para inducir la producción de esporangios se procedió a colocar las cajas con un 60% de crecimiento de micelio debajo de dos tubos de luz fluorescente de 40 W. durante dos días. Una vez que el micelio había cubierto la caja y se observaban grandes cantidades de esporangios en la superficie, se vertieron 10 ml de agua destilada estéril en cada caja; se introdujeron éstas al refrigerador a 4°C 5 min, luego se sometieron a 12°C durante 10 min y después se dejaron a temperatura ambiente hasta que se observara la gran mayoría de esporangios liberando zoosporas; la concentración de zoosporas por mililitro fue de 500,000. Se transfirió el contenido de cada caja a otra estéril con ayuda de una pipeta de 10 ml con punta estéril (Macrosset); agregándose enseguida 1 ml de medio V-8 líquido a cada caja dejándolas reposar por 15 min para provocar el enquistamiento y adherencia de zoosporas al fondo de la caja.

Después de 15 min, se evacuaron las cajas con un aspirador y se marcaron en las mismas los siguientes tratamientos:

<i>T r a t a m i e n t o</i>	<i>Núm. de repeticiones</i>
1. Zoosporas sin metalaxyl, sin irradiación	10
2. Zoosporas sin metalaxyl, con irradiación	10
3. Zoosporas con metalaxyl, sin irradiación	10
4. Zoosporas con metalaxyl, con irradiación	10

Se irradiaron 20 cajas que corresponden a los tratamientos 2 y 4, colocándolas debajo de una lámpara de 11 W. de luz ultravioleta a 254 nm y a una distancia de 20 cm durante 3 minutos.

Las otras 20 cajas quedaron sin irradiar como testigos. Las zoosporas fueron incubadas en medio V-8 agar, conteniendo metalaxyl para los tratamientos 3 y 4.

### 3.2.2. Porcentaje de Germinación de Zoosporas Irradiadas

Después de 2 a 3 horas de haber sido irradiadas las zoosporas y de haber agregado el medio V-8 con metalaxyl, se tomaron lecturas de germinación de zoosporas; esto se hizo contando 10 campos por caja, y en cada campo 10 zoosporas observadas al azar, sumando un total de 100 zoosporas por caja. Asimismo, se tomaron observaciones del tubo germinativo de las zoosporas en los diferentes tratamientos después de 24 y 48 horas, tanto en la base de la caja como en la superficie del agar.

### 3.2.3. Aislamiento de Colonias Resistentes a Metalaxyl

Después de 24 horas se aislaron colonias a partir de los siguientes tratamientos:

3. Zoosporas con metalaxyl, sin irradiación

4. Zoosporas con metalaxyl, con irradiación

Los aislamientos de las colonias se hicieron cuando éstas apenas mostraban crecimiento en la superficie del agar, con ayuda del microscopio y de una aguja de disección aplanada por un extremo a manera de espátula. Se realizaron un total de 100 aislamientos por tratamiento, transfiriendo éstos nuevamente a medio V-8 agar más metalaxyl a la misma concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ .

Las colonias que presentaron crecimiento más rápido, fueron transferidas a cajas individuales con objeto de determinar su tasa de crecimiento. Se reaislaron 10 colonias procedentes del tratamiento no expuesto a irradiación y 11 colonias a partir del irradiado; dichos aislamientos fueron registrados arbitrariamente con una clave para su control.

#### 3.2.4. Tasa de Crecimiento de los Aislamientos con Resistencia Natural e Inducida a Metalaxyl

Con la idea de observar las diferencias entre estos dos tipos de aislamiento, en lo que a tasa de crecimiento y tipo de colonia se refiere, así como la estabilidad que presentaban los mismos, se hicieron transferencias sucesivas a medio V-8 agar con metalaxyl a una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ , y a V-8 agar sin fungicida como testigo.

Se tomaron lecturas de crecimiento de micelio, midiendo 2 diámetros constantes de cada colonia cada 24 horas, registrando las características de la colonia en cuanto a forma, límites y concentración de micelio.

Los datos de crecimiento micelial fueron graficados y a partir de estas gráficas se obtuvo el tiempo que tardaron en crecer hasta completar

60 mm de diámetro en la caja; lo mismo se hizo para las colonias que crecieron en medio V-8 sin metalaxyl.

Los resultados obtenidos a partir de las gráficas se vaciaron en una tabla de datos en la que se indica el número de horas que tardó cada aislamiento en alcanzar 60 mm de crecimiento en cada transferencia. Para concluir esta prueba, se realizó un análisis estadístico de varianza con la idea de ver si existían diferencias significativas de crecimiento en metalaxyl entre aislamientos procedentes de zoosporas irradiadas y no irradiadas.

### 3.2.5. Prueba de Estabilidad de la Resistencia a Metalaxyl de Un Aislamiento con Tasa de Crecimiento Alta

El aislamiento 7-1, con tasa de crecimiento alta, se seleccionó con el propósito de determinar la estabilidad de dicho carácter. Se realizaron hasta 6 transferencias sucesivas de este aislamiento y de la cepa original 6554 en medio V-8 sin metalaxyl y con metalaxyl. Posteriormente la cepa que se había venido transfiriendo en agar V-8 sin el fungicida, fue sometida al medio con fungicida, tomando las lecturas correspondientes a tasa de crecimiento.

### 3.2.6. Variación en la Esporulación de la Cepa 6554 y Aislamientos con Resistencia a Metalaxyl

Para determinar si había diferencias en esporulación entre la cepa original y los aislamientos resistentes a metalaxyl se seleccionaron los aislamientos 39-1 y 7-1, los cuales fueron obtenidos a partir de zoosporas irradiadas y el aislamiento 21-RN, el cual fue obtenido a partir de un

tratamiento sin irradiación. Asimismo, se tomó la cepa original 6554 y se indujo a esporular; tomándose discos de 5 mm de diámetro colocando 10 discos por caja, 3 repeticiones de cada aislamiento, se agregó agua destilada estéril, colocando las cajas bajo luz constante durante 7 días. Posteriormente se vaciaron los 10 círculos en un tubo con agua destilada estéril; se agregó a cada tubo 2 gotas de tween 20 y se agitaron los tubos durante 1 minuto y medio. Se realizaron, con ayuda del hematocítmetro, seis conteos por tubo.

### 3.2.7. Variación en la Morfología de las Colonias de los Diferentes Aislamientos

Para observar la constancia en cuanto a forma y tipo de colonia, se sembraron los aislamientos con resistencia natural e inducida, en medio V-8 agar con y sin metalaxyl, 3 repeticiones de cada una en cada tratamiento.

Para determinar la tasa de crecimiento micelial de los aislamientos, cada tercer día se tomaron lecturas de dos diámetros constantes.

### 3.2.8. Patogenicidad en Chile *Capsicum annuum* L. de los Aislamientos Resistentes a Metalaxyl Procedentes de la Cepa 6554

Con el propósito de ver si los aislamientos resistentes a metalaxyl habfan conservado la patogenicidad que presentó la cepa original 6554; se inocularon 10 aislamientos inducidos por radiación y 9 aislamientos resistentes naturales (RN). Se utilizó la misma técnica de inoculación descrita anteriormente. Se inocularon 5 plantas por aislamiento con excepción del testigo 6554, el cual se inoculó en 11 plantas de cada variedad utilizando chile early jalapeño y serrano. Una vez obtenidos los resultados

de esta inoculación, se seleccionaron aquellos aislamientos que no fueron patógenos a una variedad o a otra y se volvieron a inocular; en esta ocasión se inoculó solamente chile jalapeño.

#### IV. RESULTADOS

##### *Esporulación de las Cepas de Phytophthora capsici*

De acuerdo a los datos obtenidos (Cuadro 2) se identificaron varios grupos: el grupo a que incluye a las cepas 6552 y 6522 con un promedio de 125,500 y 124,875 esporangios por mililitro respectivamente; el grupo b con las cepas 84 y 6554 con 62,500 y 65,750 esporangios por mililitro; el grupo c abarca valores que van desde 15,500 hasta 33,000 esporangios por mililitro y en el cual están contenidas las cepas C-23, C-22, 6518, 6558 y 6551; el grupo d con un intervalo de esporulación de 11,750 a 30,250 incluye a las cepas 6564, C-23, C-22, 6518 y 6558 y el grupo e con esporulación de cero hasta 21,750 esporangios por mililitro en el cual se encuentran las cepas 6657, 6550, 6553, 6563, 6564, C-23 y C-22.

##### *Reacciones de Auto-Repulsión y Auto-Estimulación*

Se observan diferentes grados de auto-repulsión entre las cepas (Fig. 1-3); no se detectaron reacciones de auto-estimulación.

La 6554, 6522 y 6553 están incluidas en el grupo a con 5.76, 4.44 y 3.97 de área de repulsión promedio, respectivamente. Dentro del grupo b que abarca desde 2.5 hasta 3.97 de área de repulsión están las cepas 6518, 6552, 6558, 6551 y 6553. El intervalo del grupo c abarca valores desde 1.66 hasta 3.24 de área de repulsión en donde están incluidas las cepas 6563, 6564, 6557, C-22, C-23, 84, 6518, 6552, 6558 y 6551 (Cuadro 3).



*Patogenicidad de las Cepas de P. capsici L. en Chile*

Los aislamientos que produjeron un mayor número de hojas con lesión fueron el 6554, 84 y 6550 que de 9 hojas inoculadas 8 hojas presentaron síntomas (Cuadro 4).

La cepa 6553 no produjo lesión en ninguna de las tres variedades de Chile. Entre estos dos extremos hay niveles diversos en patogenicidad.

Específicamente para cada variedad de Chile se obtuvo que en el caso de la variedad V-2, la cepa 6553 no fue patógena y la 6557 dio una hoja con lesión de 3 inoculadas.

Para la variedad early jalapeño las cepas 6522, 6557, 6564, 6558, 6553, 6552 y C-23 no fueron patógenas y las demás variaron de regularmente patógenas (2/3)\* hasta poco patógenas (1/3) (Fig. 4).

En la variedad serrano se obtuvo que las cepas 6557 y 6553 no dieron lesión y las demás variaron desde muy patógenas (3/3); regularmente patógenas (2/3) y poco patógenas (1/3).

