



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

*“Resistencia de *Capsicum annum* a
Phytophthora capsici.”*

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Itzel Aline De la Fuente Castañeda.

Ciudad de México, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

INDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
Fitopatología	5
Interacción planta-patógeno	6
Mecanismos de defensa química	8
Reacción hipersensible	9
Producción de fitoalexinas	10
Formación de barreras estructurales	11
Proteínas relacionadas con la patogénesis	12
La resistencia sistémica	12
<i>Capsicum sp</i>	14
Importancia económica	15
Factores importantes para el desarrollo del cultivo	16
Importancia del manejo fitosanitario del chile	19
Signos	27
Diagnóstico de la enfermedad	27
Principal agente causal de la marchitez de chile	29
Clase Oomycetes	29
Orden Peronosporales	31
<i>Phytophthora</i>	32
<i>Phytophthora capsici</i>	34
Características morfológicas de <i>Phytophthora capsici</i>	35
Control de <i>P. capsici</i> en campo	39
Control químico	39
Resistencia genética	40
Resistencia de variedades de <i>Capsicum annum</i> a <i>P. capsici</i>	41

OBJETIVOS	45
Objetivo general	45
Objetivos particulares	45
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	46
METODOLOGIA	46
Obtención del aislamiento de <i>P. capsici</i>	46
Identificación molecular	46
Preparación e inoculación de <i>P. capsici</i>	49
Producción de plántula	51
RESULTADOS	52
Caracterización macroscópica y microscópica en medio PDA	52
Caracterización macroscópica y microscópica en medio V8	56
Identificación molecular	60
Inoculación de <i>P. capsici</i> en plántulas de tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>) y pimiento (<i>Capsicum annuum</i>)	64
Germinación de 30 variedades de Chile picoso (<i>Capsicum annuum</i>)	71
Inoculación de <i>P. capsici</i> en 30 variedades de <i>Capsicum annuum</i>	73
Porcentaje de plantas que presentaron la enfermedad	92
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	94
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXO A	106
ANEXO B	108
ANEXO C	109
ANEXO D	110
Anexo E	112

ABREVIATURAS

ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AOS	Del inglés active oxygen species o especies activas de oxígeno
CAD	Cinamil alcohol deshidrogenasa
CHI	Chalcona isomerasa
CHS	Chalcona sintasa
CIAD	Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo A.C.
CM-334	Criollo de Morelos 334
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ha	Hectárea
HRGP	Del inglés Hidroxyproline-rich glycoproteins o proteínas ricas en hidroxiprolina
ISR	Del inglés Induced systemic resistance o resistencia sistémica inducida
ITS	Del inglés Internal transcribed spacer o espacio transcrito interno
JA	Ácido Jasmónico
LANGEBIO	Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad
m	Metros
PCD	Del inglés Programmed cell death o muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
PhAL	Fenilalanina amonio liasa
POD	Peroxidasa
QTL	Del inglés Quantitative Trait Loci o Loci de caracteres cuantitativos
RFLP	Del inglés Restriction fragment length polymorphism o Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RPM	Revoluciones por minuto
SA	Del inglés Salicylic Acid o Ácido salicílico
SAR	Del inglés Systemic acquired resistance o Resistencia sistémica adquirida

INTRODUCCIÓN

En México la producción de chile es una actividad muy importante, representa más del 30% de la superficie hortícola nacional⁸. Este cultivo presenta gran diversidad de problemas fitosanitarios, dentro de los cuales el mayor lo constituyen las enfermedades causadas por el Oomyceto *Phytophthora capsici*, lo que es un problema grave para los productores de esta hortaliza al causar una baja productividad en su cosecha^{8,9}.

Se ha reportado la presencia de este fitopatógeno en el norte-centro del país, en los estados de Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos y Estado de México, al sur del estado de Chihuahua mostró un gran daño en contra del chile tipo jalapeño y en el estado de Oaxaca ha tenido incidencia **sobre cultivos de "chile de agua"**¹.

Debido a la fisiología de los Oomycetos, la mayoría de los fungicidas no tienen efecto sobre ellos, además de presentar una extraordinaria flexibilidad genética que les permite rápidamente adaptarse y desarrollar resistencia a fungicidas. Por esta razón obtener plantas resistentes e identificar el gen que le brinda esa característica es de gran importancia, ya que esto permitiría controlar a este parasito¹.

Syngenta Agro. S.A. de C.V. dentro de su programa de mejora genética, cruzó chiles que presentan 100% de resistencia (homocigotas), con variedades no resistentes (heterocigotas), para poder evaluar en la presente tesis la resistencia de la progenie ante este fitopatógeno.

MARCO TEÓRICO

El buen desarrollo de las plantas cultivadas es de particular interés para aquellos que están relacionados de manera directa con su reproducción, crecimiento, producción y distribución de sus productos.

El crecimiento y el rendimiento de las plantas dependen de la disponibilidad del agua y de los nutrientes del suelo donde se desarrollen y del mantenimiento, dentro de ciertos límites, de algunos factores del ambiente como la temperatura, la luz y la humedad. Dependen también de la protección que tengan contra el ataque de los patógenos. Es muy probable que todo lo que afecta la salud de las plantas influye en su crecimiento y producción, lo cual disminuye de manera notable su utilidad para la humanidad. Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los hongos fitopatógenos, el clima desfavorable, las malezas o insectos⁵.

Fitopatología

Su meta es ayudar a los agricultores a salvar las cosechas que, en la actualidad, son destruidas por enfermedades⁵.

Por lo que esta ciencia se encarga del estudio de los organismos y las condiciones ambientales que ocasionan padecimientos en plantas, como los procesos mediante los cuales esos factores originan enfermedades. Asimismo las interacciones que se forman entre los agentes que provocan la enfermedad y la planta enferma, estableciendo métodos para prevenirlos, disminuir el daño que ocasionan o para controlarlas antes o después de que se desarrollen en las plantas⁵.

Esta ciencia utiliza las técnicas básicas y los conocimientos de la botánica, micología, bacteriología, virología, hematología, anatomía vegetal, fisiología vegetal, química, entre otras, para aumentar el conocimiento acerca de las causas y progreso de diversas patologías en plantas, desarrollando métodos de control.

Dentro de la fitopatología, la genética se ha convertido en una herramienta fundamental, al ser una alternativa prometedora para el control de enfermedades, mediante la inducción de mecanismos de defensa en plantas⁸, a través de genes resistentes al patógeno.

Esto mediante la búsqueda de variedades que poseen en sus alelos el gen de resistencia, definiendo la resistencia como la habilidad del hospedante para reducir o impedir el desarrollo del patógeno¹². Generando plantas tolerantes o con alto grado de resistencia ante un fitopatógeno en específico, para ser utilizados como progenitores en programas de mejoramiento¹⁵, donde el objetivo en estos es la obtención de altos niveles de resistencia, pero a la vez mantener las características agronómicas del cultivo, las cuales son necesarias por las preferencias de los consumidores¹⁰.

Interacción planta-patógeno

Para infectar a la planta los patógenos necesitan encontrar un hospedante, una vez que llegan a él, es necesario que estos se adhieran a la superficie de la planta, para después penetrar primariamente las barreras externas, formadas por la cutícula y paredes celulares^{5,17}.

La penetración e infección de un patógeno sobre su hospedero al parecer se logra parcial o totalmente mediante una fuerza mecánica que ejercen algunos de ellos sobre la pared celular de las plantas. Estos mecanismos se han encontrado por lo

general en algunos hongos, plantas superiores parásitas y los nematodos los cuales aplican una presión de tipo mecánico.

En los hongos y particularmente los Oomycetos aunque por lo general sus hifas están rodeadas por sustancias mucilaginosas, su fijación a la planta al parecer se realiza principalmente por las fuerzas intermoleculares que se producen entre la superficie de la planta y el patógeno cuando se unen estrechamente. Una vez que han entrado en contacto, el diámetro de la porción de la hifa que entra en contacto con la superficie del hospedero se incrementa, forma una estructura aplanada y en forma de bulbo que se denomina "**apresorio**". Esta estructura hace que aumente la zona de unión entre los dos organismos y permite que el patógeno se fije con mayor firmeza a la planta. A partir del apresorio se forma un punto delgado de crecimiento denominado "punto de penetración" que se desarrolla en dirección de la cutícula y la pared celular, atravesándolas⁵.

Entrando a la célula, es habitual que se secreten cantidades crecientes de enzimas que posiblemente ablandan o disuelven la pared celular del hospedero, lo cual permite que el patógeno ingrese con mayor facilidad en este último⁵.

Las plantas, al encontrarse con estos elementos de invasión, han desarrollado mecanismos que le permiten defenderse de éstos mediante un complejo sistema que incluye múltiples niveles de protección. Esta protección puede ser física o química y constitutiva o inducida³.

Mientras que las relaciones con microorganismos fitopatógenos se les denomina incompatible o compatible dependiendo del éxito de la infección. En las primeras, la planta bloquea al patógeno inmediatamente después de su reconocimiento evitando la infección; mientras que en las segundas el microorganismo suprime o retrasa el reconocimiento de éste por la planta permitiendo la infección (**Imagen 1**)³.

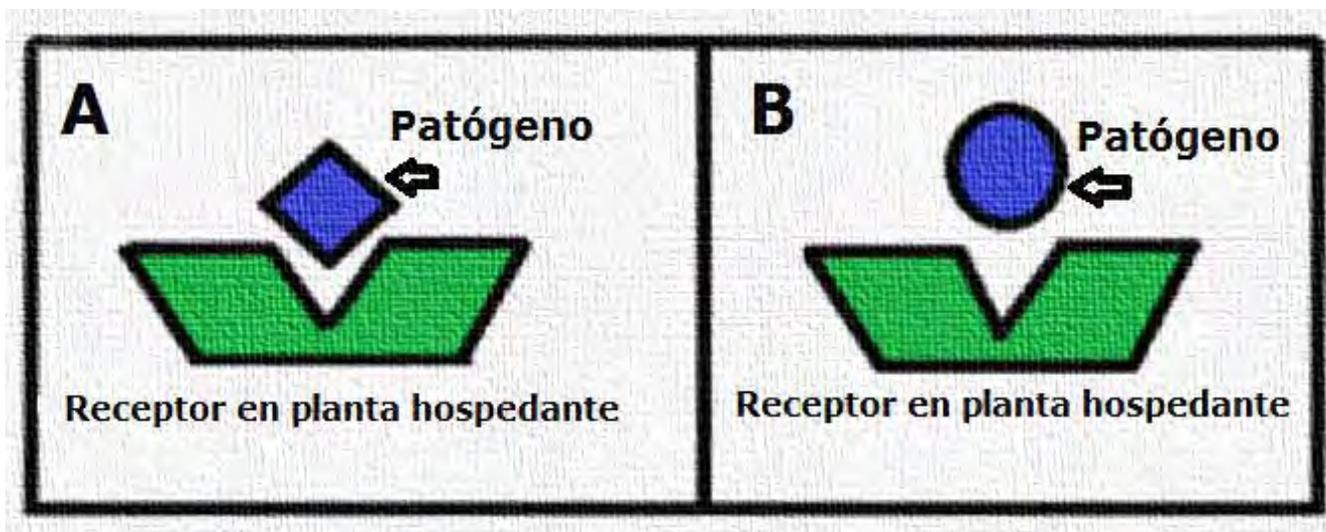


Imagen 1: Modelo que ilustra la compatibilidad o incompatibilidad de las interacciones planta-patógeno, el cual depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. **A)** Relación incompatible para el patógeno: La planta reconoce por su receptor al fitopatógeno, provocando una respuesta en contra del mismo. **B)** Relación compatible para el fitopatógeno: El receptor de la planta no reconoce al fitopatógeno, logrando la infección en la planta.

De los principales mecanismos de defensa del ataque de los fitopatógenos esencialmente es químico, como ejemplo tenemos las saponinas que dan protección constitutiva, las fitoalexinas y quitinasas que son inducidas^{3,5,17}.

Mecanismos de defensa química

La interacción entre un patógeno particular y una especie de planta es específica e invariable, una vez que el patógeno ha sido reconocido por las moléculas efectoras, generales o específicas se activan una serie de mecanismos de defensa mediante cascadas de señales que aún no han sido completamente caracterizadas.

Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen la muerte

celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros^{3,5}.

Reacción hipersensible

Muchas veces ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección. Estas lesiones son el resultado de una PCD o reacción hipersensible. La reacción hipersensible además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de SAR. A pesar de que PCD es un mecanismo sumamente efectivo que produce una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la PCD es directamente responsable de la resistencia, al privar de tejido vivo y nutrimentos al patógeno, o si más bien su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes como agentes altamente oxidantes llamados AOS, tales como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que el proceso de PCD ocurre como resultado de una necrosis controlada.

La reacción hipersensible parece ocurrir como un programa suicida activo y organizado, y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas derivadas de éste. La generación de la PCD está relacionada mediante señales con la activación y coordinación de los otros mecanismos de defensa. Se ha demostrado que el H_2O_2 tiene además una función

como señal difundible implicada en la inducción de otros mecanismos de defensa^{3,5,17}.

Producción de fitoalexinas

Las fitoalexinas se definieron originalmente como metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos. Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la PCD. Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenil propanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina (**Imagen 2**)^{3,17}.

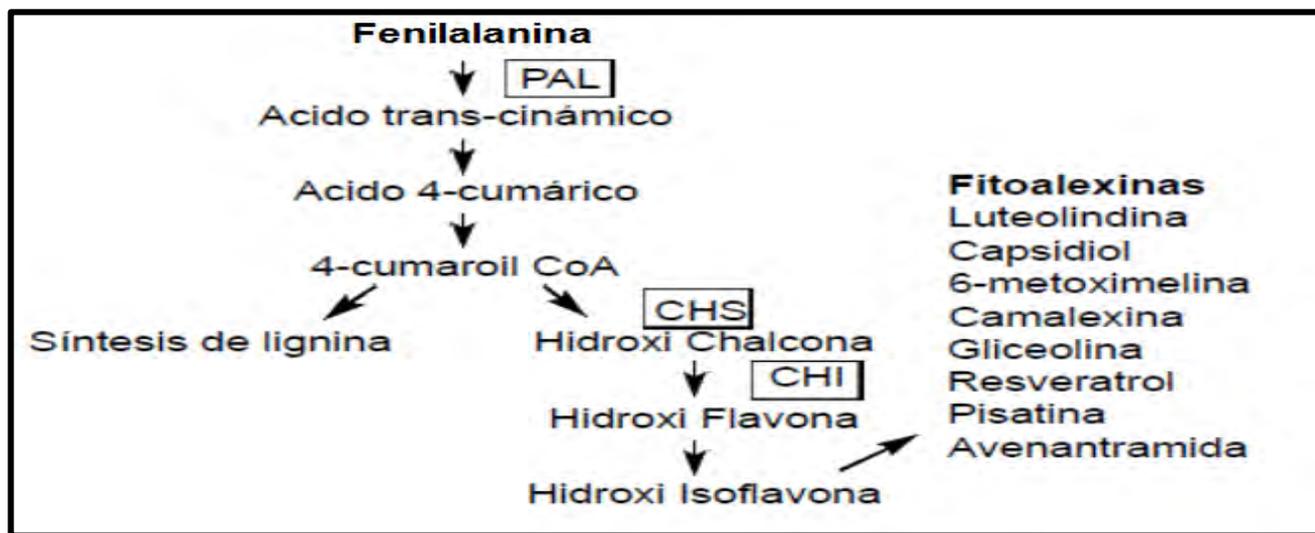


Imagen 2: Vía biosintética de las fitoalexinas iniciándose a partir del amino ácido fenilalanina. Los sitios más importantes de regulación se indican con la enzima correspondiente: PhAL; CHS; CHI¹⁷.

La mayoría de las fitoalexinas conocidas actúan como toxinas a los hongos fitopatógenos inhibiendo su desarrollo, pero algunas también son tóxicas a bacterias, nematodos y otros organismos patógenos.

Algunas de las fitoalexinas mejor estudiadas incluyen a la faseolina y a la cievitona en el frijol, la pisatina en el chícharo, la gliceolina en la soya, alfalfa y trébol, la rishitina en la papa, el gosipol en el algodón y el **capsidiol en el chile**^{3,5,17}.

La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis. Entre ellas PhAL, CHS y CHI¹⁷.

Formación de barreras estructurales

Uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance de patógenos. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos.