Se observa cierta constancia en la patogenicidad de las cepas inoculadas en 10 plantas de Chile procedentes de auto-fecundación de una estirpe de Chile P<sub>1</sub> (Cuadro 5) y otras 10 plantas procedentes de otro progenitor P<sub>2</sub> (Cuadro 6).

Las cepas que dieron lesión en mayor número de plantas (10/10)\*\* fueron: 6563, C-23, C-22, 84, 6558, 6518, 6564 y 6554, la cepa 6522 dió

\* Núm. de hojas con síntomas/Núm. de hojas inoculadas.

\*\* Núm. de plantas con lesión/Núm. de plantas inoculadas.

9/10 en  $P_1$  y 10/10 en  $P_2$ ; la cepa 6552 indujo lesiones en 8/10\*\*; la 6551 en 6/10; la 6550 1/10; la cepa 6557 dió 3/10 en  $P_1$  y 0/10 en  $P_2$  y la cepa 6553 no fue patógena al chile V-2 (Cuadros 5 y 6).

#### Reacción de las Cepas de *Phytophthora capsici* al Verde de Malaquita (VM)

Se observó diferencia en sensibilidad al verde de malaquita (Cuadro 7). Las cepas que menos crecieron en el medio con verde de malaquita con relación al testigo fueron: la 6557 con un 89.4% (Fig. 8); la C-22 con un 88.8% (Fig. 5); la 6553 con un 86.0%; la 6554 con un 85%; la 6563 con un 80.6%; la 6550 con 78.45%; la C-23 con 72%; la 6558 con 69.6% (Fig. 6); la 6522 con 69.48%. Las que fueron inhibidas en términos regulares fueron: la 6552 con 64.2%; la 84 con 51.1% y las de menor inhibición fueron: la 6554 con 39.8% y la 6518 con 37.5%. La cepa 6551 no fue afectada en el medio con el verde de malaquita (Fig. 7). En cuanto al efecto del verde de malaquita en la morfología de las colonias en general se observó mayor definición en la forma de las mismas, micelio aplanado y formación de bordes regulares en las cepas 84, C-23, 6563, C-22 y 6564 (Cuadro 8).

#### Irradiación de Zoosporas con Luz Ultravioleta

##### Porcentaje de Germinación de Zoosporas Irradiadas

En el tratamiento I (testigo) donde las zoosporas no fueron irradiadas ni tratadas con metalaxyl, se obtuvo 90.2% de germinación. Las zoosporas tratadas sin irradiación y con metalaxyl tuvieron 87.0% este tratamiento está incluido en el grupo a igual que el testigo. Un 73% de las zoosporas irradiadas y sin metalaxyl germinaron, este tratamiento es significativamente menor al testigo de acuerdo con la prueba de Tukey; las que fueron sometidas tanto a irradiación como a metalaxyl tuvieron un --

\*\* Núm. de plantas con lesión/Núm. de plantas inoculadas

27.2% de germinación, observándose una diferencia marcada con relación al testigo grupo c (Cuadro 9).

En cuanto al tubo germinativo, se observó que después de 2-3 horas los tratamientos en donde se aplicó radiación, tuvieron mayor inhibición del crecimiento, siguiéndole en segundo lugar las tratadas con metalaxyl y luego el testigo que presentó un tamaño de 5 a 6 veces mayor que el tamaño de la zoospora. En las lecturas tomadas después de 24 horas se observó que en los tratamientos en los que se utilizó metalaxyl (III y IV) las zoosporas produjeron tubos germinativos hasta 10 veces mayor a su tamaño y en la superficie del agar no hubo formación de colonias (Cuadro 10). En el tratamiento II, en donde se utilizó irradiación sin metalaxyl (Cuadro 11), se observó que el micelio cubría el fondo de la caja y colonias bien delimitadas en la superficie del agar que no tendían a coalescer unas con otras como fue el caso del testigo (Fig. 9). Posteriormente, a las 48 horas se observó que en el tratamiento en el que se utilizó metalaxyl (III) los tubos germinativos de la zoosporas empezaron a ramificarse; sin embargo, en la superficie del agar se formaron escasas colonias (Fig. 10).

Asimismo, para el tratamiento (IV) con irradiación y metalaxyl casi no se observaron colonias en la superficie (Fig. 11), y las que llegaron a formarse, fueron aisladas como posibles mutantes.

#### Aislamiento de Colonias Resistentes a Metalaxyl

Se observó que las colonias procedentes de zoosporas sin irradiar y expuestas a metalaxyl presentaron un crecimiento más lento que las --

*irradiadas. Al tercer día 37% de las colonias procedentes de zoosporas irradiadas creciendo en metalaxyl, tuvieron un tamaño promedio de 1.6 mm; al noveno día se obtuvo un 87% de colonias creciendo con un tamaño promedio de 11.2 mm.*

*De las colonias procedentes de zoosporas no irradiadas y sembradas en metalaxyl se obtuvo, al tercer día un 3% de colonias en crecimiento con un tamaño promedio de 0.1 mm y al 9o. día se obtuvo un 90% de colonias creciendo con un tamaño promedio de 5.5 mm (Cuadro 12).*

*Tasa de Crecimiento de los Aislamientos con Resistencia Natural e Inducida a Metalaxyl*

*Los aislamientos irradiados que crecieron a una temperatura constante de 24-25°C aumentaron su tasa de crecimiento conforme se incrementó el número de transferencias, esto se presentó tanto en V-8 agar, como en V-8 agar con metalaxyl, sin embargo, las que crecían en V-8 agar con metalaxyl no alcanzaron la tasa de crecimiento de sus testigos creciendo en V-8 Agar solamente (Cuadros 13 y 14).*

*En el aislamiento 7-1 creciendo en V-8 Agar con metalaxyl por ejemplo, en la 2a. transferencia a metalaxyl tardó 192 horas para cubrir el 66% de la caja y 143.5 horas en V-8 sin fungicida (Cuadro 13). Posteriormente el mismo aislamiento 7-1, en su sexta transferencia a metalaxyl tardó 110 horas en cubrir nuevamente el 66% de la caja y 94 horas en V-8 sin metalaxyl, lo mismo sucedió en todos los demás aislamientos (Cuadro 14).*

*El orden de los aislamientos de mayor a menor tasa de crecimiento tiende a variar, aunque se observa cierta constancia entre los que tienen mayor tasa de crecimiento como son: el 7-1; 52-1; 6-VI; 39-1; los de*

tasa de crecimiento baja: 10-I, 32-I y 6-VIII (Figs. 12 y 13).

En los aislamientos procedentes de zoosporas no irradiadas, también se observó un incremento en la tasa de crecimiento a medida que aumentó el número de transferencias tanto en medio con metalaxyl como en V-8 (Cuadros 15 y 16). A diferencia de los anteriores, el intervalo en la tasa de crecimiento en general es menor, aunque existen algunos que tienen tasas de crecimiento similares.

En los Cuadros 17 y 18 después de llevar a cabo análisis estadístico con la prueba de Tukey, se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la tasa de crecimiento en metalaxyl tanto de aislamientos procedentes del tratamiento irradiado (Cuadro 17), como del no irradiado (Cuadro 18). Se observa que el orden de los aislamientos tiende a ser similar al de cuadros anteriores, sobre todo de aquéllos que presentaron tasa de crecimiento alta (Figs. 14 y 15).

#### *Prueba de Estabilidad de la Resistencia a Metalaxyl de un Aislamiento con Tasa de Crecimiento Alta*

El aislamiento 7-I después de haber sido transferido en 6 ocasiones en medio V-8 y puesto a crecer nuevamente en medio V-8 con metalaxyl, tuvo un porcentaje promedio de cobertura de 24.8 con relación al testigo (6554) que presentó un 2.9%. Se observó una diferencia significativa entre estos tratamientos, según el análisis estadístico (Cuadro 19).

Cuando el aislamiento 7-I fue transferido sucesivamente en medio con metalaxyl hasta su 7a. transferencia (ver Cuadro 19), el porcentaje medio de crecimiento micelial (34.3), fue significativamente mayor grupo c) que en el caso en donde el aislamiento 7-I fue transferido sucesivamente

en V-8 y después transferido a medio con metalaxyl (grupo d).

El aislamiento 7-1 presentó menor tasa de crecimiento micelial promedio (75.6) que la cepa 6554 original (88.2) en medio sin metalaxyl, es ta diferencia es significativa según análisis estadístico.

La cepa original 6554 al ser expuesta por primera vez a medio con fungicida creció muy escasamente, obteniéndose un valor promedio de crecimiento micelial (2.9) significativamente menor al del aislamiento 7-1 expuesto a metalaxyl después de sucesivas transferencias en V-8 sin me talaxyl (24.8).

Variación en la Esporulación de la Cepa 6554 y Aislamientos con Resisten cia a Metalaxyl

El aislamiento 39-1, resistente inducido a metalaxyl creciendo en medio V-8 agar produjo una concentración promedio de 94,222 esporangios por mililitro. El mismo aislamiento creciendo en V-8 agar con el fun gicida produjo una concentración promedio de 65,722 esporangios por mililitro. La cual es significativamente menor que la anterior (Cuadro 20).

Por el contrario, el aislamiento 21RN (resistencia natural) presentó una mayor concentración de esporangios por mililitro cuando se puso a crecer en metalaxyl (61,500) que el que creció en V-8 agar (48,056).

El aislamiento 6-VI, resistente inducido, produjo una concentración de 22,278 esporangios por mililitro creciendo en V-8 agar y de 17,833 creciendo en V-8 más el fungicida, lo que no es significativamente diferente.

En el caso del testigo, que fue la cepa original 6554, su esporulación fue significativamente menor con relación a los aislamientos 39-I V8; 21-RN META; 39-I-META y 21-RN V-8. Para el aislamiento 6-VI RI (resistente inducido) no hubo diferencias en comparación con el testigo. En general no se observó que existiera una correlación entre el grado de esporulación y el tipo de aislamiento.

#### Variación en la Morfología de las Colonias de los Diferentes Aislamientos

De manera general se observaron colonias de formas arrosetadas, estrelladas, lisas uniformes que por efecto del metalaxyl acentuaban más estos caracteres. La mayoría de los aislamientos presentaron bordes irregulares y micelio aterciopelado o algodonoso más concentrado al centro de la colonia que en los límites. El micelio en algunos aislamientos creció más abundantemente en medio V-8 agar sin metalaxyl (Cuadros 21 y 22) -- (Figs. 16-19).

#### Patogenicidad en Chile *Capsicum annuum* L. de los Aislamientos Resistentes a Metalaxyl Procedentes de la cepa 6554

Los aislamientos 6-VIII; 22-I, 6-X resistentes inducidos y los aislamientos: 14-RN, 18-RN y 10-b RN resistentes naturales, no fueron patógenos a Chile *Capsicum annuum* variedad early jalapeño y los aislamientos: 6-X, 14-RN, 11-RN y 10-b RN no dieron lesión en la variedad serrano (Cuadro 23).

Al ser inoculados por segunda vez en Chile jalapeño, los aislamientos 22-I, 6-X, 14-RN, 11-RN y 10-bRN se mantuvieron estables, es decir, no fueron patógenos; mientras que los aislamientos 6-VIII y 18-RN sí dieron lesión en esta variedad (Cuadro 24).

CUADRO 2. ESPORULACION DE LAS CEPAS DE *Phytophthora capsici* L.

Núm. Cepa	Esporangios por ml
6552	125,500 a
6522	124,875 a
6554	65,750 b
84	62,500 b
6551	33,000 c
6558	30,250 cd
6518	30,250 cd
C-22	21,750 cde
C-23	15,500 cde
6564	11,750 de
6563	10,000 e
6553	5,425 e
6550	5,375 e
6557	0 e

Las cepas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).



CUADRO 3. AREA DE REPULSION DE LAS CEPAS DE *Phytophthora capsici* L. EN mg DE POLIETILENO

Núm. Cepa	$\bar{X}$
6554	5.7600 a
6522	4.4400 a
6553	3.9667 ab
6551	3.2367 bc
6558	3.1200 bc
6552	3.0033 bc
6518	2.5700 bc
84	2.1667 c
C-23	2.0600 c
C-22	2.0433 c
6557	1.8700 c
6564	1.7433 c
6563	1.6633 c

Las cepas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).



Fig.

1. Fenómeno de Auto-Repulsión en diferentes cepas de *Phytophthora capsici* L., observándose variación entre las mismas.

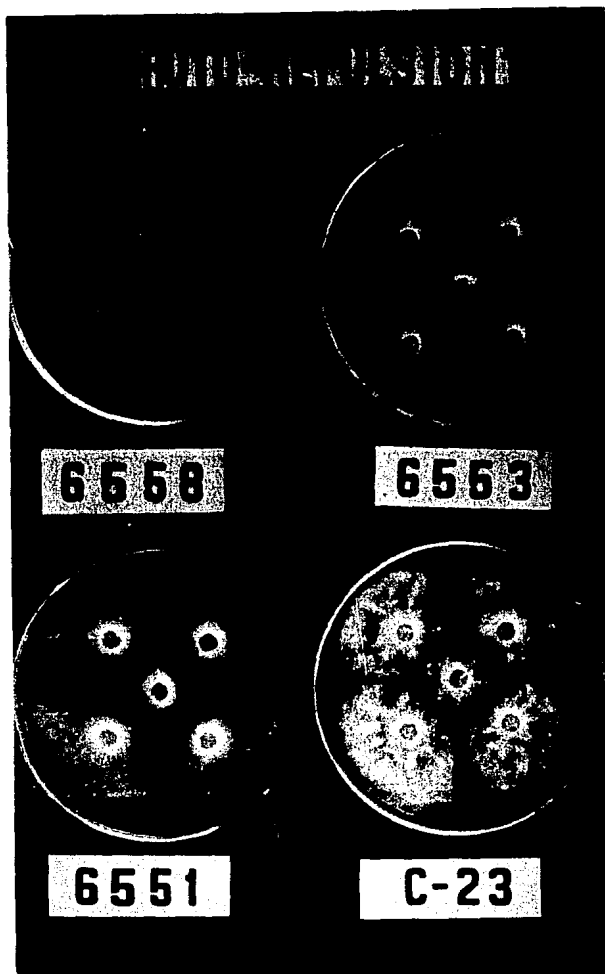
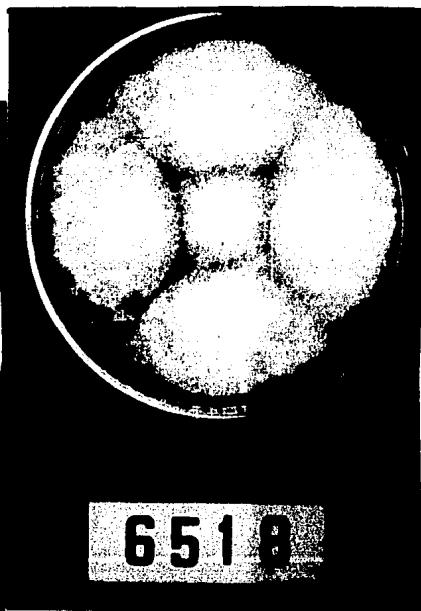
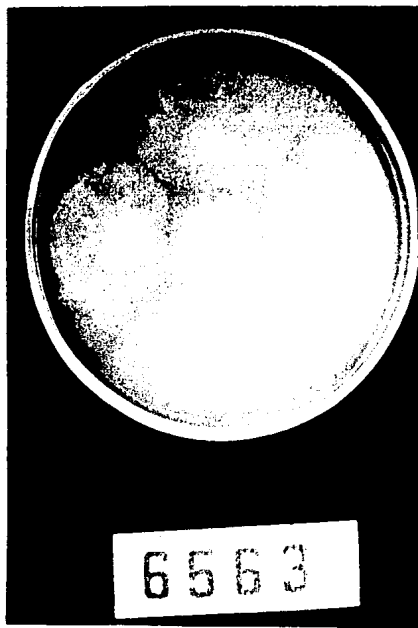


Fig.

1. Fenómeno de Auto-Repulsión en diferentes cepas de *Phytophthora capsici* L., observándose variación entre las mismas.

*Fig. 2. Cepa que presentó el menor grado de auto-repulsión. Se distingue levemente dicha área.*



*Fig. 3. Cepa con grado intermedio de auto-repulsión (Cuadro 2).*

CUADRO 4. PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE

Núm. de Cepa	Variedad de Chile			Suma
	V-2	Early Jalapeño	Serrano	
6518	*2/3	1/3	2/3	<sup>2</sup> *5/9
C-22	2/3	2/3	3/3	7/9
C-23	3/3	0/3	2/3	5/9
6552	2/3	0/3	1/3	3/9
6553	0/3	0/3	0/3	0/9
6554	3/3	2/3	3/3	8/9
6558	2/3	0/3	3/3	5/9
6563	2/3	1/3	3/3	6/9
6564	3/3	0/3	3/3	6/9
84	3/3	2/3	3/3	8/9
6550	3/3	2/3	3/3	8/9
6557	1/3	0/3	0/3	1/9
6522	3/3	0/3	2/3	5/9

\* Núm. de hojas con síntomas/Núm. de hojas inoculadas.

<sup>2</sup>\*Núm. total de hojas con síntomas/Núm. total de plantas inoculadas.

CUADRO 5. PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE *P. capsici* L. DE LA COLECCION DEL CEFIT EN PLANTAS DE CHILE MULATO (*Capsicum annuum* L.) VARIEDAD V-2, PROCEDENTES DE SE MILLA DE UNA SOLA PLANTA P<sub>1</sub>.

Núm. de Cepa	Núm. de plantas con lesión Núm. total de plantas inoc.	Intensidad promedio* de ataque
6563	10/10	2.9
C-23	10/10	3.0
C-22	10/10	2.9
6522	9/10	1.8
6557	3/10	0.4
6550	1/10	0.1
84	10/10	2.7
6552	8/10	1.2
6558	10/10	3.0
6518	10/10	2.7
6551	6/10	1.0
6564	10/10	2.9
6554	10/10	2.9
6553	0/10	0.0

\* Escala (considerando el tamaño de la lesión o grado de marchitez de la hoja).

0 = sin ataque

1 = ataque benigno

2 = ataque medio

3 = ataque fuerte

**CUADRO 6. PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE *P. capsici* L. DE LA COLECCIÓN DEL CEFIT EN PLANTAS DE CHILE MULATO (*Capsicum annuum* L.) VARIEDAD V-2, PROCEDENTES DE SEMILLA DE UNA SOLA PLANTA P<sub>2</sub>.**

Núm. de Cepa	Núm. de plantas con lesión Núm. total de plantas Inoc.	Intensidad promedio* de ataque
6563	10/10	2.7
C-23	10/10	2.8
C-22	10/10	3.0
6522	10/10	1.9
6557	0/10	0.0
6550	1/10	0.1
84	10/10	2.8
6552	8/10	1.2
6558	10/10	3.0
6518	10/10	2.9
6551	6/10	1.0
6564	10/10	3.0
6554	10/10	3.0
6553	0/10	0.0

\* Escala (considerando el tamaño de la lesión o grado de marchitez de la hoja).

- 0 = sin ataque
- 1 = ataque benigno
- 2 = ataque medio
- 3 = ataque fuerte



Fig.

4. Síntomas causados por *P. capsici* en plantas de chile variedad early jalapeño.



CUADRO 7. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Phytophthora capsici* L. EN VERDE DE MALAQUITA (VM).