La síntesis de otras enzimas, como CAD y algunas peroxidasas, también ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos. Ciertas peroxidasas son encargadas de la polimerización de las unidades de fenilpropanoides que da lugar a la lignina.

Aparte del proceso de lignificación, las plantas producen y depositan otras sustancias que previenen el avance de ciertos patógenos. Entre ellas se puede mencionar las HRGP, las cuales se acumulan alrededor de los sitios de ataque del patógeno evitando su penetración. Otro mecanismo estructural de defensa es la formación de papilas. La papila es una estructura de resistencia que se produce por modificaciones de las células de la epidermis. Las papilas están compuestas principalmente de **calosa** (β -1,3-glucano) y se asocian a la resistencia porque evitan la penetración de los hongos¹⁷.

Proteínas relacionadas con la patogénesis

Estas proteínas también llamadas proteínas PR, son un grupo variable que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos.

Algunas de las proteínas PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 (β -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). Esto sugiere que la alta expresión de las glucanasas y las quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que **contienen** β -1,3-glucano y quitina¹⁷.

La resistencia sistémica

La inoculación localizada con patógenos virulentos y avirulentos capaces de producir lesiones necróticas puede resultar en la inducción local o sistémica de resistencia. En ambos fenómenos, la planta muestra resistencia local o sistémica a un ataque subsecuente del patógeno. SAR es una respuesta de defensa activa, de amplio espectro que se asocia a una alta expresión de genes PR. En la mayoría de los casos, SAR es igualmente efectiva contra hongos, bacterias, virus o nematodos, independientemente del organismo inductor. La manifestación de SAR de manera sistémica en la planta implica la existencia de algún sistema de señales capaces de

transmitirse a través de los tejidos. Las investigaciones realizadas indican que SA es la molécula que ha mostrado mayores evidencias de estar involucrada en las vías de SAR. De esta forma, la inducción de SAR generalmente se correlaciona con incrementos en la acumulación de SA tanto localmente como sistémicamente.

La acumulación debida a la síntesis de *novο* de las proteínas PR como parte de los mecanismos de resistencia inducida, está estrechamente asociada a la manifestación de SAR, que es un fenómeno de resistencia sistémica de amplio espectro.

Otro tipo de resistencia sistémica inducida se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera, particularmente rizobacterias. Este tipo de resistencia es conocida como ISR y se caracteriza por estar mediada por vías metabólicas sensibles al JA y al etileno y ser independiente de la expresión de los genes PR y SA^{3,17}.

Estudiada la vía de defensa de las plantas contra los fitopatógenos, es de interés en la presente tesis estudiar el patosistema ***Capsicum annum-Phytophthora capsici***, al ser uno de los principales cultivos hortícolas en México, y la baja producción de este se debe a las plagas y enfermedades que estos adquieren⁸, teniendo este cultivo como principal enemigo al Oomyceto ***Phytophthora capsici***.

Capsicum sp

El chile (*Capsicum sp*) pertenece a la familia solanácea, tuvo su centro de origen en Mesoamérica¹⁶. En México existe desde épocas precolombinas. Se han reportado datos de su existencia hace 7,000 años en Tehuacán, Puebla y 5,000 años en Ocampo, Tamaulipas. Long (1984) menciona que el chile pudo ser el primer cultivo domesticado en Mesoamérica, siendo Colón quien lo encontró e introdujo a España. Pero se menciona que fueron los monjes Jerónimos quienes en realidad lo introdujeron a España y de allí se propagó a todo el mundo.

El género *Capsicum* es originario de América, excepto la especie *Capsicum anomalun*. Existe la teoría de que éste género se originó en una parte de la región andina y amazónica de Sudamérica que comprende a Perú, Bolivia y algunas partes de Argentina y Brasil¹².

De todas las especies de este género, solo cinco son comestibles: *C. annuum* L. que es la especie domesticada en Mesoamérica, *C. frutescens* L. conocidos como tipo Tabasco, *C. pubescens* Ruiz & Pav. especie andina que agrupa a los chiles manzano, *C. chinense* Jacq. que incluye al habanero y *C. baccatum* L., perteneciente a los chiles Sudamericanos del grupo de los ajíes¹⁰; y de ellas la más importante es *Capsicum annum* L., al ser más ampliamente conocida y de mayor importancia por su amplia distribución mundial¹⁶, siendo México y América Central su centro de origen. Adicionalmente, en México se localizan *Capsicum chinense* llamado Habanero, cultivado en la Península de Yucatán; y *Capsicum pubescens* llamado "Perón" o "Manzano", que se cultiva en regiones altas y frías de la República Mexicana¹².

El chile se caracteriza por sus frutos pungentes, se consume como fruto seco, deshidratado, o procesado en distintos tipos de comidas, sus capsicinoides tienen uso medicinal y sus frutos maduros son una fuente importante de pigmentos¹.

Importancia económica

Capsicum es una hortaliza también conocida como ají, pimiento, chiltoma o morrón¹ es importante en la historia, tradición y cultura de México. Es una planta cultivada en todo el mundo, se ubica entre las siete hortalizas más cultivadas, con una producción mundial estimada en 24 millones de toneladas, por lo que se considera un condimento de gran importancia económica. Los principales países productores son China (12.5 millones de toneladas) y México (1.9 millones). Aproximadamente el 25% de la producción mexicana se exporta (FAO, 2005). El chile es el noveno cultivo en importancia en México por su valor de producción ocupa el decimosexto lugar por la superficie sembrada. En 2006 se sembraron en México 158,000 ha que produjeron 2 millones de toneladas²⁰.

Este género se cultiva en casi todo el país, puesto que se adapta con facilidad a diferentes climas y altitudes. Es un cultivo riesgoso que requiere de mucha mano de obra y conocimientos especializados para obtener una buena producción. La mayor parte de la producción se concentra en los estados de Sinaloa, Chihuahua, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nayarit y Zacatecas. El mercado más importante para México son los Estados Unidos de Norteamérica, ya que a partir del inicio de la década de los 90 el consumo de chile aumentó de manera considerable, lo que hizo establecer anualmente alrededor de 5000 ha en los estados de Texas, California y Nuevo México¹⁰.

En México el chile se cultiva y utiliza como alimento en la dieta de la mayoría de la población. Mesoamérica es considerada como uno de los principales centros de domesticación del género *Capsicum*, en particular de la especie *C. annuum*. La importancia económica de este cultivo es evidente por su distribución y uso que tiene en todo el país. Se cultiva desde el nivel del mar, en las costas del golfo de México y del océano Pacífico hasta los 2500 m de altitud en la meseta central. Se pueden diferenciar regiones especializadas en la producción comercial de ciertos

tipos de chiles, tales como la región del golfo de México, donde se cultivan serranos y jalapeños; la del bajío, donde se cultivan chiles anchos mulatos y pasilla. En la meseta central se producen chile poblano, y en el pacífico norte se cultiva para exportación el chile dulce o Bell, Anaheim, caribe, etc. La importancia socioeconómica del cultivo es innegable, constituye una fuente de empleo para un gran número de personas, ya que se utilizan en promedio alrededor de 200 jornales por ha cosechada, sin contar los que se emplean en su comercialización e industrialización.^{8,12} El chile se encuentra entre los diez productos hortícolas más importantes que se comercializan en la central de abastos de la ciudad de México, siendo el serrano, el jalapeño y el poblano los de mayor venta¹⁰ **(Tabla 1)**.

Factores importantes para el desarrollo del cultivo

El crecimiento del chile depende de las condiciones del clima, del suelo y de las características genéticas de las variedades. El desarrollo del chile presenta cuatro fases de desarrollo y crecimiento durante la estación de cultivo:

F1 = De la germinación de la semilla al inicio de la floración.

F2 = De la floración a la fructificación.

F3 = De la fructificación a la madurez del fruto.

F4 = Madurez de fruto o cosecha.

En estas fases se presentan diferentes necesidades nutrimentales y vulnerabilidad a fitoparásitos, así como una fructificación y maduración diferente en las variedades del cultivo. Los agentes del medio físico como la temperatura, la luz y la humedad son determinantes en el crecimiento y desarrollo de los diversos cultivos de chile. Indicando además que, la temperatura y las condiciones edáficas, principalmente el estrés hídrico del suelo, influyen en la fisiología de la planta.

Tabla 1: Diferentes tipos de chiles nacionales y sus zonas de cultivo. Fuente: SIAP con información de las Delegaciones de la SAGARPA²⁶

TIPOS DE CHILE	IMAGEN	ESTADOS PRODUCTORES
Jalapeño	<p style="text-align: right;">29</p> 	<p>Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas.</p>
Serrano	<p style="text-align: right;">30</p> 	<p>Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.</p>

Continúa tabla 1

TIPOS DE CHILE	IMAGEN	ESTADOS PRODUCTORES
Habanero	<p data-bbox="945 233 976 258">31</p> 	<p>Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas.</p>
Poblano	<p data-bbox="945 716 976 741">32</p> 	<p>Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.</p>
Morrón	<p data-bbox="945 1207 976 1232">33</p> 	<p>Baja California, Baja California Sur, Jalisco, Morelos, Sinaloa y Sonora.</p>

Continúa tabla 1

Importancia del manejo fitosanitario del chile

El manejo de problemas fitosanitarios requiere de un diagnóstico de los organismos que son dañinos a la planta de chile, ya que sin el manejo adecuado se pueden generar errores al aplicar estrategias de manejo inadecuadas. Otro aspecto a considerar en el manejo de plagas y enfermedades del chile, es saber el momento adecuado para aplicar y combinar las diversas estrategias de manejo, para reducir la aparición de problemas fitosanitarios en el cultivo. El chile puede verse afectado como todo cultivo por distintas plagas y enfermedades que en condiciones favorables pueden afectar de manera significativa la producción o destruir por completo el cultivo como se indica en la **tabla 2** y **3**^{10,12}.

Tabla 2: Principales plagas por insectos del cultivo de chile (*Capsicum annum* L)

Insectos	Nombre científico.	Imagen
Picudo del chile o barrenillo	<i>Anthonomus eugenii</i>	<div style="text-align: right;">34</div> 
Mosca blanca	<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Trialeurode vaporariorum</i>	<div style="text-align: right;">35</div> 

Continúa tabla 2

Insectos	Nombre científico.	Imagen
Gusano soldado	<i>Spodoptera exigua</i>	<p style="text-align: right;">36</p> 
Trips	<i>Frankliniella occidentalis</i>	<p style="text-align: right;">37</p> 
Pulgones	<i>Aphis gossypii</i>	<p style="text-align: right;">38</p> 

Continúa tabla 2

Insectos	Nombre científico.	Imagen
Chinche apestosa	<i>Nezara viridula</i>	<p style="text-align: right;">39</p> 
Gusanos trozadores	<i>Agrotis sp., Prodenia sp., Euxoa sp.</i>	<p style="text-align: right;">40</p> 
Araña roja	<i>Tetranychus sp.</i>	<p style="text-align: right;">41</p> 

Continúa tabla 2

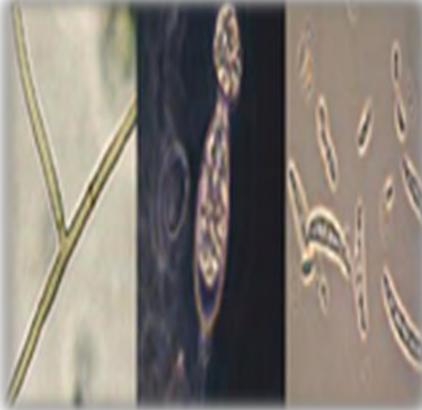
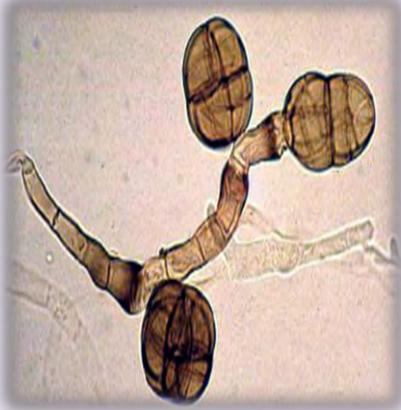
Insectos	Nombre científico.	Imagen
Minador de la hoja	<i>Lirimyza sp.</i>	<div style="text-align: right;">42</div> 

Continúa tabla 2

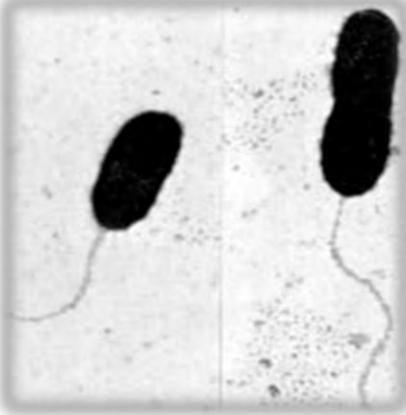
Tabla 3: Principales enfermedades fúngicas, bacterianas y virales del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.)

Enfermedad	Patógeno	Imagen
Marchitez del chile	<i>Phytophthora capsici</i>	<div style="text-align: right;">43</div> 
Pudrición del cuello	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<div style="text-align: right;">44</div> 

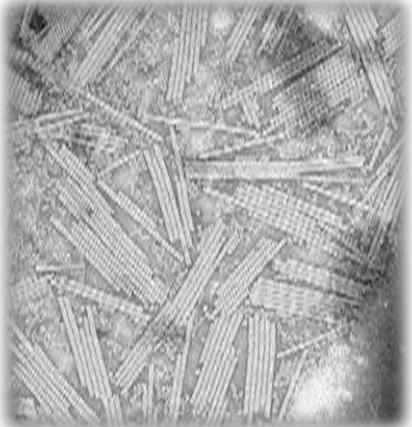
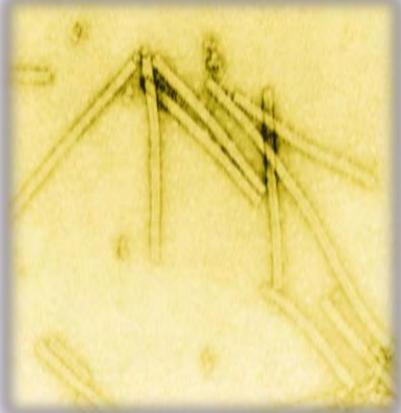
Continúa tabla 3

Enfermedad	Patógeno	Imagen
Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>	 <p>45</p>
Ahogamiento y pudrición de raíces	<i>Rhizoctonia solani, Pythium spp, Fusarium sp</i>	 <p>46, 47, 48</p>
Mancha gris	<i>Stemphyllium solani</i>	 <p>49</p>

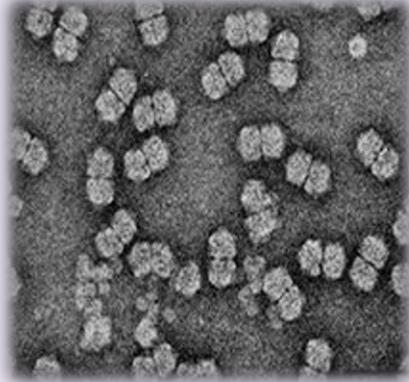
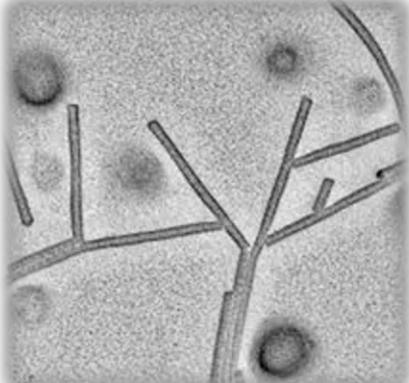
Continúa tabla 3

Enfermedad	Patógeno	Imagen
Marchitez bacteriana	<i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i>	<p style="text-align: right;">50</p> 
Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<p style="text-align: right;">51</p> 
Agallamiento en raíces	<i>Nacobbus aberrans</i> y <i>Meloidogyne spp</i>	<p style="text-align: right;">52</p> 

Continúa tabla 3

Enfermedad	Patógeno	Imagen
Virus Y de la papa	PVY	<p style="text-align: right;">53</p> 
Virus del mosaico del tomate	ToMV	<p style="text-align: right;">54</p> 
Pepper mottle potyvirus	PMV	<p style="text-align: right;">55</p> 

Continúa tabla 3

Enfermedad	Patógeno	Imagen
Planta atigrada	Geminivirus	<p style="text-align: right;">56</p> 
Virus del mosaico del tabaco	TMV	<p style="text-align: right;">57</p> 
Virus del grabado del tabaco	TEV	<p style="text-align: right;">58</p> 
Virus del mosaico del pepino	CMV	

Continúa tabla 3

Los principales factores que limitan la producción del chile es la presencia de las enfermedades causadas por los fitopatógenos con origen en el suelo, se han reportado principalmente los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, y *Fusarium*, que causan severos daños al sistema radical de la planta.

La enfermedad conocida como la marchitez del chile o "secadera" (*Phytophthora capsici* Leo) es considerada de gran importancia ya que ocasiona la muerte de la planta, con lo que puede reducir hasta un 50% la productividad.

Signos

P. capsici causa el tizón en el chile, cuando la infección es en la raíz o la base del tallo y la planta aun es pequeña, se observa un secamiento o ahogamiento (dampig off), o si ésta se encuentra en floración, los signos presentes son una pudrición de color café oscuro que rodea la base del tallo; posteriormente la planta se pone flácida y finalmente muere. Si el Oomyceto se hospeda en las partes aéreas, los signos son manchas cafés y necrosamiento de hojas, seguido de una pudrición en las ramas. Por último, en el fruto se observaran áreas decoloradas que contrastan con las porciones sanas; si la humedad es alta, en estas lesiones se forma una gran cantidad de esporangios y en el interior del fruto se observa micelio de aspecto algodonoso. Al avanzar la infección el fruto se seca y arruga progresivamente hasta quedar momificado¹⁰.

Diagnóstico de la enfermedad

Para el manejo y control de la marchitez del chile, es necesario tener conocimientos sobre el ciclo de vida y sobre aspectos físicos, químicos y biológicos de *P. capsici*, además entender los procesos ecológicos, los cuales van a suprimir la enfermedad.

Es preciso realizar un buen diagnóstico en campo y laboratorio, esto basándonos en los postulados de Koch, los cuales señalan que es necesario aislar el patógeno de plantas que presenten síntomas, a partir de tejido infectado o de suelos en medios selectivos o semiselectivos, este tipo de medios van a permitir que el hongo forme micelio y estructuras reproductivas, las cuales nos van a servir para su correcta identificación. Tradicionalmente, la identificación de *P. capsici* se basa en la observación directa al microscopio de sus características micromorfológicas como las hifas, esporangióforos, esporangios, zoosporas y oosporas, el siguiente paso es inocularlo en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad, en este caso *C. annuum*. Finalizando con un aislamiento de las plantas inoculadas anteriormente, donde las características deben corresponder con las de *P. capsici* ^{5, 13}.

Desafortunadamente este método es muy laborioso y tardado; actualmente se cuenta con varias técnicas modernas de diagnóstico como pruebas de DNA, RFLP´s y PCR, las cuales son muy precisas y sobre todo rápidas¹⁰.

Principal agente causal de la marchitez de Chile

Phytophthora capsici, perteneciente a la clase de los Oomycetos, fue descrita por primera vez por Leonian en Nuevo México, como el agente causal de la “marchitez del Chile”, durante años el estudio de este microorganismo se basó bajo la clasificación de los Oomycetos dentro del reino Chromista, teniendo la siguiente taxonomía⁸.

Super reino Eumycota

Reino Chromista

División Oomycota

Subdivisión Phycomycotina

Clase Oomycetes

Orden Peronosporales

Familia Peronosporaceae

Clase Oomycetes

Los Oomycetes son organismos eucariotas, encontrados en montañas, desiertos, ambientes acuáticos y hasta en la Antártica. Sin embargo, se conoce poco de ellos. Este grupo de organismos miceliales habían sido agrupados en los hongos verdaderos por la habilidad de absorber nutrientes directamente **(osmótrofos)**, además de compartir varias características, como el desarrollo de hifas y la dispersión por medio de esporas mitóticamente formadas¹. Tienen la capacidad de dispersarse por medio de zoosporas y producir oosporas sexuales con paredes celulares gruesas, poseen otras características tales como celulosa (β -1, 4-glucano) en sus paredes celulares, diploidía vegetativa, flagelos heterocontos, crestas mitocondriales tubulares y, en el caso de las especies del género *Phytophthora*, la falta de epoxidación del escualeno para la síntesis de esteroides, que los distinguen

de los hongos verdaderos, sin embargo análisis moleculares y bioquímicos, así como características morfológicas sugieren que los Oomicetos comparten poca afinidad taxonómica con los hongos filamentosos, pero están más estrechamente relacionados con las algas pardas y diatomeas en un grupo conocido como ***Stramenopilia***. Esta conclusión está basada por filogenias en secuencias de ARN ribosomal, y compilación de datos de aminoácidos de las proteínas mitocondriales.

Los Oomicetos también muestran una serie de características bioquímicas y morfológicas que los distinguen de los hongos verdaderos y demuestran su similitud con las algas pardas y otros organismos del mismo grupo. Las paredes celulares de Oomicetos se componen principalmente de glucanos y celulosa a diferencia de las paredes celulares de los hongos compuestas por quitina. Las zoosporas presentan flagelos con una estructura parecida a los flagelos de las esporas móviles de algas. Los Oomicetos también contienen “mycolaminarina” como almacenamiento químico de energía, una molécula que se encuentra también en laminariales y diatomeas^{1,4}. La reproducción asexual, tiene gran importancia como medio de propagación, sobre todo en las especies parásitas de plantas, pues durante una parasitosis se originan varias generaciones asexuales; en cambio sólo se produce una generación sexual, durante la que se forman elementos de resistencia que permiten la supervivencia de las especies.

Las zoosporas que se producen en el esporangio, llamadas zoosporas primarias, son más o menos piriformes y con los flagelos situados en la región anterior. Estas zoosporas viven algún tiempo en esta forma, pero luego pierden sus flagelos, se inmovilizan, toman aspecto redondeado y se proveen de una pared delgada. Si las condiciones son propicias, cada uno de estos elementos reproductores germinan y constituye un nuevo micelio².

Los Oomicetos los podemos encontrar marinos o terrestres, este grupo engloba tanto a saprofitos como parásitos, los cuales están vinculados mayoritariamente a medios acuoso. Presentan una gran importancia económica puesto que engloban a parásitos de plantas vasculares, muchas de ellas de interés agrícola, pueden llegar afectar a plantas de ornamento, de tomate, de cítricos, así como también atacan a una gran diversidad de plantas de Chile¹³.

Orden Peronosporales

En este orden, con representantes muy numerosos, se encuentran las especies más evolucionadas de los hongos con elementos flagelados. Su micelio, bien desarrollado, está formado de hifas más o menos cilíndricas, muy ramificadas y cenocíticas, aunque en las hifas que han llegado a la vejez se pueden formar septos.

En las especies parasitarias, el micelio generalmente es intercelular, y las hifas se extienden entre las células del hospedante, a las que envían haustorios de aspecto muy diverso en cada caso particular y según los géneros a los que pertenecen dichas especies. En algunos representantes, las hifas también pueden ser intracelulares, pasando a través de las células del hospedante.

En la reproducción asexual se forman esporangios ovales o con aspecto de limón. Algunas especies generan sus esporangios en hifas vegetativas que no se diferencian de las demás, y quedan unidos a ellas al madurar. Sin embargo, en otras especies los esporangios, también llamados esporangioconidios, se desprenden en su madurez y se forman en hifas especiales de sostén esporangióforos. En algunas especies estos esporangioconidios pueden germinar directamente sin originar zoosporas. En la mayoría de las especies se producen zoosporas reniformes, con dos flagelos, y monoplanéticas. Al quedar libres, nadan por poco tiempo, se enquistan y después germinan formando nuevos micelios².

En la reproducción sexual intervienen anteridios y oogonios. La fecundación se efectúa por cariogamia de núcleos femeninos y masculinos, después de la formación de los tubos de fertilización que envía el anteridio hacia las oosferas; según el número de núcleos que tenga la oosfera, se fusionan uno o varios pares de núcleos y se obtienen cigotos, y oosporas uni o multinucleadas².

Las numerosas especies de este orden viven en el agua, en la tierra o en ambos medios. Existen muchos parásitos de plantas fanerógamas cultivadas, en las que a menudo producen epidemias con las consecuentes pérdidas económicas. Muchas de estas enfermedades conocidas con los nombres de putrefacciones, podredumbres, royas blancas y mildiús vellosos son producidas por Oomicetos de este orden.

Dentro de esta familia se encuentran dos de los principales fitopatógenos, *Pythium* sp y *Phytophthora* sp⁵.

Phytophthora

El género *Phytophthora* (del griego **Phyton**: planta; **phthora**: destructor) fue creado por de Bary en 1876 con ***P. infestans*** de Bary como especie tipo⁹.

A mediados de la década de 1800 un millón de personas murieron en Irlanda cuando fracasó la cosecha de patatas en ese país. El Oomiceto que causó la gran peste de las patatas, *Phytophthora infestans*, fue uno de los primeros microorganismos que se asoció con la enfermedad.

En Australia *Phytophthora cinnamoni* ha infectado cerca del 20% de una especie de *Eucalyptus*. *Phytophthora* fue introducida en los Estados Unidos en la década de 1990 y causó daños generalizados en los cultivos de frutos y vegetales. Cuando en 1995 comenzaron a secarse de modo súbito los robles de California, los científicos

de la Universidad de California identificaron la causa de esta "muerte súbita de los robles" como una especie nueva, *Phytophthora ramorum*⁴.

Por lo que *Phytophthora* es uno de los fitopatógenos más devastadores, al provocar tizón y marchitez en las plantas. Las enfermedades causadas por *Phytophthora sp* usualmente se desarrollan rápidamente y se presenta mayor parte en climas cálidos y húmedos, principalmente en verano cuando la humedad es muy alta, estas condiciones fomentan la esporulación del patógeno, lo cual ayuda a la difusión del mismo¹³.

El tizón y marchitez por *Phytophthora*, es una enfermedad de evolución rápida, los primeros signos consisten en una coloración grisácea en el tejido infectado, la cual gradualmente se convierten en necrosis. Las lesiones avanzan rápidamente para dar lugar a un marchitamiento, cuando las condiciones permanecen húmedas durante el desarrollo de la enfermedad, puede aparecer micelio de color blanco sobre la superficie del tejido infectado¹³.



Imagen 3: Tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial²⁵.



Imagen 4: Esporangio liberando zoosporas de *Phytophthora sp*²².

Phytophthora capsici

Taxonomía.

Reino:	<i>Chromista</i>
Phylum:	<i>Oomycota</i>
Clase:	<i>Oomycetes</i>
Orden:	<i>Peronosporales</i>
Familia:	<i>Peronosporaceae</i>
Género:	<i>Phytophthora</i>
Especie:	<i>capsici</i>

Phytophthora capsici fue descrita por Leonian en nuevo México⁶, quien en 1922 lo aisló de plantas de chile atacadas por tizón, identificando a este agente como el responsable de la "marchitez del chile" el cual se consideraba hospedante específico a *Capsicum annum*^{5,6}, pero *P. capsici* infecta especies como berenjena, algodón, tomate, cacao, entre otras⁶.

Características morfológicas de *Phytophthora capsici*

Para la identificación de este patógeno, es necesario realizar una caracterización tanto micromorfológica como molecular. Las principales características son: tipo de micelio, forma y tamaño de zoosporangios, tamaño de zoosporas y la producción de esporas sexuales (oosporas), formación de estructuras de resistencia (clamidoconidios). Mientras que para la identificación molecular, es recomendable **utilizar regiones no codificantes de los genes nucleares que codifican para β tubulina**, para el factor de elongación, así como los genes citocromo oxidasa I y II, y más recientemente las regiones del gen Ypt1 que codifica para una proteína RAS relacionada de membrana¹³.

Características macroscópicas de la colonia:

Anverso: Tamaño ilimitado, marcadamente radiado o ligeramente estrellado, presentándose los bordes de la colonia redondeados o sinuosos⁹, de color blanca, de forma y aspecto vellosa-seca.

Reverso: No presenta pigmentos.

Características microscópicas:

Tipo de micelio: Macrosifonado, cenocítico, hialino, muy ramificado y toruloso. Esporangios, de forma y tamaño muy variable; oblongos, elípticos, ovalados,

alargados, con una vacuola en el centro, hialinos, con papila prominente, a veces desviada y se observan con frecuencia esporangios bipapilados⁵, la presencia de agua es primordial para la formación de estos. En los esporangios se pueden producir zoosporas biflageladas las cuales se diferencian e individualizan en el mismo esporangio. Los flagelos le permiten nadar distancias cortas en suelos muy húmedos, la cual es una forma de diseminación de los Oomicetos de este género.

Son capaces de producir oosporas, las cuales son esporas de reproducción sexual. Que se producen por la unión de gametangios morfológicamente distintos llamados anteridios (masculino) y oogonio (femenino)¹³.

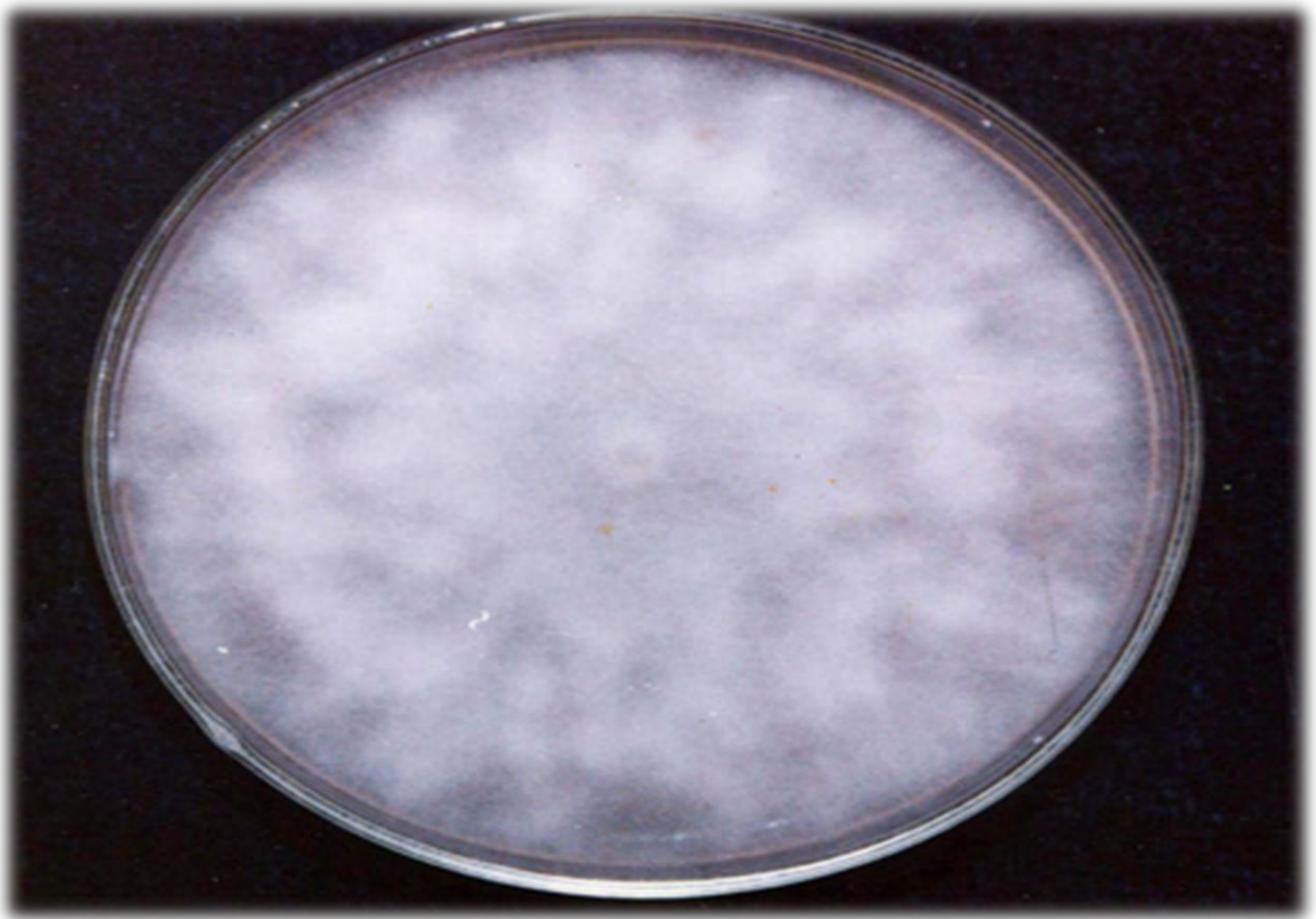


Imagen 5: Crecimiento en agar de papa y dextrosa (PDA) de *Phytophthora capsici*²⁷.