Núm. Cepa	$\bar{X}\%$ Cobertura con (VM)	$\bar{X}\%$ Cobertura sin (VM)	% Cobertura con relación al testigo	% Inhibición con relación al testigo
6551	100 a	100 a	100	0
6518	62.5 cd	100 a	62.5	37.5
6554	49.5 e	82.2 b	60.2	39.8
84	48.9 ef	100 a	48.9	51.1
6552	29.0 gh	80.9 b	35.8	64.2
C-23	28.0 gh	100 a	28.0	72.0
6563	19.4 hi	100 a	19.4	70.6
6550	13.9 ij	64.5 c	21.6	78.5
6522	11.8 ij	38.4 fg	20.7	69.5
C-22	11.2 ij	100 a	11.2	88.8
6558	11.1 ij	36.5 g	30.4	69.6
6564	10.1 ij	67.3 c	15.0	85.0
6553	7.3 j	52.0 de	14.0	86.0
6557	6.1 i	57.3 cde	10.6	89.4

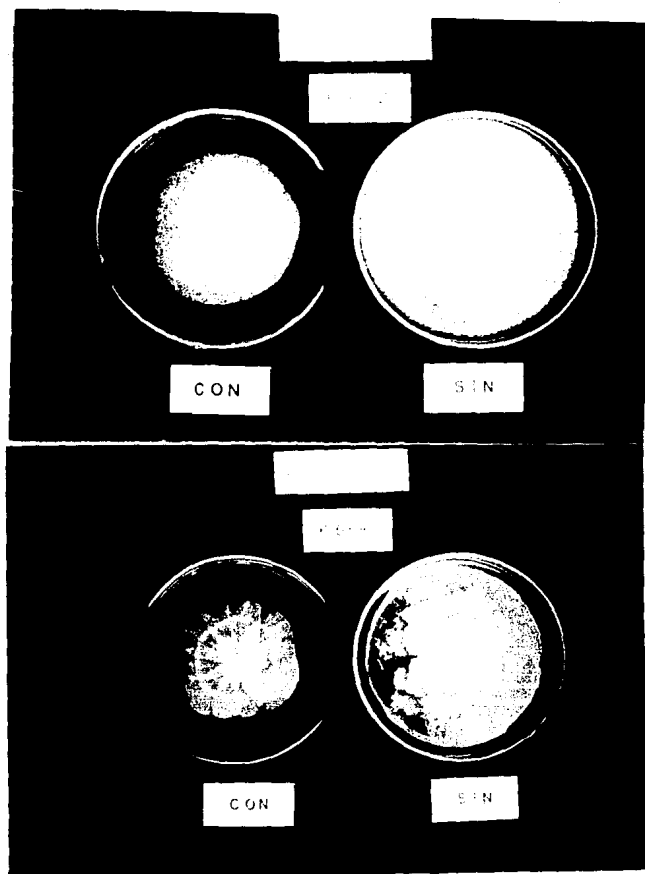
Los tratamientos con la misma letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

CUADRO 8. MORFOLOGIA DE COLONIAS DE *P. capsici* L. CRECIENDO EN PDA CON VERDE DE MALAQUITA

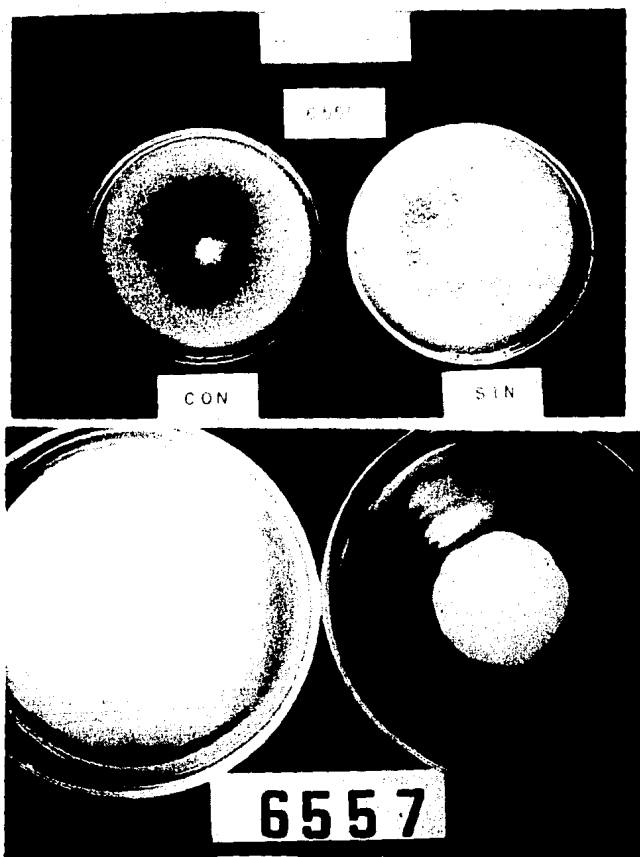
Núm. de Cepa	P D A			PDA CON VERDE MALAQUITA		
	Forma	Aspecto Colonia	Límites	Forma	Aspecto Colonia	Límites
6551	Uniforme extendida	Aterciopelada	± Regulares	Uniforme extendida	Aterciopelada	Regulares
6518	Uniforme extendida	Aterciopelada, lisa	Irregulares	Uniforme extendida	Aterciopelada, lisa	Irregulares
6554	Roseta difusa	Algodonosa, abultada	Irregulares	Estrellada rayos definidos	Aterciopelada, sin abultamiento	Irregulares
84	Roseta difusa	Algodonosa	Irregulares	Uniforme extendida	Lisa, aplanada	Regulares
6552	Circular "aborregada"	Algodonosa	Irregulares	Indefinida	Algodonosa al centro, aplanada hacia orillas	Irregulares
C-23	Indefinida	Algodonosa	Irregulares	Indefinida	Algodonosa al centro, aplanada radial hacia orillas	Regulares
6563	Roseta difusa	Aterciopelada aplanada	Irregulares	Uniforme extendida	Lisa, aplanada micelio escaso	Regulares
6550	Roseta	Aterciopelada	Irregulares	Estrellada rayos definidos	Aplanada no algodonosa	Irregulares
6522	Indefinida	Algodonosa	Irregulares	Indefinida	Algodonosa al centro, aplanada radial hacia orillas	Irregulares

Cuadro 8 (cont.).

Núm. de Cepa	P D A			PDA CON VERDE MALAQUITA		
	Forma	Aspecto Colonia	Límites	Forma	Aspecto Colonia	Límites
C-22	Indefinida	Algodonosa concentrado en partes	Irregulares	Uniforme extendida	Algodonosa homogénea	Regulares
6558	Lobulada marcada	Aterciopelada	Irregulares	Roseta definida	Aplanada, es-caso micelio	Irregulares
6564	Aborregada	Algodonosa abundante	Irregulares	Circular regular	Aterciopelada	Regulares
6553	Indefinida	Aterciopelada	Irregulares lobulados	Irregular amorfa	Aterciopelada	Irregulares lobulados
6557	Indefinida	Aterciopelada con micelio abundante al centro	Irregulares lobulados	Indefinida	Aterciopelada aplanada con micelio al centro	Irregulares



*Figs. Inhibición por efecto del verde malaquita. La cepa C-22 5 y 6. presentó 88.8% de inhibición con relación al testigo y la 6558 un 69.6% (ver Cuadro 7).*



*Figs. 7 y 8. Contraste en inhibición por efecto del verde malaquita observado en dos cepas. La Figura superior con 0% de inhibición, la inferior con 89.4% con relación al testigo. (Ver Cuadro 7).*

**CUADRO 9. EFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y DEL METALAXYL EN LA GERMINACION DE ZOOSPORAS DE *Phytophthora capsici* L.**

<i>Tratamiento</i>	$\bar{X}$ % Germinación*	<i>Observaciones**</i>
I Sin irradiación y Sin metalaxyl	90.2 a	- Tubo germinativo de 5 a 6 veces el tamaño de la zoospora
II Con irradiación y Sin metalaxyl	73.0 b	- Tubo germinativo muy corto - Grupos de zoosporas sin germinar
III Sin irradiación y Con metalaxyl	87.0 a	- Tubo germinativo muy corto
IV Con irradiación y Con metalaxyl	27.2 c	- Tubo germinativo muy corto

\* Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

\*\* Lecturas tomadas después de 2-3 horas de tratamiento.

**CUADRO 10. EFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y DEL METALAXYL EN LA GERMINACION DE ZOOSPORAS DE *Phytophthora capsici* L. DESPUES DE 24 HORAS DEL TRATAMIENTO**

Tratamiento	Base de Caja	Superficie del Agar
I Sin irradiación y Sin metalaxyl (testigo)	- Redes de micelio cubriendo el fondo de la caja	- Colonias creciendo, algunas zoosporas no germinadas
II Con irradiación y Sin metalaxyl	- Micelio ramificado cubriendo el fondo de la caja	- Colonias creciendo igual que el testigo
III Sin irradiación y Con metalaxyl	- Zoosporas con tubo germinativo de hasta 10 veces su tamaño	- Zoosporas germinando con tubo germinativo entrelazado sin formación de colonias como el testigo
IV Con irradiación y Con metalaxyl	- Zoosporas con tubo germinativo de hasta 10 veces su tamaño	- Zoosporas germinadas aisladas, no se forman colonias

**CUADRO 11. EFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y DEL METALAXYL EN LA GERMINACION DE ZOOSPORAS DE *Phytophthora capsici* L. DESPUES DE 48 HORAS DEL TRATAMIENTO**

Tratamiento	Base de Caja	Observaciones
I Sin irradiación y Sin metalaxyl (testigo)	- Fondo de caja cubierto por micelio	- Gran cantidad de colonias que coalescen formando tapete de micelio
II Con irradiación y Sin metalaxyl	- Grupos de zoosporas que no germinaron lo que produce áreas claras y áreas difusas donde germinaron zoosporas cuyo micelio creció hacia la superficie del agar	- Colonias bien delimitadas no tienden a juntarse como en el testigo
III Sin irradiación y Con metalaxyl	- Zoosporas con tubo germinativo largo, mayor a 10 veces su tamaño y algunas poco ramificadas	- Zoosporas germinadas en la superficie, colonias muy escasas
IV Con irradiación y Con metalaxyl	- Zoosporas con tubo germinativo largo, mayor a 10 veces su tamaño y algunas poco ramificadas	- Algunas zoosporas germinadas - Colonias pequeñas y muy escasas



CUADRO 12. CRECIMIENTO DE COLONIAS DE *P. capsici* L. PROCEDENTES DE ZOOSPORAS IRRADIADAS Y NO IRRADIADAS EN MEDIO V-8 AGAR CON METALAXYL

Tratamiento	% Colonias* creciendo después de:			Tamaño $\bar{X}$ de colonias en mm después de:		
	3 días	6 días	9 días	3 días	6 días	9 días
Con irradiación						
y	37	73	87	1.6	5.5	11.2
Con metalaxyl						
Sin irradiación						
y	3	54	90	0.1	1.5	5.5
Con metalaxyl						

\* Promedio de 100 colonias sembradas.

CUADRO 13. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS PROCE-  
DENTES DE ZOOSPORAS IRRADIADAS

Colonia	V-8 Agar con MetalaXYI		V-8 Agar		Diferencia en crecimiento mm/día
	mm/día**	Horas	mm/día**	Horas	
39-1	9.4	153	10.5	136	1.1
6-VI	8.0	180	10.6	135	2.6
7-1	7.5	192	10.0	143	2.5
52-1	7.3	195	10.0	142	2.8
6-VII	6.9	208	8.4	170	1.5
6-X	6.5	219	7.3	195	0.8
22-1	6.3	226	8.9	161	2.6
6-IX	5.8	247	7.7	187	1.9
6-VIII	5.7	251	7.2	200	1.5
10-1	5.3	270	7.3	197	2.0
32-1	5.2	272	6.6	215	1.4

\*\* Lectura a los 60 mm de crecimiento (2a. transf.)



Fig.

9.

*Zoosporas irradiadas. Después de 48 horas se observan colonias más delimitadas que en el testigo.*

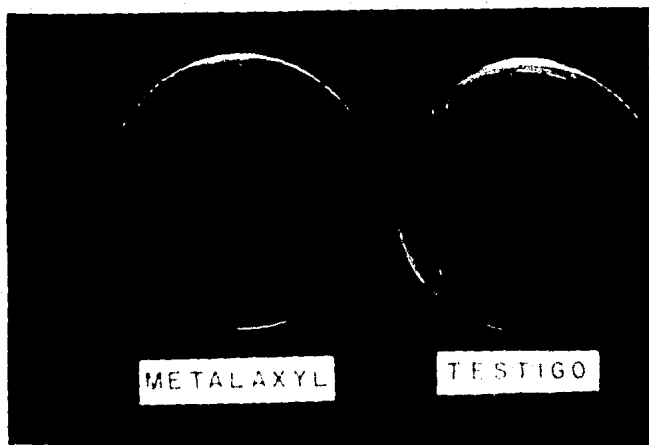
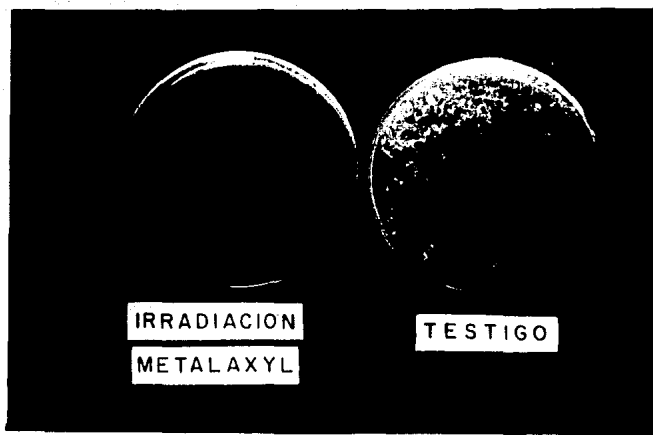


Fig.

10.

*Tratamiento con metalaxyl, después de 48 horas se forman colonias en la superficie en menor número que el irradiado.*



*Fig. Tratamiento con irradiación y metalaxyl. Casi no se observan  
11. colonias (Ver Cuadro 11).*

CUADRO 14. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS PROCE-  
DENTES DE ZOOSPORAS IRRADIADAS

Colonia	V-8 Agar con Metaxyl		V-8 Agar		Diferencia en crecimiento mm/dfa
	mm/dfa	Horas	mm/dfa**	Horas	
7-1	13	110	15.3	94	2.3
52-1	12	120	15	95.5	3
6-VI	11.4	126.5	16.3	88	4.9
39-1	11	130.5	13	110.5	2
6-VII	10.6	135.5	12.9	111	2.3
6-IX	9.2	155.5	15.5	93	6.3
6-X	8.3	172.5	11.6	123.5	3.3
22-1	7.1	202	12.6	114.5	5.5
10-1	7.0	205	12.3	117	5.3
32-1	6.9	206	11.8	122.5	4.9
6-VIII	6.2	233	Se contaminó		

\*\* Lectura a los 60 mm de crecimiento (6a. transf.).

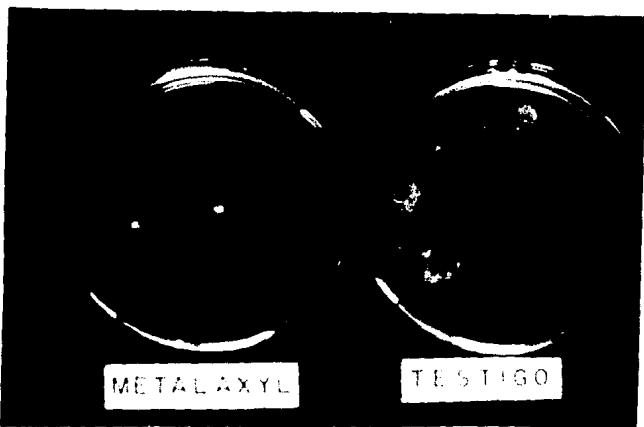


Fig. 12. Efecto inhibitor del metalaxyl en el crecimiento de colonias resistentes al mismo.



Fig. 13.

Diferente tasa de crecimiento observada por 10 colonias resistentes a metalaxyl, aisladas del tratamiento irradiado.

**CUADRO 15. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS PROCEDENTES DE ZOOSPORAS NO IRRADIADAS CRECIENDO EN MEDIOS CON Y SIN METALAXYL**

Colonia	V-8 Agar con Metalaxyl		V-8 Agar		Diferencia en crecimiento mm/día
	mm/día*	Horas	mm/día**	Horas	
43-RN*	6.9	208	8.5	170	1.6
21-RN	6.2	229	10.9	131	4.7
18-RN	6.0	238	6.5	221	0.5
10-aRN	5.8	247	9.4	152	3.6
17-RN	4.9	219	10.8	133	5.9
10-cRN	4.6	312	7.0	204	2.4
11-RN	3.8	378	7.5	191	3.9
X-RN	3.7	383	6.4	222	2.7
14-RN	3.4	417	5.9	242	2.5
10-bRN	-	1)	6.4	224	-

\* RN - resistente natural

\*\* - Lectura a los 60 mm de crecimiento (3a. transf.)

1) - No alcanzó a crecer 60 mm a las 465 hrs.



CUADRO 16. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS PROCE-  
DENTES DE ZOOSPORAS NO IRRADIADAS CRECIENDO EN  
MEDIOS CON Y SIN METALAXYL

Colonia	V-8 Agar con Metalaxyl		V-8 Agar		Diferencia en crecimiento mm/día
	mm/día**	Horas	mm/día**	Horas	
17-RN*	10.1	142	14.6	98	4.5
43-RN	9.6	150	10.9	132	1.3
21-RN	8.6	166	6.8	211	1.8
10-aRN	8.2	175	11.5	125	3.3
10-cRN	7.3	197	- Δ	- Δ	-
18-RN	7.1	202	8.6	166	1.5
X-RN	-	1)	10.3	139	-
10-bRN	-	1)	14.8	97	-
14-RN	-	1)	6.2	232	-
11-RN	-	1)	- Δ	- Δ	-

Δ incompleto

\* RN - resistente natural

\*\* - Lectura a los 60 mm de crecimiento (4a. y 5a. transf.)

1) - No alcanzó a crecer 60 mm

**CUADRO 17. CRECIMIENTO EN V-8 CON Y SIN METALAXYL DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A METALAXYL INDUCIDOS POR RADIACION ULTRAVIOLETA**

Aislamiento	$\bar{X}$ % Cobertura sin metalaxyl	$\bar{X}$ % Cobertura con metalaxyl
7-1	77.5 a*	48.1 def
39-1	59.2 bc	39.3 ghi
6-VI	64.1 b	37.2 ghij
52-1	60.4 bc	36.8 ghij
6-IX	50.0 de	26.5 klm
6-VIII	32.6 ijk	20.8 lmno
6-VII	39.3 ghi	18.0 no
10-1	42.0 fgh	16.8 nop
22-1	19.1 mno	14.0 opq
6-X	16.0 nop	8.1 qr
6554 (cepa original)	80.0 a	0.8 r

\* Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

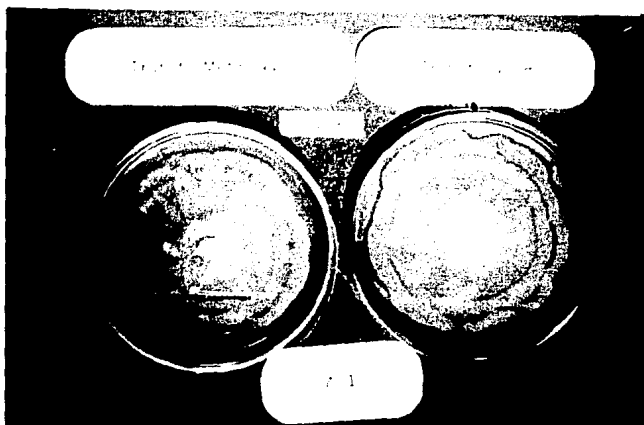


Fig. El aislamiento 7-1, procedente del tratamiento irradiado, fue uno de los que mayor tasa de crecimiento presentó desarrollándose en medio con metalaxyl. Después de 12 transferencias en metalaxyl se observa poco efecto inhibitorio del mismo hacia dicho aislamiento resistente.



Fig. 15. En contraste con la ilustración superior, la cepa original 6554 expuesta a metalaxyl por primera ocasión y no sometida a tratamiento previo se observa inhibida en su crecimiento.