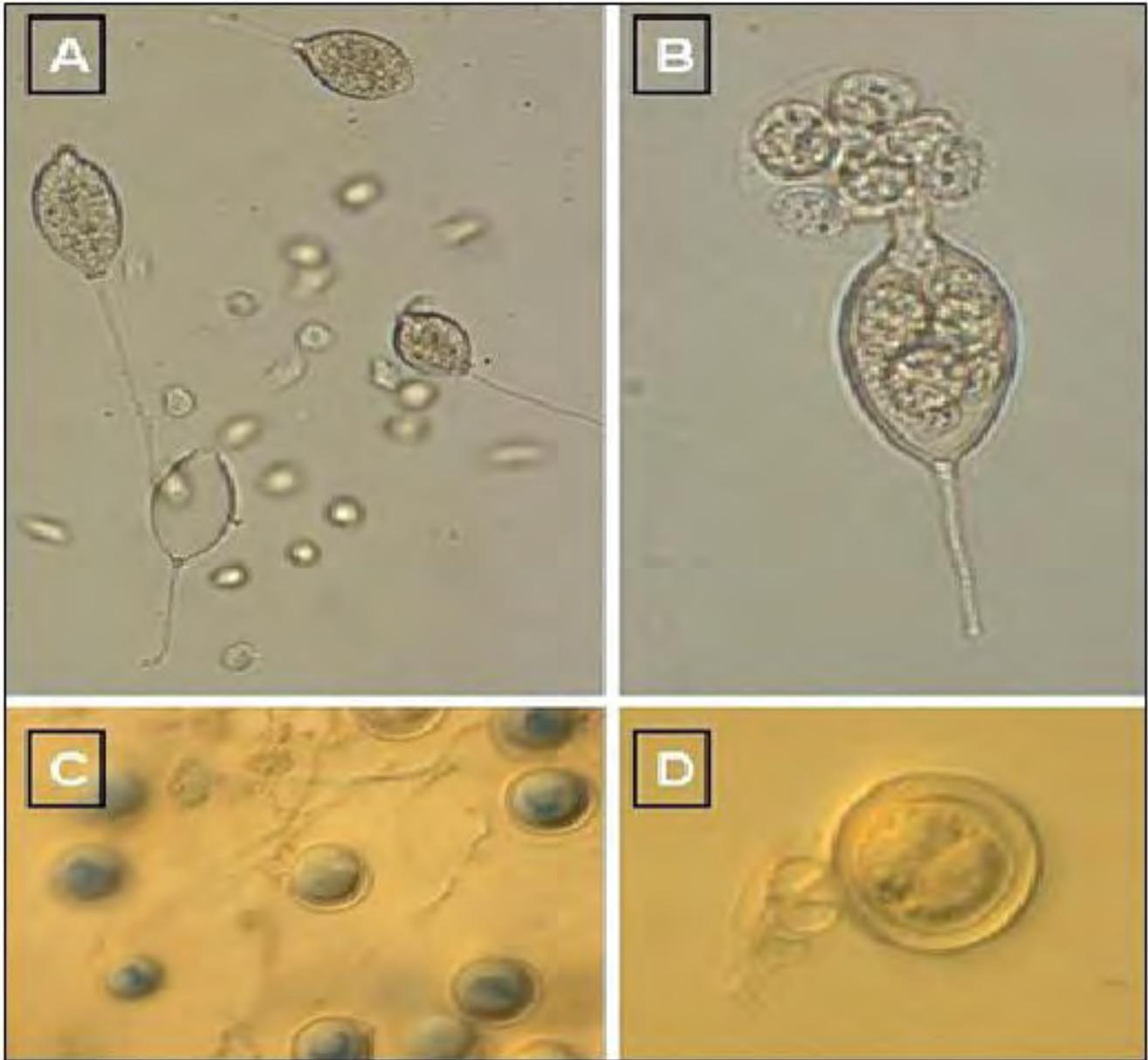


Imagen 6: Estructuras reproductivas de *Phytophthora capsici*. **A)** Esporangios y zoosporas; **B)** Esporangio liberando zoosporas al medio; **C), D)** Oosporas²⁸.

Phytophthora capsici causa la enfermedad más devastadora en Chile a nivel mundial, conocida como marchitez del Chile¹. En México se calcula que el 40% de las plantas mueren a causa de dicha enfermedad. El patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici* es más complejo que la mayoría de los patosistemas que involucran a patógenos del género *Phytophthora*, ya que *P. capsici* puede infectar

virtualmente cualquier parte de la planta. Puede dispersarse por al menos cuatro mecanismos:

1. Movimiento de raíz a raíz por crecimiento de la misma hacia el inóculo, movimiento del inóculo hacia las raíces o por contacto de raíz a raíz.
2. Dispersión del inóculo por agua de riego.
3. Por salpique de agua a hojas, tallos y frutos.
4. Dispersión aérea del inóculo proveniente de lesiones con esporulación tanto en hojas, tallos y frutos.

Por lo tanto, ataca a frutos, follaje, tallos o raíces, ya que el patógeno no es estrictamente aéreo, acuático o del suelo¹⁰.

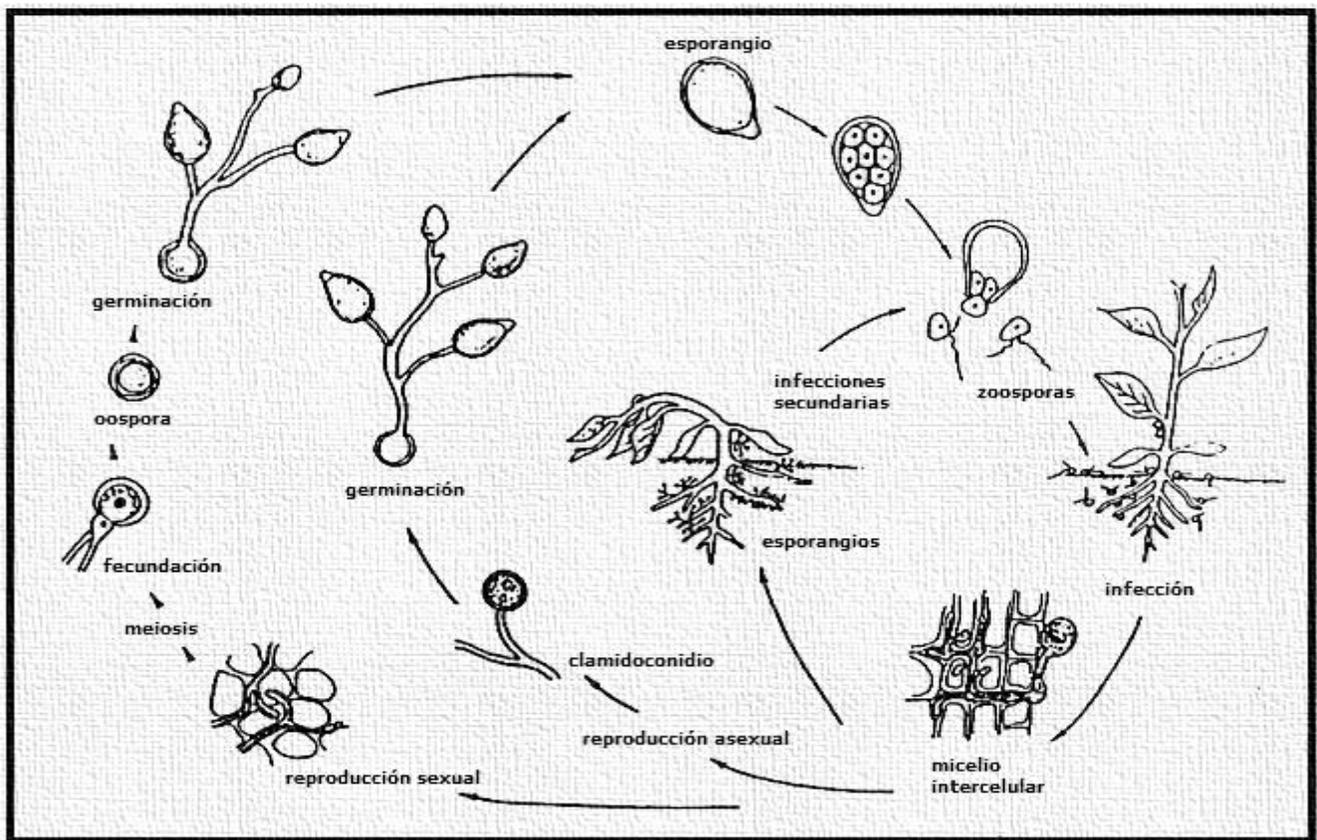


Imagen 7: Ciclo de infección de *P. capsici* en planta de chile (PALLOIX, 1989) versión modificada.

Control de *P. capsici* en campo

La amplia gama de hospedantes y la capacidad de supervivencia en el suelo como oosporas, hacen que *P. capsici* sea un patógeno de difícil control en el mundo. Se ha intentado controlar la enfermedad a través de diversas medidas como la solarización, aplicación de abonos orgánicos, fungicidas, rotación de cultivos, etc., obteniéndose en algunos casos buenos resultados; no obstante, el uso de cultivares tolerantes es una de las medidas que siempre será incluida dentro de un programa integral de manejo de la enfermedad.

Dentro del control de este patógeno se llevan a cabo medidas preventivas, así como el correcto manejo de la enfermedad¹⁰.

Control químico

De las estrategias más comunes para controlar este patógeno es la utilización de fungicidas, ya que si se combina con las estrategias de manejo antes mencionadas, se puede reducir de forma importante la incidencia de la enfermedad en el campo.¹⁰ Sin embargo el uso indiscriminado ha ocasionado el desarrollo de aislamientos resistentes, causando la prohibición de algunos de los productos más usados para el control de este Oomyceto, como el bromuro de metilo,¹⁸ el Metalaxil y el Captafol han sido de los fungicidas más efectivos para el control de esta enfermedad; el primero es muy eficiente cuando este microorganismo ataca a nivel del cuello y raíz y el segundo cuando ataca al follaje, desafortunadamente en 1985 Browsers y Coffey reportaron resistencia al metalaxil por muchos Oomycetos, por lo que se recomienda utilizar mezclas de fungicidas o fungicidas alternativos para evitar la resistencia del patógeno a los mismos¹⁰.

Stanghellini *et al.* (1996), encontraron que la utilización de surfactantes no iónicos puede reducir la incidencia del patógeno en sistemas hidropónicos. También el uso de ácido fosfórico en plantas de chile y tomate puede reducir la incidencia del patógeno.

Resistencia genética

La resistencia genética es probablemente la medida de control de más valor en la agricultura, su éxito es el resultado de investigaciones extensivas en estaciones experimentales.

La resistencia es definida como la habilidad del hospedante para reducir o impedir el desarrollo del patógeno.

Las plantas poseen una serie de mecanismos de defensa contra los fitopatógenos. Existen defensas preformadas e inducidas. Entre las preformadas se encuentran péptidos, proteínas y metabolitos secundarios no proteicos. Diferentes compuestos producidos por patógenos inducen los mecanismos de defensa de las plantas. Los productos de patógenos que producen esta respuesta son conocidos como elicitores. Los elicitores desencadenan cascadas de señales de transducción lo cual lleva a la activación de los genes de defensa de las plantas.

Entre las respuestas inducidas se encuentra la respuesta SAR como consecuencia del ataque de fitopatógenos. Activada SAR, las plantas comienzan a expresar una serie de genes relacionados con la patogénesis tanto a nivel local del ataque como en toda la planta. En muchas plantas, SAR es precedida por la acumulación sistémica de SA. Algunos genes relacionados con la patogénesis responden al SA y son inducidos por el etileno y JA, otros son inducidos por el etileno y el JA, pero no

responden al SA. Estas moléculas señalan y regulan la expresión diferencial de los diferentes conjuntos de genes relacionados con la patogénesis¹.

La compatibilidad o incompatibilidad de las interacciones planta-patógeno es fácil de estudiar en plantas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético, los denominados **cultivares**. Una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran resistencia y otros que muestran susceptibilidad a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un cultivar determinado¹.

El objetivo de la mayoría de los fitomejoradores es la obtención de altos niveles de resistencia, pero a la vez mantener las características agronómicas del cultivo, las cuales son necesarias por las preferencias de los consumidores.

Resistencia de variedades de *Capsicum annuum* a *P. capsici*

La resistencia a la gran variedad de enfermedades y plagas que atacan al chile significa un gran esfuerzo, pero las fuentes representadas por los diferentes tipos de chile dentro de *Capsicum annuum*, y también las fuentes dentro de otras especies compatibles con esta especie, están siendo explotadas por los fitomejoradores.

En México, se identificó en la línea de chile pasilla 64-131 resistencia al ataque de *P. capsici*, tanto en el follaje como en la base del tallo. Se han realizado numerosos intentos para encontrar fuentes de resistencia en chile ancho; una de las primeras variedades comerciales con resistencia a *P. capsici* fue Adra de Abbot & Cobb Seed Co. la variedad resistente Emerald Isle de Harris Moran Seed Co. también fue liberado, desafortunadamente, al igual que Adra no poseían características agronómicas del agrado de los consumidores. Recientemente Novartis Seeds Inc. liberó el cultivar resistente denominado Paladin, que posee excelente resistencia y

además tiene extraordinarias características agronómicas; sin embargo, una desventaja de este ejemplar es que no posee resistencia al ataque de *P. capsici* en la parte aérea de la planta, la cual es común en zonas muy lluviosas. Además se ha visto que largos períodos de incubación o altas concentraciones de inóculo de *P. capsici* pueden ocasionalmente romper la resistencia de este chile, manifestándose signos de la enfermedad en plantas resistentes. La resistencia del chile a *P. capsici* parece ser gobernada por dos genes dominantes distintos, los cuales actúan independientemente. Estos genes confieren un alto nivel de resistencia, pero no inmunidad después de una prolongada exposición al Oomyceto¹⁰.

Hasta el momento, la única especie del chile ha mostrado una resistencia universal a los aislados de este Oomyceto, es el chile serrano Criollo Morelos (CM-334); este es procedente del estado de Morelos y es la fuente principal de resistencia a la marchitez de raíz y es utilizado en los programas de mejora genética de chile, debido a que posee el nivel más alto de resistencia conocido y ser resistente a varios aislados de *P. capsici* de diferentes hospedantes y regiones geográficas¹.

La resistencia a *P. capsici* en genotipos de chile como la línea 29, PI1232, PI201234 y Serrano CM-334, parece ser controlada por tres genes. En el caso del CM-334 no existe consenso sobre la genética que gobierna la respuesta de resistencia, algunos Loci de caracteres cuantitativos (QTL) han sido mapeados, y en estos estudios se ha determinado que la herencia a la resistencia es multigénica. Se determinó que seis regiones de los cromosomas cuatro, cinco, seis, once y doce están involucradas en cierta medida en la resistencia. Diferentes partes de la planta de chile pueden ser infectados por *P. capsici*, por lo que cada parte infectada puede ser considerada como un síndrome distinto, y la resistencia a cada uno de los síndromes es controlada por genes distintos¹.

Kim y Hwang (1989) encontraron que altas concentraciones de inóculo causaron enfermedad en cultivares resistentes, ya que los periodos de incubación fueron prolongados, concluyendo que la resistencia se puede romper cuando hay una larga exposición al patógeno.¹⁰ Mientras que en CM-334, la resistencia es independiente de estos factores, el único factor que afecta a esta variedad es la intervención de un segundo fitopatógeno, el nematodo *Nacobus aberrans*, al provocar la pérdida de resistencia¹.

Los nemátodos agalladores tienen la capacidad para inducir una reprogramación celular y por lo tanto, una alteración en la expresión genética del hospedante. Estos cambios inducidos pueden alterar los mecanismos de defensa de las plantas haciéndolas así susceptibles a hongos fitopatógenos. Dentro de los cambios que *N. aberrans* produce en el sistema radicular del CM-334, se encuentra una disminución en la actividad enzimática de PAL y POD, así como una disminución de la concentración de fenoles solubles totales y de ácido clorgénico¹.