CUADRO 18. CRECIMIENTO EN V-8 CON Y SIN METALAXYL DE AISLAMIENTOS CON RESISTENCIA NATURAL A METALAXYL

Aislamiento	$\bar{X}$ % Cobertura sin metalaxyl	$\bar{X}$ % Cobertura con metalaxyl	
43 - RN	53.6 cd*	33.3	ijk
10 - RN	48.1 def	31.3	jk
17 - RN	48.0 def	28.0	kl
21 - RN	44.0 efg	26.0	klm
10-aRN	41.2 fgh	23.0	lmn
10-bRN	36.0 hij	21.0	lmno
18 - RN	16.0	nop	pq
11 - RN	17.0	nop	pq
14 - RN	18.0	no	pq

\* Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

**CUADRO 19. ESTABILIDAD DEL AISLAMIENTO 7-1 CON RESISTENCIA A METALAXYL INDUCIDA POR RADIACION ULTRAVIOLETA**

<i>Aislamiento</i>	<i>Transferencia</i>	<i>7a. transferencia cultivado en:</i>	<i>Crecimiento micellar</i>	<i><math>\bar{X}</math></i>
7-1	6a. en V-8	V-8 con metalaxyl	24.8	d
7-1	6a. en V-8	V-8 sin metalaxyl	75.6	b
7-1	6a. en metalaxyl	V-8 con metalaxyl	34.3	c
7-1	6a. en metalaxyl	V-8 sin metalaxyl	72.8	b
6554 (cepa original)	6a. en V-8	V-8 con metalaxyl	2.9	e
6554 (cepa original)	6a. en V-8	V-8 sin metalaxyl	88.2	a

\* Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

CUADRO 20. ESPORULACIÓN Y TASA DE CRECIMIENTO DE AISLAMIEN-  
TOS RESISTENTES DE *P. capsici* L. A METALAXYL

Tratamiento*	Esporangios/ml	Tasa de Crecimiento
R. I. 39-I V-8	94222 a	N
R. N. 21 V-8 + M	61500 b	R
R. I. 39-I V-8 + M	65722 bc	R
R. N. 21 V-8	48056 c	R
R. I. 6-VI V-8	22278 d	R
Testigo 6554 V-8	21500 d	N
R. I. 6-VI V-8 + M	17833 d	R

\* R.I. = resistente inducida por irradiación con luz ultravioleta

R.N. = resistente natural, no fue irradiada con U.V.

M = metalaxyl

N = normal

R = rápido

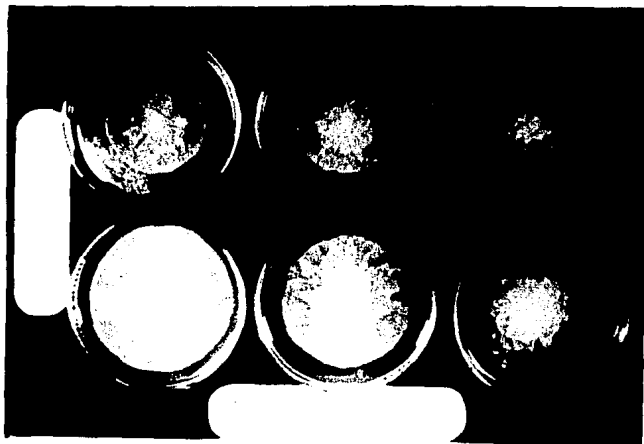
CUADRO 21. MORFOLOGÍA DE COLONIAS CON RESISTENCIA INDUCIDA A METALAXYL

Aislamiento Núm.	V-8 AGAR CON METALAXYL			V-8 AGAR		
	C o l o n i a			C o l o n i a		
	Bordes	Forma	Micelio	Bordes	Forma	Micelio
6-VII	Irregulares	Estrizada radial	Aterciopelado; no abundante	Irregulares	Radial	Aterciopelado no abundante
6-IX	Irregulares	Estrellada, ga- jos alargados radial	Aterciopelado; no abundante más concn. al centro	Irregulares	Estrellada difusa	Aterciopelado; más abundan- que con meta- laxyl
6-VIII	Muy irregulares lobulosos (de abanico)	Arrosetada de- finida irregular	Aterciopelado; escaso en lí- mites; más concn. al centro	Irregulares	Arrosetada menos defi- nida que con meta- laxyl	Aterciopelado; escaso en lí- mites; más concn. al centro
52-I	Irregulares	Estrellada ga- jos largos radial	Aterciopelado; escaso en lí- mites; más concn. al centro	Irregulares	Estrellada difusa	Algodonoso; más concn. en límites y centro de la caja
22-I	+ regulares _ definidos	Estrellada di- fusa radial algunos radios más marcados	Aterciopelado; escaso en lí- mites; más concn. al centro	Irregulares	Estrellada difusa radial algunos ra- dios más marcados	Aterciopelado; no abundante
39-I	Irregulares	Roseta cerrada definida radial	Aterciopelado; más concn. en ondas y al centro	Irregulares	Roseta di- fusa radial	Aterciopelado; más abundante que con meta- laxyl

Cuadro 21 (cont.)

Aislamiento Núm.	V-8 AGAR CON METALAXYL			V-8 AGAR		
	Colonia			Colonia		
	Bordes	Forma	Micelio	Bordes	Forma	Micelio
7-1	Irregulares	Estrellada con gajos difusos radial	Aterciopelado; algodonoso, más concen. en partes	Irregulares	Estrellada con gajos difusos radial	Aterciopelado; algodonoso más concen. en partes; más algodon. que con <i>metaxyl</i>
10-1	Irregulares	Estrellada ahusada, husos cortos radial	Aplanado aterciopelado	Irregulares	Estrellada ahusada, husos cortos radial	Aplanado Aterciop.
6-X	Muy irregulares	Lisa irregular	Aterciopelado; más concen. al centro y escaso en lflmites	Irregulares	Lisa irregular	Aterciopelado; más concen. al centro y escaso en lflmites
6-VI	Irregulares	Estrellada difusa	Aterciopelado; algod. más concen. al centro y escaso en lflmites	Irregulares	Estrellada radial	Algodonoso; más concen. al centro y en lflmites
6554 Testigo (sin irradiar)	Irregulares	No se alcanza a observar bien radial muy pequeña	Aplanado aterciopelado escaso	Irregulares	Estrellada difusa algod. radial	Algodonoso; concen. en partes





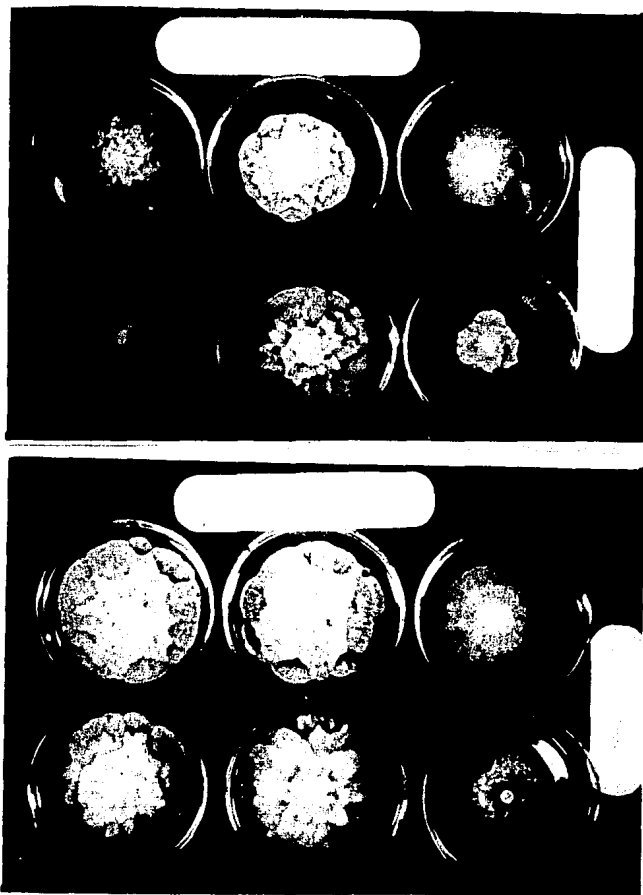
*Figs.  
16 y 17. Aislamientos resistentes procedentes del tratamiento irradiado (resistentes inducidos RI). Todos se encuentran entre la 9a. y 12a. transferencia; la fotografía superior corresponde a los aislamientos creciendo en metalaxyl y la inferior a los mismos aislamientos en el mismo orden pero creciendo en medio V-8 solamente. Se observa en general efecto inhibitorio en crecimiento por metalaxyl en todos los aislamientos. Las formas de la colonia varían entre arrosetadas, lisas y algodonosas.*

CUADRO 22. MORFOLOGÍA DE COLONIAS CON RESISTENCIA NATURAL A METALAXYL

Aislamiento Num.	V-8 AGAR CON METALAXYL			V-8 AGAR		
	C o l o n i a			C o l o n i a		
	Bordes	Forma	Micelio	Bordes	Forma	Micelio
10-b RN	+ Regulares	Lisa algodonosa radial	Aterciopelado; lfmities. algod. centro no abund. difuso	+ Regulares	Lisa algodonosa radial	Algodonoso; profuso aéreo
10-a RN	Irregulares	Arrosetada definida y cerrada	Aterciopelado; aplanado	Irregulares	Arrosetada cerrada no tan definido como con me talaxyl	Algodonoso; al centro aterciopelado en lfmities
11-RN	+ Regulares	Lisa radial	Aterciopelado; más concen. al centro y escaso en lfmities	+ Regulares	Lisa radial	Aterciopelado más concen. al centro y escaso en lfmities
43-RN	Irregulares	Arrosetada definida cerrada radial	Aterciopelado; más concen. al centro aplanado	Irregulares	Arrosetada definida radial	Aterciopelado algod. mic. más concen. al centro
14-RN	Irregulares	Roseta difusa cerrada radial	Aterciopelado; aplanado más concentrado al centro	Irregulares	Roseta difusa abierta radial	Aterciopelado aplanado lfmities, concen. al centro
21-RN	Irregulares	Arrosetada, definida	Aterciopelado; aplanado y más concen. al centro	Irregulares	Roseta difusa radial	Aterciopelado más concen. al centro

Cuadro 22 (cont.)

Aislamiento Núm.	V-8 AGAR CON METALAXYL			V-8 AGAR		
	C o l o n i a			C o l o n i a		
	Bordes	Forma	Micelio	Bordes	Forma	Micelio
10-cRN	Irregulares	Estrellada ahusada gajos largos radial	Aterciopelado; aplanado más concen. al centro	Irregulares	Estrellada ahusada gajos largos radial	Aterciopelado aplanado más concen. al centro
17-RN	Irregulares	Roseta cerrada definida radial	Aterciopelado aplanado más concen. al centro	Irregulares	Roseta cerrada definida más algod. que con metalaxyl; radial	Aterciopelado algod. más concen. en ondas
18-RN	Muy irregulares con fisuras o entradas	Granulosa irreg. con entradas de los lflmites hacia el centro	Aterciopelado aplanado uniforme muy sensible al metalaxyl	Irregulares	Lisa con algunos gajos alargados	Aterciopelado mic. más concentrado al centro



Figs.  
18 y 19.

Aislamientos resistentes procedentes del tratamiento no irradiado (resistentes naturales RN). La fotografía superior corresponde a los aislamientos creciendo en metalaxyl y la inferior en medio V-8 agar. Hay inhibición en crecimiento por efecto del metalaxyl en todos los aislamientos, aunque en este caso dicha inhibición en general es más marcada que en los aislamientos irradiados. La morfología de las colonias varía entre arroselado, lisas y algodonosas.

**CUADRO 23. INOCULACIÓN DE CHILE (*Capiscum annum L.*) VARIEDADES EARLY JALAPEÑO Y SERRANO CON AISLAMIENTOS RESISTENTES A METALAXYL, PROCEDENTES DE LA CÉLULA ORIGINAL 6554**

Núm. de Aislamiento	Early Jalapeño	Serrano
6554	*6/11**	10/11
7-1	5/5	5/5
6-VIII	0/5	5/5
10-1	1/5	4/5
22-1	0/5	3/5
6-VI	4/5	4/5
39-1	1/5	2/5
6-X	0/5	0/5
52-1	5/5	5/5
6-IX	2/5	4/5
6-VII	1/5	0/5
14-RN	0/5	0/5
18-RN	0/5	3/5
21-RN	3/5	3/5
11-RN	1/5	0/5
43-RN	3/5	5/5
17-RN	3/5	5/5
10-bRN	0/5	0/5
10-cRN	1/5	5/5
10-aRN	5/5	5/5

\* Núm. de plantas con lesión

\*\* Núm. de plantas inoculadas

CUADRO 24. INOCULACIÓN DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) VARIEDAD EARLY JALAPEÑO, POR AISLAMIENTOS ATENUADOS DE *Phytophthora capsici* L.

Núm. de aislamiento	Núm. de hojas con lesión* Núm. de hojas inoculadas
6-VIII	3/4
22-I	0/4
6-X	0/4
14-RN	0/4
18-RN	2/4
11-RN	0/4
10-bRN	0/4
6554 (original)	7/8
Testigo	

\* Lecturas tomadas al quinto día

## V. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados, se obtuvo una amplia variación en cuanto al grado de esporulación de las diferentes cepas. Lo anterior concuerda con lo reportado por Brasier (1967 y 1969) y por Ribeiro et al., 1976, quienes mencionan que la abundancia de esporangios, ya sea en sustrato sólido o líquido, varía de acuerdo con la especie y aún entre aislamientos de la misma especie. Considerando el amplio intervalo de variación observado en las cepas de *P. capsici* en este trabajo, se tienen grupos de comportamiento contrastante los cuales pudieran mantenerse constantes bajo las condiciones en las que se realizó el mismo.

El fenómeno de auto-repulsión, descrito por Galindo y Zentmyer, 1967, se presentó en todas las cepas probadas; sin embargo, el fenómeno de auto-estimulación no fue detectado en este estudio. Se presentó variación en cuanto al grado de auto-repulsión de las diferentes cepas; obteniéndose cepas contrastantes en cuanto a la intensidad de dicho fenómeno, como fue el caso de la cepa 6554 que presentó auto-repulsión marcada y de la cepa 6563 en la cual este fenómeno prácticamente no se expresó.

En trabajos anteriores Redondo, 1974, probó la patogenicidad de las cepas 6522; 6557; 6552, 6558; 6518; 6551; 6554 y 6553 para diferentes estirpes de Chile. Comparando el grado de agresividad de las cepas anteriormente mencionadas con los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que las cepas 6522, 6518 y 6558 infectaron un alto porcentaje

de plantas de chile mulato V-2 lo cual no sucedió con las cepas 6553 y 6557 que están reportadas como patógenas y que en el presente trabajo infectaron solamente un 0 y 15% de plantas respectivamente. Las cepas 6551 y 6552 mantuvieron su nivel de agresividad; la cepa 6554 reportada como poco agresiva tuvo un aumento aparente en ésta. En la literatura se ha reconocido que la variación en patogenicidad entre aislamientos de una especie ocurre desde hace tiempo y que las transferencias seriadas de una cepa pueden resultar en pérdida de virulencia (Caten 1971; Erwin 1966; Jeffrey et al., 1962); e incluso puede variar el tipo de raza patógena o el grado de agresividad. Por otra parte, dicha diferencia en patogenicidad pudiera deberse a la variación genética entre las plantas, lo cual ha impedido precisar razas por no contar con plantas que tengan un genotipo bien definido (Galindo 1960; Redondo 1974). El largo tiempo que las cepas se mantuvieron en aceite, o las transferencias sucesivas que se hicieron para la conservación de éstas pudieron haber sido posibles causas que influyeron en la variación de la patogenicidad. Por otro lado, se observó que hubo cierta constancia en patogenicidad cuando se inocularon plantas provenientes de semilla de una sola planta de chile mulato V-2; aunque está reportado que este chile es una variedad susceptible (Galindo, 1962) se observaron diferencias marcadas entre cepas agresivas, medianamente agresivas y no patógenas. Probablemente el hecho de inocular plantas provenientes de un solo progenitor ayudó a tener menor variación en las mismas y de esta manera se obtuvieron resultados más constantes en cuanto a la patogenicidad de las diferentes cepas al chile mulato V-2.

La patogenicidad o la agresividad de una cepa podría considerarse como información complementaria para su caracterización, pero no depender



de ésta para diferenciar claramente una cepa de otra, ya que puede presentarse variación y no ser un carácter estable y definido. Se ha encontrado en trabajos anteriores que la patogenicidad a chile no se considera ser un criterio taxonómico adecuado (Tucker, 1931; Satour y Butler, 1968).

Con relación al efecto del verde malaquita (VM) en las diferentes cepas, se presentó sensibilidad contrastante a esta substancia, como fue la cepa 6551 que tuvo 0% de inhibición de crecimiento de micelio y la cepa 6557 con 84.4%, algunas cepas mostraron límites regulares por efecto de esta substancia. En trabajos de Galindo y Zentmyer, 1967, se ha reportado el fenómeno de los márgenes regulares de la colonia como respuesta al (VM), utilizando esta característica como marcador genético en cepas de *P. drechsleri*.

En lo referente a la estabilidad de la resistencia al metaloxyl del aislamiento 7-1, resistente inducido, ésta se vió afectada por la serie de transferencias del mismo a medio V-8 agar sin fungicida. Al ser nuevamente sometido al medio conteniendo fungicida, dicho aislamiento presentó menor tasa de crecimiento con respecto a aquél que se había mantenido creciendo con el fungicida. Por otro lado, también se ha reportado en trabajos de Bruin y Edgington, 1981, que los aislamientos de *P. capsici* pueden variar en su nivel de resistencia inicial al fungicida si son transferidos sucesivamente a medio V-8 agar sin el fungicida y que esta variación se expresa como la pérdida parcial o total de la resistencia al fungicida. De acuerdo con la anterior hipótesis los aislamientos mutantes requieren de un período de tiempo para estabilizarse y la variación en el comportamiento de los aislamientos pudiera reflejar diferentes

líneas evolutivas que siguen los mutantes. En *Phytophthora capsici* y en varias especies de *Pythium* se ha reportado un fenómeno similar, obteniéndose que después de una serie de transferencias, algunas de las cepas perdieron su resistencia parcial o completa al fungicida (Bruin y Edgington, 1982). Asimismo, se observó que el aislamiento 7-1 presentó un crecimiento más lento en medio V-8 agar sin metalaxyl con relación a la cepa original; esto coincide con los resultados de Bruin y Edgington, 1981, quienes obtuvieron cepas de *P. capsici* con resistencia adquirida al fungicida, las cuales presentaron un crecimiento 30-40% menor al de la cepa progenitora.

En cuanto al efecto del metalaxyl y de la irradiación en la germinación y formación de colonias del hongo, el fungicida no tuvo efecto en la germinación de las zoosporas, pues no hubo diferencias significativas entre el testigo y el tratado con metalaxyl; esto va de acuerdo con lo consignado en lo que respecta al modo de acción del metalaxyl, el cual no interviene en las etapas iniciales de infección como son la liberación de las zoosporas del esporangio, la germinación de las zoosporas y la penetración inicial. Su efecto repercute en el crecimiento micelial, inhibe la formación de haustorios secundarios, formación de lesiones y esporulación.

Una característica que permitió diferenciar algunos aislamientos irradiados de los no irradiados fue su tasa de crecimiento; pues los que mayor velocidad de crecimiento presentaron provienen de los irradiados. Los aislamientos procedentes de zoosporas no irradiadas parece ser que fueron perdiendo sensibilidad al fungicida después de transferencias sucesivas en medio con metalaxyl, adquiriendo resistencia por adaptación

al mismo. Esto concuerda con lo observado por Bruin y Edgington, 1981, quienes obtuvieron 3 aislamientos de *P. capsici* que adquirieron resistencia al fungicida por exposición sucesiva al medio V-8 con metalaxyl.

En lo que respecta a la patogenicidad de cepas resistentes, en el trabajo de Bruin y Edgington, 1981, se encontró que las cepas de *P. capsici* resistentes al fungicida por adaptación siguieron siendo muy patógenas a chile; esto concuerda con lo observado en este trabajo para los aislamientos 7-I; 10-I; 6-VI; 39-I; 52-I; 6-IX; 21-RN; 43-RN; 17-RN; 10-cRN y 10-aRN los cuales fueron patógenos tanto para chile early jalapeño como para serrano. También se presentó el caso de que algunos aislamientos fueron patógenos sólo a una variedad de chile, como fue el caso de los aislamientos 6-VII y 11-RN que fueron patógenos a chile jalapeño, o de los que fueron únicamente patógenos a chile serrano como el 6-VIII; 6-VII; 18-RN y hubo algunos casos como en los aislamientos 6-X; 14-RN; 10-bRN y 11-RN que no fueron patógenos a ninguna de las dos variedades probadas. Lo anterior coincide con lo encontrado por Joseph y Coffey, 1984, quienes detectaron aislamientos mutantes resistentes a metalaxyl que perdieron en cierto grado o completamente la patogenicidad.