En un estudio donde se realizaron pruebas de resistencia contra *P. capsici* en 10 cultivares de tomate en invernadero, claramente se observó que conforme las plantas van creciendo, estas incrementan su resistencia al patógeno; las plantas se inocularon al presentar cuatro y ocho hojas verdaderas y los métodos de inoculación fueron al follaje y al tallo con previas heridas; la expresión de la resistencia fue más aparente en los tallos de las plantas que en el área foliar, no se desarrollaron signos en plantas inoculadas con tallos heridos en un estado de desarrollo de ocho hojas, lo cual confirmó que la expresión de este tipo de resistencia solo se presenta en plantas maduras¹⁰.

Estudios de herencia de la resistencia para determinar la base genética de la resistencia en plantas adultas de Chile a *P. capsici* a través de retrocruzamientos F1 y poblaciones F2, se desarrollaron usando los padres resistentes de CM-334 y padres

susceptibles de Agronómico 10-G y Yolo Wonder. Las plantas de Chile fueron inoculadas cerca de la base del tallo 36 días después del trasplante, con una suspensión de inóculo de 5×10^4 zoosporas/mL. La proporción de segregación en la generación F2 fue de 13 plantas resistentes por 3 susceptibles y se ajustó a un modelo de resistencia que involucra dos genes, donde hay epistasia recesiva y dominante.

La resistencia en los materiales de Chile "Fyuco" y "P51" estaba gobernada por un solo gen dominante. Estudios realizados por Bartual *et al* (1991) sobre la acción de genes en la resistencia a *P. capsici* usando datos de cruces simples y triples derivadas de siete líneas de Chile con un alto grado de resistencia al patógeno (Phyo 630, P51, PM 217, Smith 5, Marisol, Línea 29 y Serrano), indicaron a la epistasia como la fuente principal de variación. En 1980, Guerrero-Moreno y Laborde, encontraron que la resistencia que presentaba el cultivar CM-334 a varios aislamientos era controlada independientemente por dos genes recesivos no relacionados; Reifschneider *et al* (1992) utilizaron el cultivar CNP 148 (una selección del CM-334), y obtuvieron que la herencia de la resistencia a un aislamiento de *P. capsici* de Brasil difirió de la herencia de la resistencia a los aislamientos utilizados en estudios en México y que en CM-334 de México y Brasil no son el mismo patotipo, considerando entonces que el CM-334 es probablemente una población heterogénea, por lo que la resistencia a aislamientos de México y Brasil deben ser probados sobre los mismos genotipos¹⁰.

Está ampliamente documentado que variedades resistentes al ataque de ciertas especies de Oomycetos se muestran susceptibles a éstos cuando son infectados por nematodos, principalmente especies de *Meloidogyne* sp y *Nacobbus aberrans*. En 1992 Hernández *et al*, encontraron que el Chile Ancho 86-266, resistente a *P. capsici*, se mostró susceptible al Oomyceto al ser previamente inoculado con *Nacobbus aberrans*¹⁰.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ◆ Comprobar si las variedades obtenidas de cruces de progenitores resistentes (homocigotos al gen de resistencia) con susceptibles (heterocigotos que no poseen el gen) de *Capsicum annuum*, presentan resistencia al fitopatógeno *Phytophthora capsici*.

Objetivos particulares

- ◆ Aislar al Oomiceto *Phytophthora capsici* a partir de muestras de suelo.
- ◆ Caracterizar macroscópica y microscópicamente del fitopatógeno "*Phytophthora capsici*."
- ◆ Verificar la virulencia de la cepa en hospederos susceptibles.
- ◆ Identificar las variedades resistentes y sensibles de *Capsicum annuum* al Oomiceto
- ◆ Determinar el tiempo en que las plántulas hospederas (sensibles) presentan los signos de la enfermedad.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

METODOLOGIA

Obtención del aislamiento de *P. capsici*.

Siguiendo los postulados de Koch, se pesaron 10 gramos de suelo adherido de la planta que presentó signos de la enfermedad, causada por este patógeno. El suelo se depositó en 100 mL de agua estéril, junto con una pera para que esta fungiera como hospedante al Oomyceto. Una vez que el fruto empezó a presentar pudrición, se trasladaron trozos del mismo en cajas con medio Agar V8 (**ANEXO B**), se pusieron a incubar a temperatura ambiente durante 5 días. Una vez que se presentó un crecimiento micelial se tomó para observar al microscopio, con la finalidad de encontrar estructuras características del género *Phytophthora sp*, confirmadas estas estructuras se realizaron resiembras hasta obtener una colonia pura.

Identificación molecular.

El aislamiento obtenido se proporcionó al laboratorio de fitopatología del CIAD quienes lo etiquetaron con una clave interna Phy-11.

Producción de micelio. Inicialmente el aislamiento Phy-11 se creció en medio de cultivo V8 por 5 días a 25 °C. Posteriormente, se tomaron discos de 1 cm de diámetro y se agregaron en 250 mL de caldo Papa Dextrosa. Se colocaron en agitación a 40 RPM durante 3-4 días. Después se colectó el micelio mediante filtrado con la ayuda de tela de organza. El micelio se lavó con agua destilada estéril, se colocó en papel aluminio y se conservó -20 °C hasta su uso para extracción de ADN.

Extracción de ADN. Para extraer el ADN se siguió el protocolo de extracción de Zelaya-Molina. El procedimiento consiste en colocar 800 μ l de buffer de lisis en un tubo de 2 mL previamente esterilizado (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA pH 8.0; 0.5% triton x-100, 0.5% tween 20) y 20 μ L de proteinasa k. Después se agrega 15-20 mg de micelio, se homogeniza y tritura con pistilos estériles y se somete a vórtex durante 30 s; se incuba a 55 °C durante 30 min (se mezcla por inversión cada 10 min); se enfría a 27 °C. Después se agrega 800 μ L cloroformo-alcohol isoamilico (24:1, V:V), se somete a vórtex durante 30 s y se centrifugó a 10,000 RPM durante 20 min. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo. Se agregó 10 μ l de RNasa y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se adicionó 1 mL de isopropano (2-propanol), se mezcló por inversión 5 veces y se incubo a -20 °C durante 30 min. Después se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 min. El sobrenadante se decantó con mucho cuidado para no tirar la pastilla y se agregó 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 10,000 RPM durante 5 min, se decantó de nuevo el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol absoluto con una centrifugación de 10,000 RPM por 5 min. Finalmente se decantó el sobrenadante y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente durante 10-15 min para eliminar residuos de alcohol. La pastilla se resuspendió con 35-50 μ l de amortiguador Tris EDTA (Tris 10 mM, EDTA mM), se almacenó a 4°C las primeras 24 h y después se conservó a -20 °C hasta su uso.

Los primes específicos PC-3 y PC-6R diseñados para identificar específicamente a *Phytophthora capsici* se utilizaron para confirmar la identidad del aislamiento Phy-11. Cada reacción de 25 μ l contuvo 5 μ l de buffer 5X Green go taq (PROMEGA), 11.5 μ l MgCl, 2 μ l de ADN genómico, 0.5 μ l de primers, 0.5 μ l de dNTPs., 0.2 μ l de Taq polimerasa y 14.8 μ l de agua.

La reacción se realizó en un termociclador Biorad con una incubación inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 s, 62 °C por 45 s, 72 °C por 45 s, y una incubación final de 72 °C por 10 min. El producto esperado fue de 219 bp.

Amplificación de un fragmento de la región ITS. Para confirmar mediante una segunda técnica molecular se amplificó un fragmento de la región ITS, mediante los primers ITS4-ITS6. La reacción incluyó los siguientes reactivos 5 µl de buffer 5X Green go taq (PROMEGA), 1.5 µl MgCl, 2µl de ADN genómico, 0.5 µl de primers, 0.5 µl de dNTPs., 0.2 µl de Taq polimerasa y 14.8 µl de agua y las condiciones de PCR fueron una incubación inicial de 94 °C por 3 min; posteriormente, 30 ciclos incluyeron 94 °C, 55 °C y 72 °C, todas por 1 min. Finalmente una etapa de incubación 72 °C POR 10 min. El fragmento esperado como resultado de la amplificación era de 1300 pb.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis del gel se desarrolló en buffer TAE 1X en una cámara de electroforesis a 70 V. Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con marcadores moleculares conocidos.

Secuenciación de fragmento ITS. Una vez obtenido el fragmento de la región ITS, éste se purificó mediante el kit WIZARD (PROMEGA), se cuantificó la concentración de ADN mediante un nanodrop y se envió al laboratorio LANGEBIO-CINVESTAV para obtener su secuenciación.

Preparación e inoculación de *P. capsici*.

Identificado el fitopatógeno se tomaron discos de 5 mm de la colonia para transferirlas a placas de Agar V8, se incubaron durante cinco días a temperatura ambiente. Dispuesto el crecimiento en las placas, se realizaron pequeños cortes al medio, se inundó con agua destilada estéril y se incubó a temperatura ambiente durante tres días para inducir el desarrollo de esporangios con zoosporas.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó una muestra de la colonia y se observó al microscopio para confirmar la presencia de los esporangios, encontradas las estructuras se tomó el crecimiento de la colonia y se llevó a un matraz con 800 mL de agua destilada estéril la cual se puso en agitación constante para reventar los esporangios y de esta forma liberar las zoosporas presentes en ellos, obteniendo de esta manera una solución stock de zoosporas, de la cual se tomaron muestras cada 5 minutos para observar al microscopio, hasta observar las zoosporas libres, una vez vistas se contaron por medio de la cámara de Neubauer y se calculó la concentración de zoosporas por mililitro. Se realizaron los cálculos correspondientes para encontrar el volumen que correspondía a una concentración de 10,000 zoosporas¹⁰. Obtenido este dato se realizó la inoculación en las plántulas, donde se usaron 10 plántulas experimentales y 10 testigos, esto solo en los casos donde se obtuvieron germinaciones iguales al 100%, en las que no se procuró tomar la hilera donde germinaron más plántulas.

Las plántulas se regaron media hora antes de la inoculación, para después hacer la aplicación de la suspensión de zoosporas, la cual fue alrededor de la base de las plántulas, mientras que a las testigos se les aplicó agua destilada estéril.

Después de la inoculación se regó nuevamente con poca agua. A los días siguientes se regaron dos veces al día (mañana y tarde), hasta que se presentaron los signos.

Evaluados de la siguiente manera:

√ = Sanas X= Lesiones pequeñas XX= Lesiones evidentes en tallo
XXX= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas XXXX= Planta muerta

- Identificación del agente causal en plántulas susceptibles.

Identificadas las plántulas susceptibles se tomaron muestras de estas para aislar el agente causal de los signos de enfermedad.

La obtención del patógeno causante de la marchitez en las variedades de *Capsicum annuum* inoculadas, se llevó a cabo tomando trozos de tallo de al menos 5 mm que presentaron daños por el agente infeccioso, estos se lavaron con hipoclorito para desinfectar la superficie de las mismas por 40 segundos, siguiendo de un enjuague con agua destilada estéril. Las secciones de tejido vegetal se dejaron secar en la campana de flujo laminar, y se sembraron en cajas con medio Agar V8 para ser incubadas posteriormente por 5 días a temperatura ambiente (25 °C). Transcurrido el tiempo se observó el crecimiento en las cajas y las que presentaron las características macroscópicas propias de *P. capsici*, se aislaron tomando discos de la colonia con ayuda de un sacabocados y transfiriéndolos a medios con Agar V8 hasta purificar la cepa, la cual se identificó microscópicamente.

Producción de plántula.

- 1 • Se humedeció el peat moss a capacidad de campo.
- 2 • Se llenaron las charolas dejando un espacio de 1 cm a la superficie.
- 3 • Se colocó una semilla por cavidad completando una hilera, alternándose una hilera sin semilla (**Imagen 8 A**), en el caso de las 30 variedades de chile.
• Mientras que en las de tomate y semilla a cada pozo se le depositó una semilla.
- 4 • Se taparon las semillas con vermiculita dejando 0.5 cm de espacio a la superficie y se humedeció usando un rociador.
- 5 • Las charolas se envolvieron en bolsas negras para conservar su humedad durante el periodo de emergencia.
- 6 • Las charolas se fueron destapando a la presencia de la primer plántula emergida (**Imagen 8 B**). Las plántulas se regaron cada 3er día, hasta su inoculación

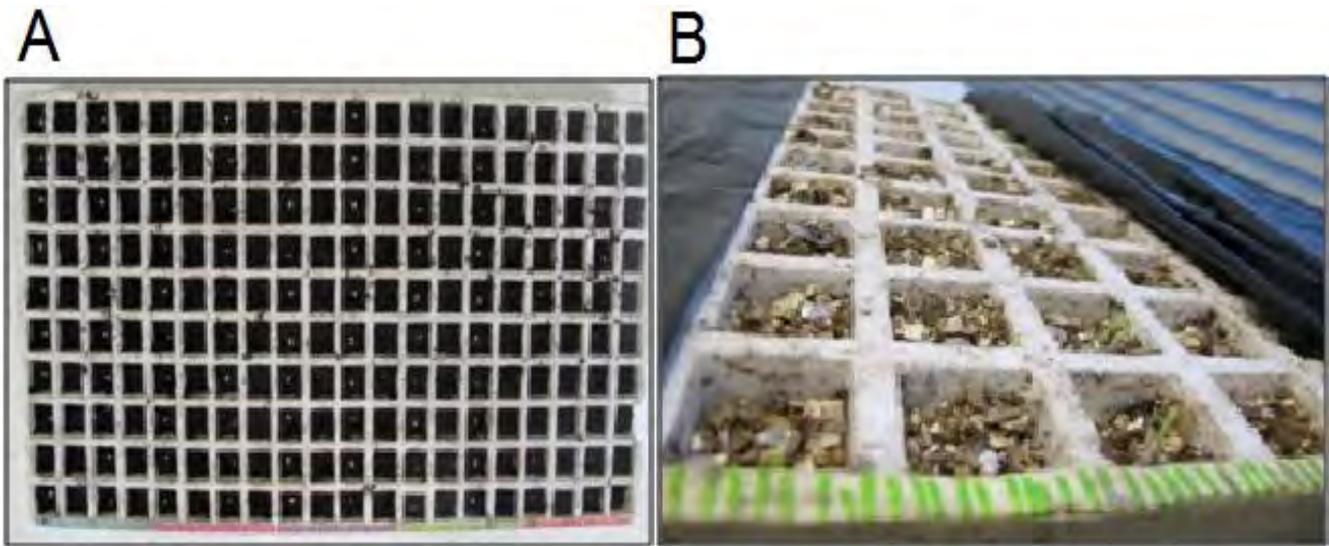


Imagen 8: Producción de plántula. **A)** Distribución de la semilla por charola. Una semilla por pozo dejando libre una hilera. **B)** Primeras plántulas emergiendo, por lo que la charola se tuvo que destapar.

RESULTADOS

Caracterización macroscópica y microscópica en medio PDA

Macroscopía

Anverso: Crecimiento abundante, micelio color blanco, de aspecto velloso-seca.