En general, y para los propósitos que se realizó este trabajo, se puede decir que en las diferentes pruebas llevadas a cabo se detectaron cepas que mostraron diferencias notables en cuanto a un carácter encontrándose en los extremos; aunque por otra parte, siempre se presentó un espectro de variación natural entre los diferentes aislamientos.

En investigaciones futuras en donde se requiera contar con marcadores, pudiera ser que conviniera seleccionar cepas que diverjan - - -

*notablemente en su comportamiento con relación a alguna de las características evaluadas en este trabajo.*

*En lo referente a los aislamientos obtenidos después de irradiación de zoosporas, aparentemente el efecto de ésta se dejó ver en la tasa de crecimiento inicial, la cual fue mayor en los irradiados, pero al aumentar el número de transferencias en ambos tipos de aislamientos (irradiados y no irradiados), esta diferencia notable al principio, tendió a desaparecer en algunos, posiblemente debido a una adaptación al fungicida. También en lo que respecta a patogenicidad, no se detectó un patrón definido en cuanto a los aislamientos irradiados y no irradiados; por lo tanto, sería conveniente evaluar otras características además de resistencia a metaxyl y patogenicidad para poder tener evidencias más claras con relación a una posible mutación producida por luz ultravioleta (UV).*

## VI. CONCLUSIONES

- Se detectaron cepas que presentaron un comportamiento contrastante en las siguientes pruebas efectuadas: esporulación, patogenicidad, sensibilidad al verde malaquita (VM) y reacción de auto-repulsión.
- El verde de malaquita (VM) interfiere con el crecimiento de micelio en la mayoría de las cepas, sin embargo, no tuvo efecto en la cepa 6551.
- Todas las cepas presentaron el fenómeno de auto-repulsión.
- De todas las cepas probadas, sólo la 6553 no fue patógena a ninguna de las variedades de chile utilizadas (early jalapeño, serrano y V-2).
- Se indujo resistencia a metalaxyl por irradiación ultravioleta (VM).
- Existe resistencia natural al metalaxyl en la cepa 6554 de *Phytophthora capsici* L.
- La resistencia inducida por irradiación (UV) fue más marcada que la natural.
- El metalaxyl no tuvo efecto en la germinación de las zoosporas, sin embargo, inhibió el crecimiento de micelio en la mayoría de las colonias.

- *La sensibilidad a metalaxyl del aislamiento irradiado 7-1 aumentó después de 6 transferencias en medio V-8 sin el fungicida.*
- *El patrón de patogenicidad entre aislamientos irradiados y no irradiados no es constante ni diferencial, sin embargo, se detectaron aislamientos no patogénicos o con patogenicidad atenuada con relación a la cepa original 6554.*

## VII. LITERATURA CITADA

- Al-Hedaithy, S.S.A., and Tsao, P.H. 1979a. The effects of culture media and sporulation methods on caducity and pedicel length of sporangia in selected species of *Phytophthora*. Micologia 71: 392-401
- Al-Hedaithy, S.S.A. and Tsao, P.H. 1979b. Sporangium pedicel length in *Phytophthora* species and the consideration of its uniformity in determining sporangium caducity. Trans. Br. Mycol. Soc. 72: 1-13.
- Brasier, C.M. 1967. Physiology of Reproduction in *Phytophthora* Ph. D. Thesis, University of Hull, England. 220 pp.
- Brasier, C.M. 1969. The effect of light and temperature on reproduction in vitro in two tropical species of *Phytophthora*. Trans. Br. Mycol. Soc. 52: 105-113.
- Boccas, B., and Zentmyer, G.A. 1976. Genetical studies with interespecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 66: 477-484.
- Boccas, B.R. 1981. Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. Phytopathology 71: 60-65.
- Bruin, G.C.A., and Edgington, L.V. 1982. Induction of fungal resistance to metalaxyl by ultraviolet irradiation. Phytopathology 72: 476-480.
- Bruin, G.C.A., and L.V. Edgington. 1981. Adaptive resistance in *Peronosporales* to metalaxyl. Can J. Plant. Pathol. 3: 201-206.
- Castro, F.J. 1968. Genetical studies with the genus *Phytophthora*. Ph. Dissertation. University of California, Riverside. 115 pp.
- Caten, C.E. 1971. Single zoospore variation in *Phytophthora infestans* and attenuation of strains in culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 56: 1-7.
- Coffey, M.D., and Bower, L.A. 1984a. In vitro variability among isolates of six *Phytophthora* species in response to metalaxyl. Phytopathology 74: 502-506.
- Coffey, M.D. and Bower, L.A. 1984b. In vitro variability among isolates of eight *Phytophthora* species in response to phosphorous acid. Phytopathology 74: 738-742.

- Coffey, M.D., and Young, L.H. 1984. Responses to metalaxyl of sensitive and resistant isolates of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 74: 615-620.
- Coffey, M.D., Klure, L.J. and Bower, L.A. 1984. Variability in sensitivity of metalaxyl of isolates of *P. cinnamomi* and *P. citricola*. Phytopathology. 74: 417-422.
- Erwin, D.C. 1966. Varietal reaction of alfalfa to *Phytophthora megasperma* and variation in virulence of the causal fungus. Phytopathology 1: 375-396.
- Galindo, A.J. 1960a. La marchitez de las plantas de Chile en México y su agente causal *Phytophthora capsici* Leonian. (inédito).
- Galindo, A.J. 1960b. Marchitez de las plantas de Chile causada por *Phytophthora capsici* Leonian. Rev. Fitopatología Mexicana 1: 15-16.
- Galindo, A.J. 1962. Marchitez de las plantas de Chile causada por *Phytophthora capsici* Leonian. Rev. Fitopatología Mexicana 1: 15-16.
- Galindo, A.J. and Zentmyer G.A. 1967. Genetical and Cytological Studies of *Phytophthora* strains pathogenic to pepper plants. Phytopathology 57: 1300-1304.
- Halsall, D.M. 1976. Specificity of cytoplasmic and cell wall antigens from four species of *Phytophthora* J. Gen. Microbiol. 94: 149-158.
- Jeffrey, S.I.B., Jinks, J.L. and Grindle, M. 1962. Intraracial variation in *Phytophthora infestans*. Genetica 32: 323-338.
- Joseph, M.C. and Coffey, M.D. 1984. Development of laboratory resistance to metalaxyl in *Phytophthora citricola*. Phytopathology 74: 1411-1414.
- Kaasiri, T., Zentmyer, G.A., and Erwin, D.C. 1978. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. Can. J. Bot. 56: 1730-1738.
- Leonian, L.H. 1934. Identification of *Phytophthora* species. W. Va. Agric. Exp. Stn. Bull. 242. 36 pp.
- Polach, F.J. and Webster, R.K. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici* Phytopathology 62: 20-26.
- Redondo, J.E. 1974. Estudio preliminar en la obtención de posibles plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas del hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 52 pp.



- Ribeiro, O.K., Erwin, D.C. and Zentmyer, G.A. 1975. An improved synthetic medium for oospore production and germination of several *Phytophthora* species. Mycologia 67: 1012-1019.
- Ribeiro, O.K., Zentmyer, G.A. and Erwin, D.C. 1976. The influence of qualitative and quantitative radiation on reproduction and spore germination of four *Phytophthora* species. Mycologia 68: 1162-1173.
- Robinson, R.A. 1969. Disease resistance terminology. Rev. Appl. Mycol. 48: 593-606.
- Romero, C.S. 1962. Inoculación artificial de Chile en el campo con *Phytophthora capsici* Leo. Agric. Tec. en México (I.N.I.A.) 2: 79-80
- Satour, M.M., and Butler, E.E. 1968. Comparative morphological and physiological studies of the progenies from intraspecific matings of *Phytophthora capsici*. Phytopathology 58: 183-192.
- Shattock C.R. and Shaw S.D. 1975. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to, and dependent upon, antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 64: 29-41.
- Shepherd, C.J., and Pratt, B.H. 1973. Separation of two ecotypes of *Phytophthora drechsleri* Tucker, occurring in Australian native forests. Aus. J. Biol. Sci. 26: 1095-1107.
- Shepherd, C.J. and Pratt, B.H. 1974. Temperature growth relations and genetic diversity of A<sub>1</sub> mating-type isolates of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. Aust. J. Bot. 22: 231-249.
- Shepherd, C.J., Pratt, B.H., and Taylor, P.A. 1974. Comparative morphology and behavior of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> isolates of *Phytophthora cinnamomi*. Aust. J. Bot. 22: 461-470.
- Shepherd, D.J. 1976. Pigment production from tyrosine by Australian isolates of *Phytophthora* species. Aust. J. Bot. 24: 607-617.
- Stack, J.P. and Millar, R.L. 1985. Isolation and characterization of a metalaxyl insensitive isolate of *Phytophthora megasperma* sp. *medicaginis*. Phytopathology 75: 1387-1392.
- Timmer, L.W., Erwin, D.C. and McCormick, W.H. 1970. Glucose inhibition and inheritance of pigment producing ability in *Phytophthora*. Mycologia 62: 967-977.
- Tucker, C.M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. Univ. Mo. Agric. Exp. St. Res. Bull. 153. 208 pp.
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 92. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England 22 pp.

- Waterhouse, G.M. 1974. *Phytophthora palmivora* and some related species. Pages 51-70 in: *Phytophthora Disease of Cocoa*. P.H. Gregory, ed. Longman Press, London.
- Zentmyer, G.A., Leary, J.V., Klure, L.J. and Grantham, G.L. 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology* 66: 982-986.
- Zentmyer, G.A., Klure, L.J., and Pond, E.C. 1979. The influence of temperature and nutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 71: 55-67.