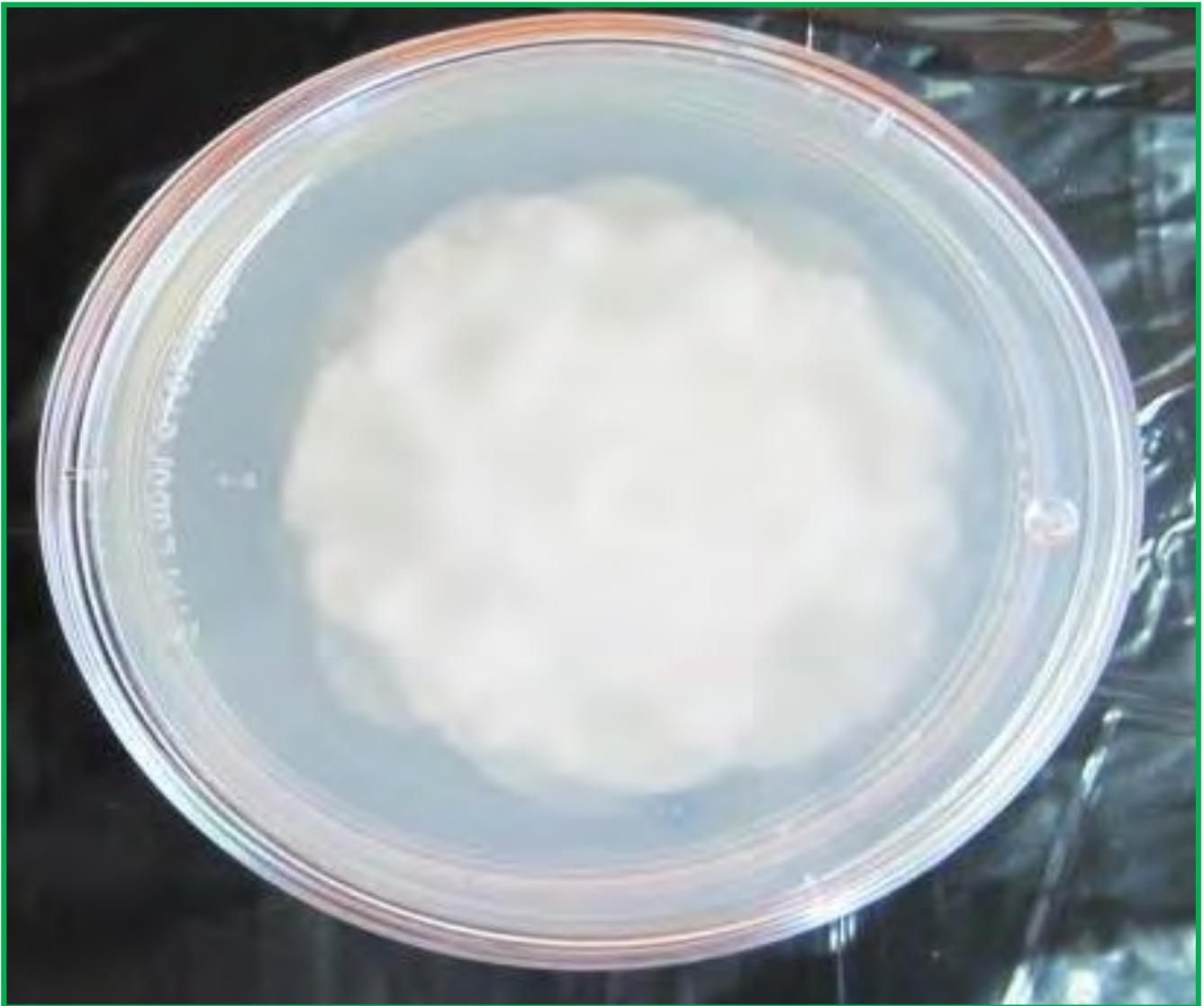


Imagen 9: Fotografía de crecimiento en PDA *P. capsici* anverso, 5 días después de su inoculación.

Reverso: No presenta pigmentos.

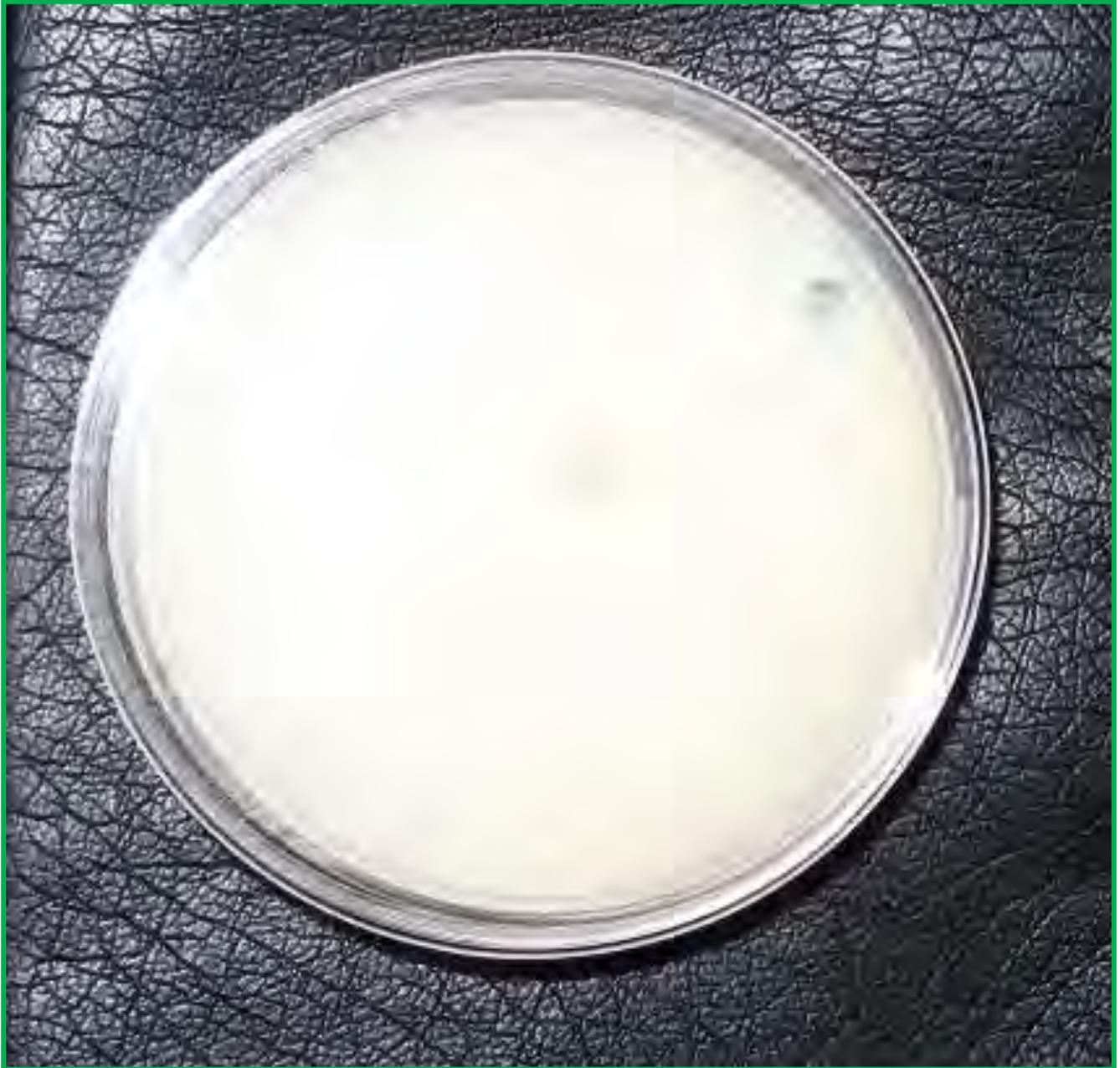


Imagen 10: Fotografía de crecimiento en PDA *P. capsici* reverso, 5 días después de su inoculación.

Microscopia

Hifas macrosifonadas, cenocíticas, hialinas. Con presencia de esporangios hialinos, de forma ovalada.



Imagen 11: Fotografía *P. capsici* vista al microscopio objetivo 40X. Hifas hialinas y macrosifonadas, esporangio de forma oval.

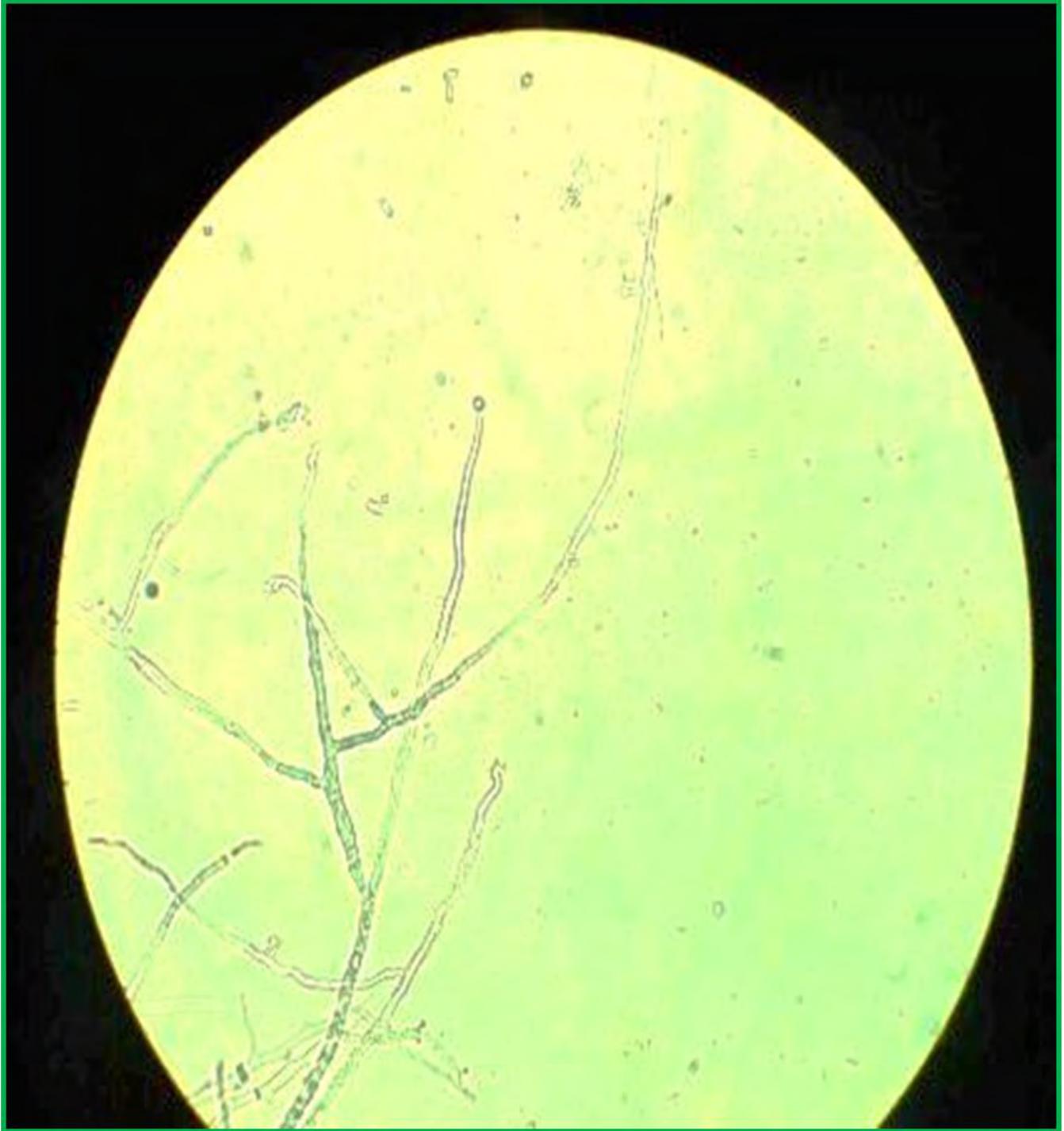


Imagen 12: Fotografía *P. capsici* vista al microscopio objetivo 40X. Hifas hialinas y macrosifonadas.

Caracterización macroscópica y microscópica en medio V8

Macroscopía

Anverso: Crecimiento abundante, micelio color blanco, de aspecto veloso-seca.

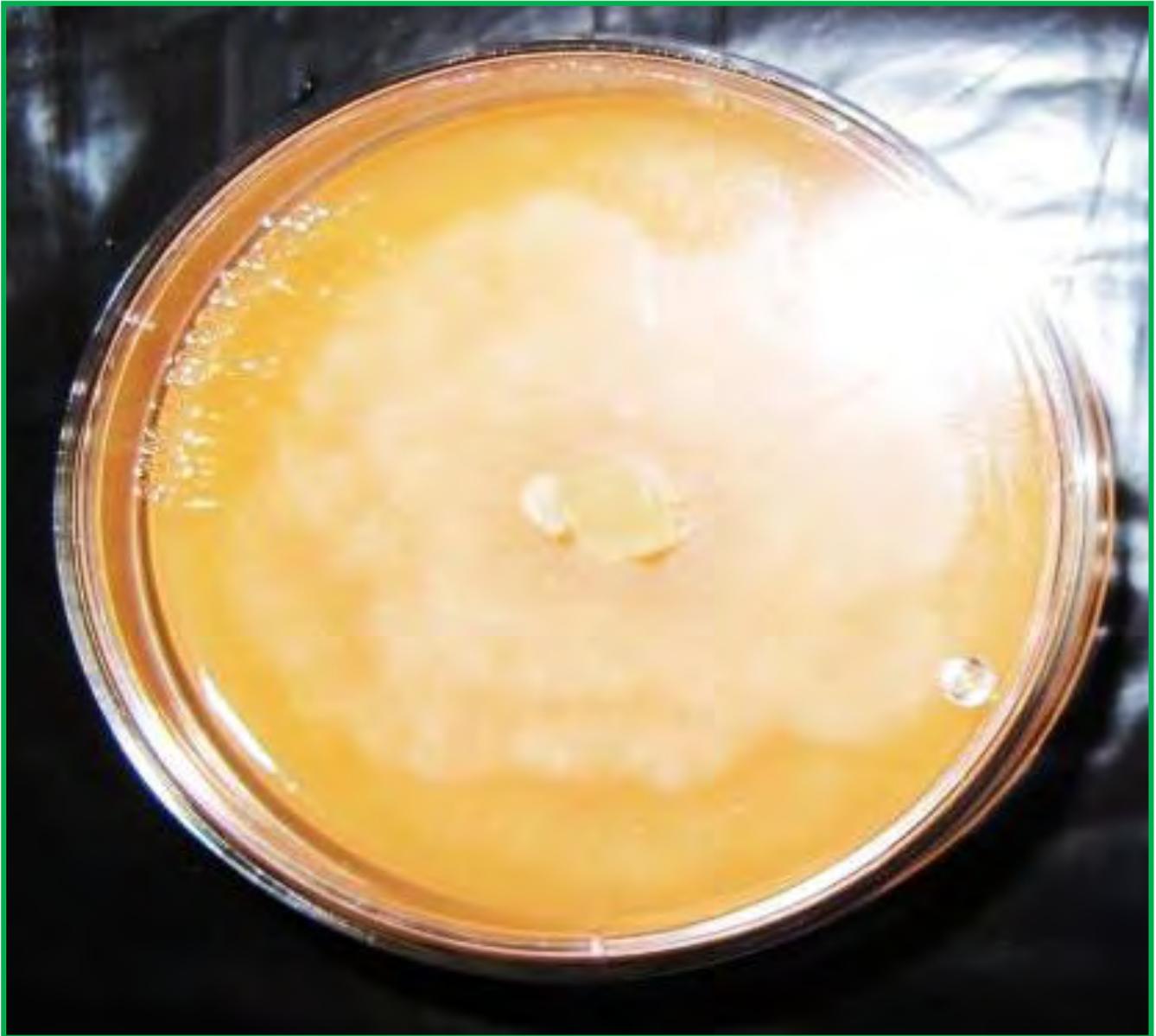


Imagen 13: Fotografía de crecimiento en V8 *P. capsici* anverso, 5 días después de su inoculación.

Reverso: No presenta pigmentos.



Imagen 14: Fotografía de crecimiento en V8 *P. capsici* reverso, 5 días después de su inoculación.

Microscopia

Hifas macrosifonadas, cenocíticas, hialinas. Con presencia de esporangios hialinos, de forma ovalada.

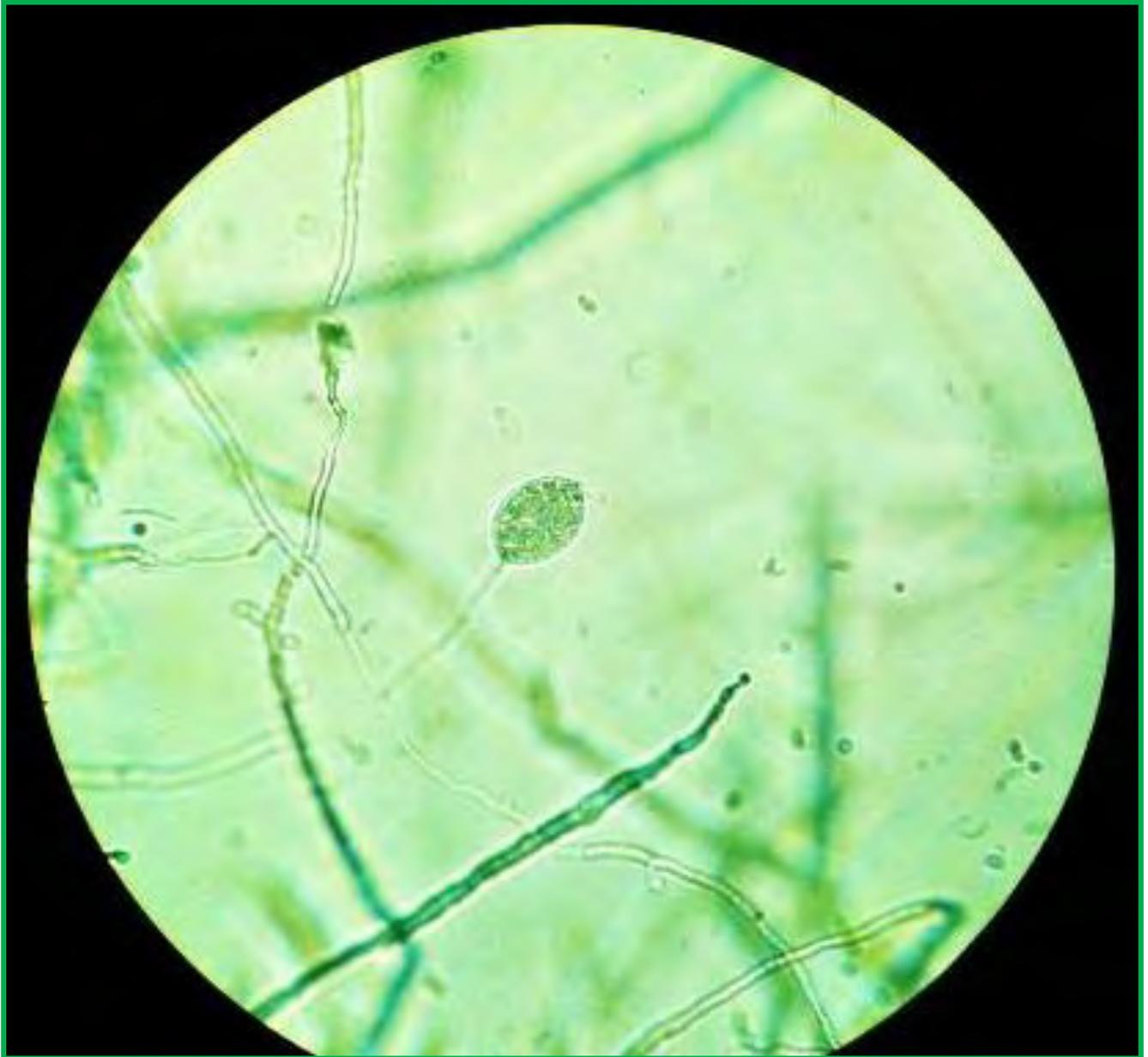


Imagen 15: Fotografía *P. capsici* vista al microscopio objetivo 40X. Hifas hialinas, macrosifonadas, esporangio de forma oval.

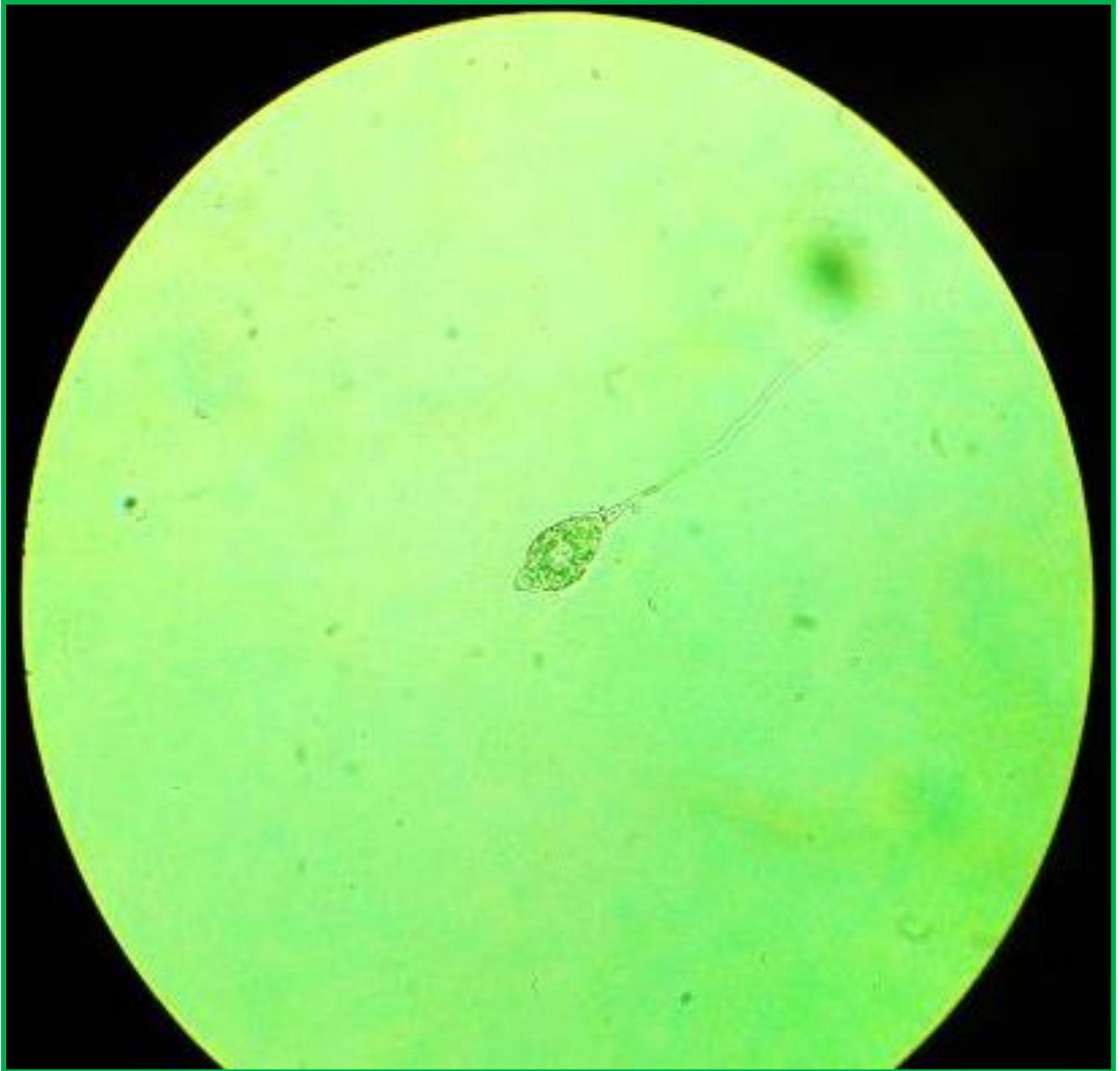


Imagen 16: Fotografía *P. capsici* vista al microscopio objetivo de 40X. Hifa hialinas y macrosifonada, esporangio de forma oval.

Identificación molecular

La caracterización anterior solo nos permite llegar a la identificación de género, obteniendo que la cepa aislada corresponde al género *Phytophthora*, sin embargo es de interés conocer la especie, por lo que se mandó a identificar mediante secuenciación al laboratorio de fitopatología del CIAD, donde se utilizaron los primers específicos para *P. capsici*, el DNA extraído del aislamiento (Phy-11), produjo en la reacción de PCR el producto esperado de aprox. 219 pares de bases **(Imagen 17)**.

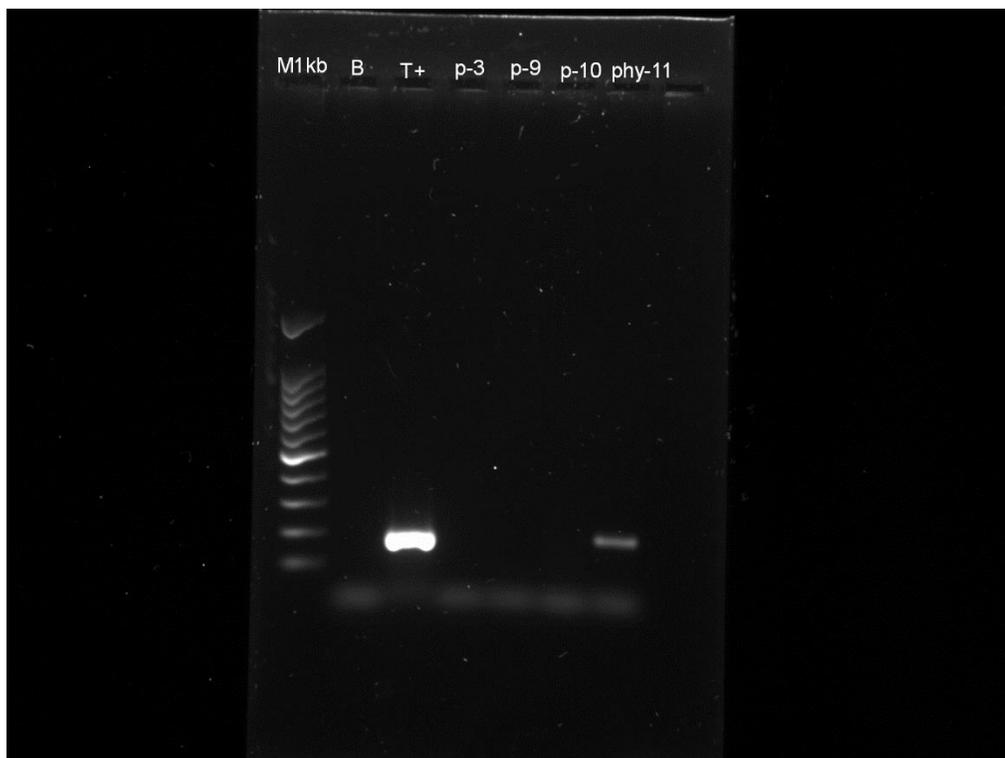


Imagen 17. Producto amplificado con los primers específicos PC-3 y PC-6R. Carril 1 Marcador molecular, carril 2= blanco, Carril 3= *P. capsici* control positivo, carriles 4.6= P3, P9, P10 aislamientos de *Pythium sp.*, carril 7= Aislado Phy-11.

El ADN amplificado de la cepa Phy-11, mediante los primers ITS4-ITS6, se envió al laboratorio LANGEBIO-Cinvestav para su secuenciación y se obtuvo una secuencia de 833 pares de bases que comprendieron la región ITS:

Secuencia obtenida, aislamiento Phy 11 región ITS

```
GGAAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACA  
CCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTCTTGTACCCTATC  
ATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCCGGGCGAGTAGCTTTTTGTTTTAAACCATTTCTCAAT  
TCCTAATGTACTGGGGGGACCAAAGTCTCTGGCTTTAACTAGATAGCCAATTTCAAGCCTA  
GAGTCTAGGGTTGCAAATTGCTGAAAAACGCTTAGCACAGACATTCGTCATGGCAAATGA  
AGAATTAGTGAGTCGCCTTAAATTTGAACGCATAATGCACCTTCCCGGATAGTCCCTGGG  
AAGAAGGCTGGAGGCATGGTCACGGTGAAGAATGGGGCAGAATGGTAAGTGTCTTGGGT  
GTTGTCCTTCAAGTCGACTGCAATTCCTTTTAATGTAAGTGAAGTGGAACTTTCCCTATGCTC  
GAAAGCCTAATGTTGCTGGATGAGGAGGCTGCCTGCCTGGACAAGTCCGCCGACCGGAT  
TGACTGCTTGCGGGCGTTTAAAGGGAGGAGTGATCCAAGTCCCCGGTATGGATTGGCCT  
TCAGCCTGAACAAGCTCGCTTATTGCAATGCAATTTTCTGGCTTGTAGACCTGAAAGAGT  
CGGGGTGGAACCCGTAACCTTGTGGTTTATATGCGCCACAAAGGAGATGTGGGAGGGCC  
CTTTGGACTGTGCCTCAAAGGGGTCGCAACACCCACATTGGTGGTGCCGCGACTCT  
CGCTATATTTGTGCATCGCGCGGAATATTTCTCTCTGCGAGAGATTACCGAT
```

Adquirida la secuencia se comparó en la base de datos de NCBI, identificando al Oomyceto aislado como *P. capsici* (**Imagen 18**).

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



Alignments

Download v GenBank Graphics

Phytophthora capsici 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolated in Kerala, India
 Sequence ID: [gmb|AM42703.1](#) Length: 864 Number of Matches: 1

Range 1:1 to 363 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
403 bits (218)	3e-108	318/366 (87%)	7/366 (1%)	Plus/Plus

```

Query 2  GAAGGTGAAGTGTAAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACC 61
          |||
Subject 1  GAAGGTGAAGTGTAAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACC 60

Query 62  TAAAAAATTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGCTTGTACCCTATCA 121
          |||
Subject 61  TAAAAAATTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGCTTGTACCCTATCA 120

Query 122  TGGCGAATGTTGGACTCGTCCGGCGAGTAGCTTTTGTAAA-CCATTCTCAA 180
          |||
Subject 121  TGGCGAATGTTGGACTCGTCCGGCGAGTAGCTTTTGTAAA-CCATTCTCAA 180

Query 181  TTCTTAATGACTGGGGGACCAAGTCTCTGGCTTAACTAGATAGCCAAATTCAGGCC 240
          |||
Subject 181  TACTGATTAACGTGGGACCAAGTCTCTGGCTTAACTAGATAGCCAAATTCAGGCC 239

Query 241  -TAGA-GTCTAGGGTTCGAATTGCTGAAAAGCCTTAGCAGAGCATTCGTCTATGGCAA 298
          |||
Subject 240  GTGGATGCTAGGCTCCACATCGATGAAAGGCTGCGAACTGCGATAGTATGCGCAA 299

Query 299  ATGAGCAATTAAGTGGCTTAAATTTGAAACGCAATAGCACCCTCCGGATAGTCC 357
          |||
Subject 300  TTGAGGATTCAGTGAATGATCGAAAATTTGAAACGCAATAGCACCCTCCGGATAGTCC 358

Query 358  CTGGGA 363
          |||
Subject 359  -TGGGA 363
    
```

Imagen 18: Comparación de secuencia ITS de aislamiento Phy-11 en la base de datos de NCBI

Al ser este fitopatógeno el que se encontraba presente en suelo (damping-off), se evaluó su virulencia en plantas susceptibles de tomate y pimiento, y dependiendo del resultado emplearlo como patógeno en plántulas de Chile picoso para evaluar la resistencia o susceptibilidad que estas pueden presentar.

Inoculación de *P. capsici* en plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y pimiento (*Capsicum annuum*).

El experimento se llevó a cabo en plántulas de tomate y pimiento, a diferentes concentraciones de zoosporas (500 zoosporas/mL, 1,000 zoosporas/mL, 5,000 zoosporas/mL, 10,000 zoosporas/mL y 50,000 zoosporas/mL) en plántulas de tomate variedad IMAD y pimiento variedad STEPHANIA. El ensayo consistió en tomar 50 testigos (control) y 50 sujetos experimentales.

Se tomó una alícuota del stock de zoosporas preparado previamente, estas se contaron en la cámara de Neubauer utilizando para ello los 4 cuadrantes (**Imagen 19, cuadros marcados de color azul**). Este procedimiento se realizó 6 veces tomando la alícuota del mismo stock.

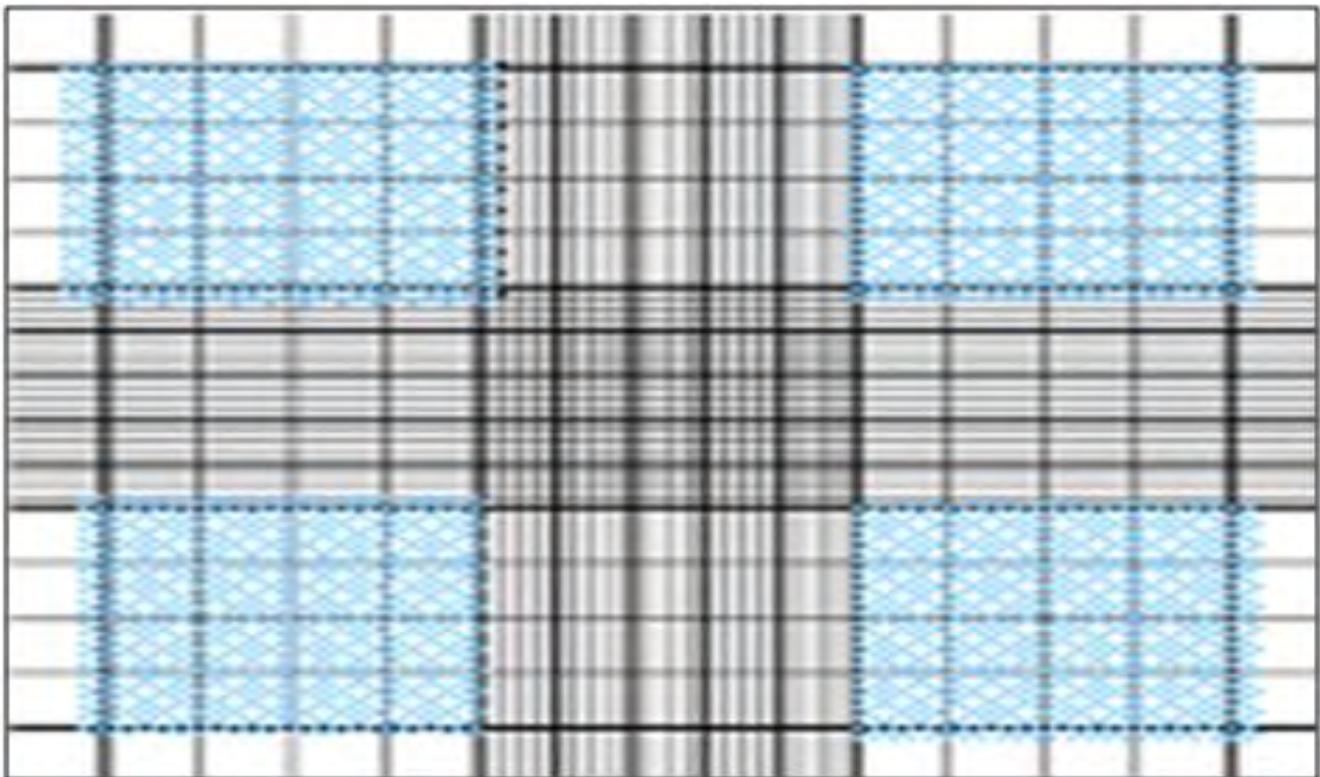


Imagen 19: Detalle de la división en cuadrantes de la cámara de Neubauer.

Datos:

Tabla 4: Número de zoosporas contadas por cuadrante en cámara de Neubauer.
X=Promedio del conteo. R=Repetición, C=Cuadrante.

Repetición	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	X
R ₁	10	11	13	10	11
R ₂	6	7	10	5	7
R ₃	15	8	6	11	10
R ₄	4	10	5	6	6.25
R ₅	5	8	10	7	7.5
R ₆	9	10	7	6	8

Promedio de zoosporas por repetición:

$$\frac{(11+7+10+6.25+7.5+8)}{6} = 8.29 \text{ zoosporas.}$$

Cálculo de zoosporas por mL de solución:

$$8.29 \times 10,000 = 82900 \text{ zoosporas/mL}$$

Cálculo para el volumen donde se encuentran 10,000 zoosporas:

82,900 zoosporas \Rightarrow 1000 μ L

10,000 zoosporas \Rightarrow X=?

$$X = 120.6 \mu\text{L} = 121 \mu\text{L}$$

Se realizó el mismo procedimiento para calcular las demás concentraciones: 500 zoosporas/mL, 1000 zoosporas/mL, 5000 zoosporas/mL y 50,000 zoosporas/mL.

- ✓ 500 zoosporas/ mL se encontraban en un volumen de $6.031 \mu\text{L} = 6 \mu\text{L}$
- ✓ 1000 zoosporas/ mL se encontraban en un volumen de $12.06 \mu\text{L} = 12 \mu\text{L}$
- ✓ 5000 zoosporas/ mL se encontraban en un volumen de $60.31 \mu\text{L} = 60 \mu\text{L}$
- ✓ 10,000 zoosporas/ mL se encontraban en un volumen de $120.63 \mu\text{L} = 121 \mu\text{L}$
- ✓ 50,000 zoosporas/ mL se encontraban en un volumen de $603.12 \mu\text{L} = 603 \mu\text{L}$

Una vez preparadas las diferentes soluciones de esporas, se llevó a cabo la inoculación de las plántulas experimentales (inoculadas con suspensión de zoosporas) y las plántulas control (inoculadas con agua).

Los signos de la enfermedad se hicieron presentes a los tres días de la inoculación, en las 5 concentraciones empleadas **(imágenes 20, 21, 22 y 23)**.

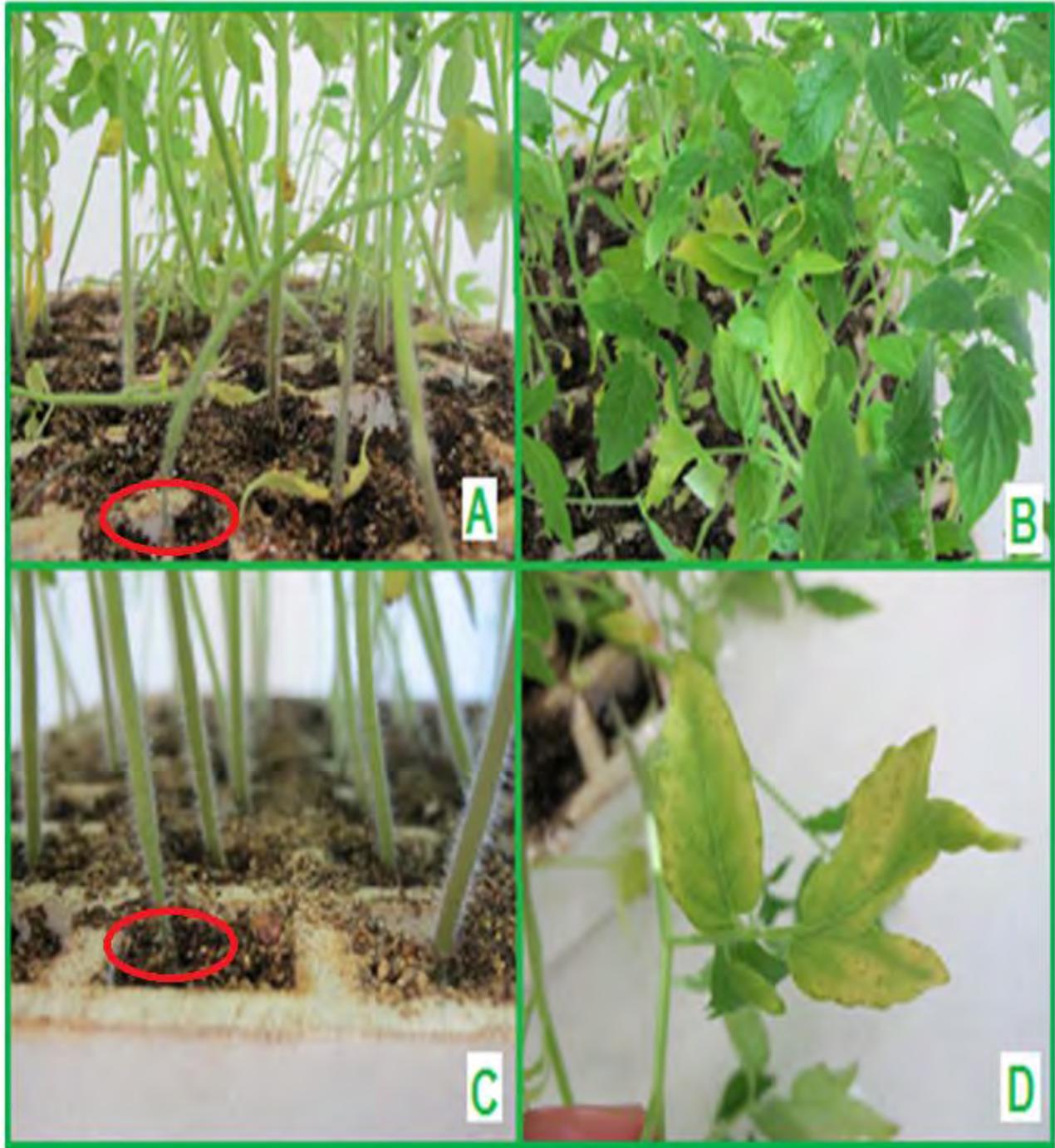


Imagen 20: Plántulas de tomate IMAD enfermas, **A)** y **C)** Presentan ahorcamiento en tallo, señalada la parte afectada con una circulo, **B)** y **D)** muestran amarillamiento en la zona foliar.

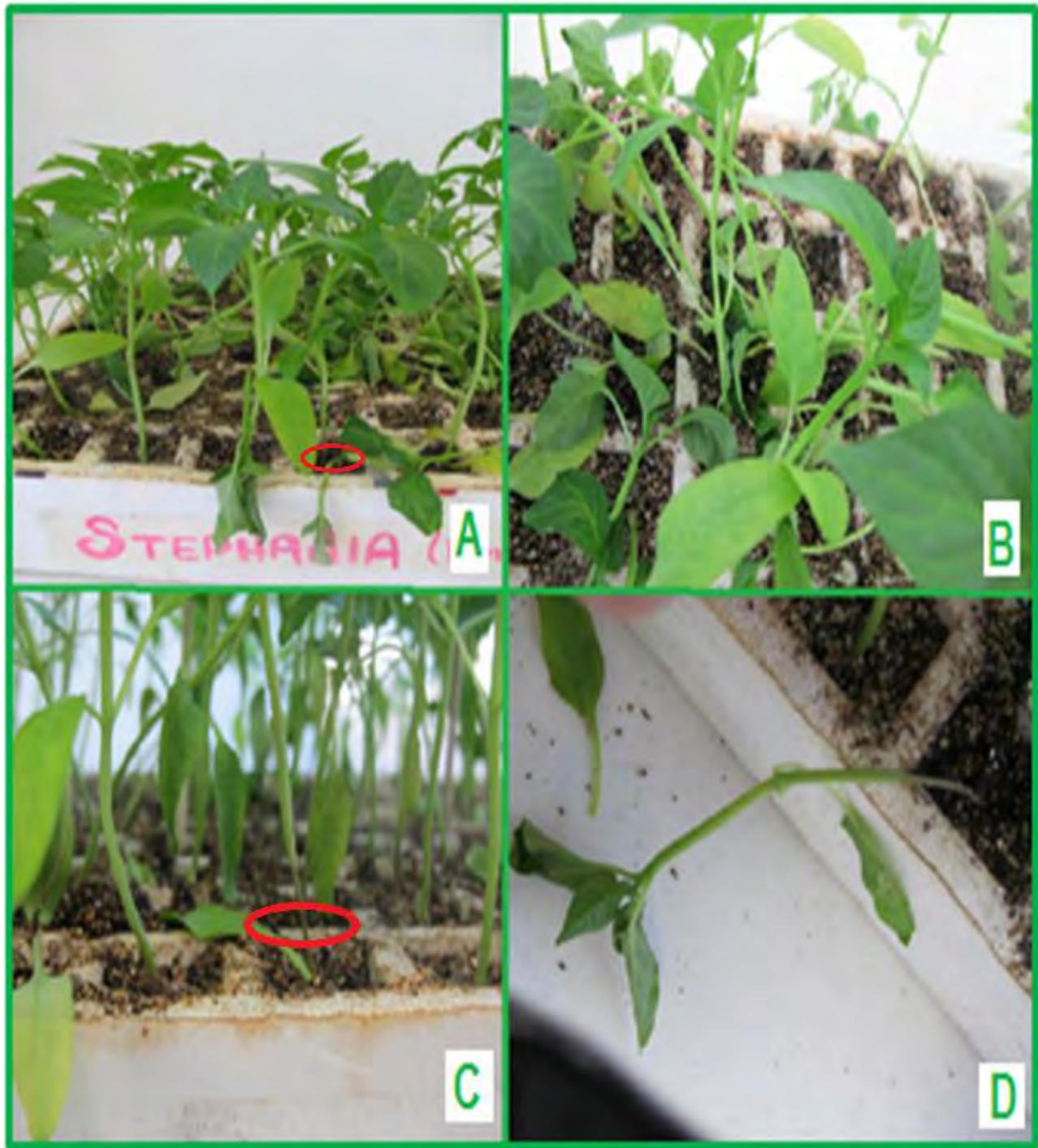


Imagen 21: Plántulas de pimiento STEPHANIA enfermas, **A)** y **C)** Muestran ahorcamiento en el tallo, señalada la parte afectada con un círculo, **B)** Amarillamiento en foliar y **D)** Marchitez.



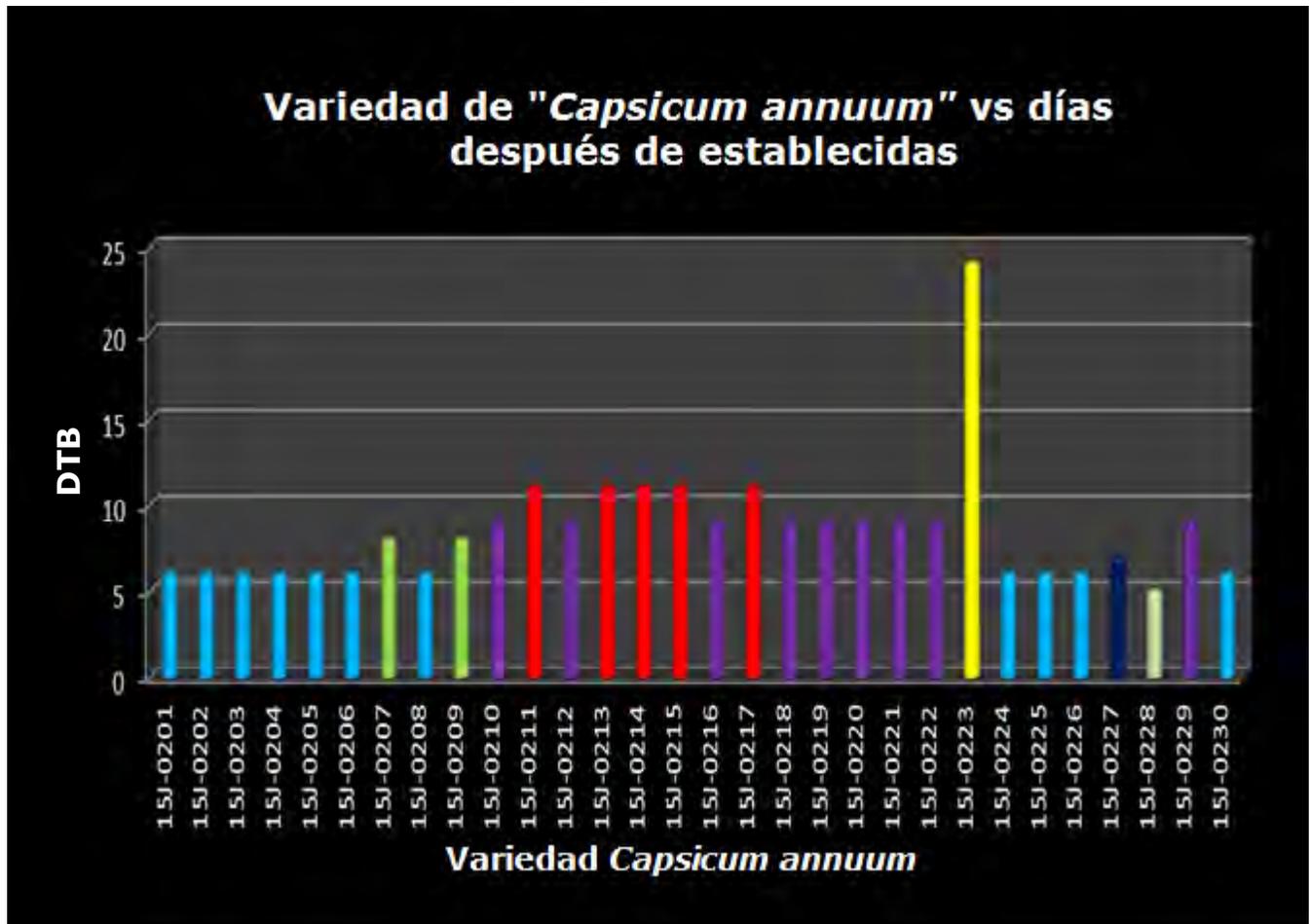
Imagen 22: Charola con cultivo de pimiento STEPHANIA (izquierda) y tomate IMAD (derecha). Toma aérea de la zona foliar (imagen superior).



Imagen 23: Charola con cultivo de pimiento STEPHANIA a la izquierda y tomate IMAD a la derecha, con signos característicos de marchitez. Toma aérea de la zona foliar (imagen superior).

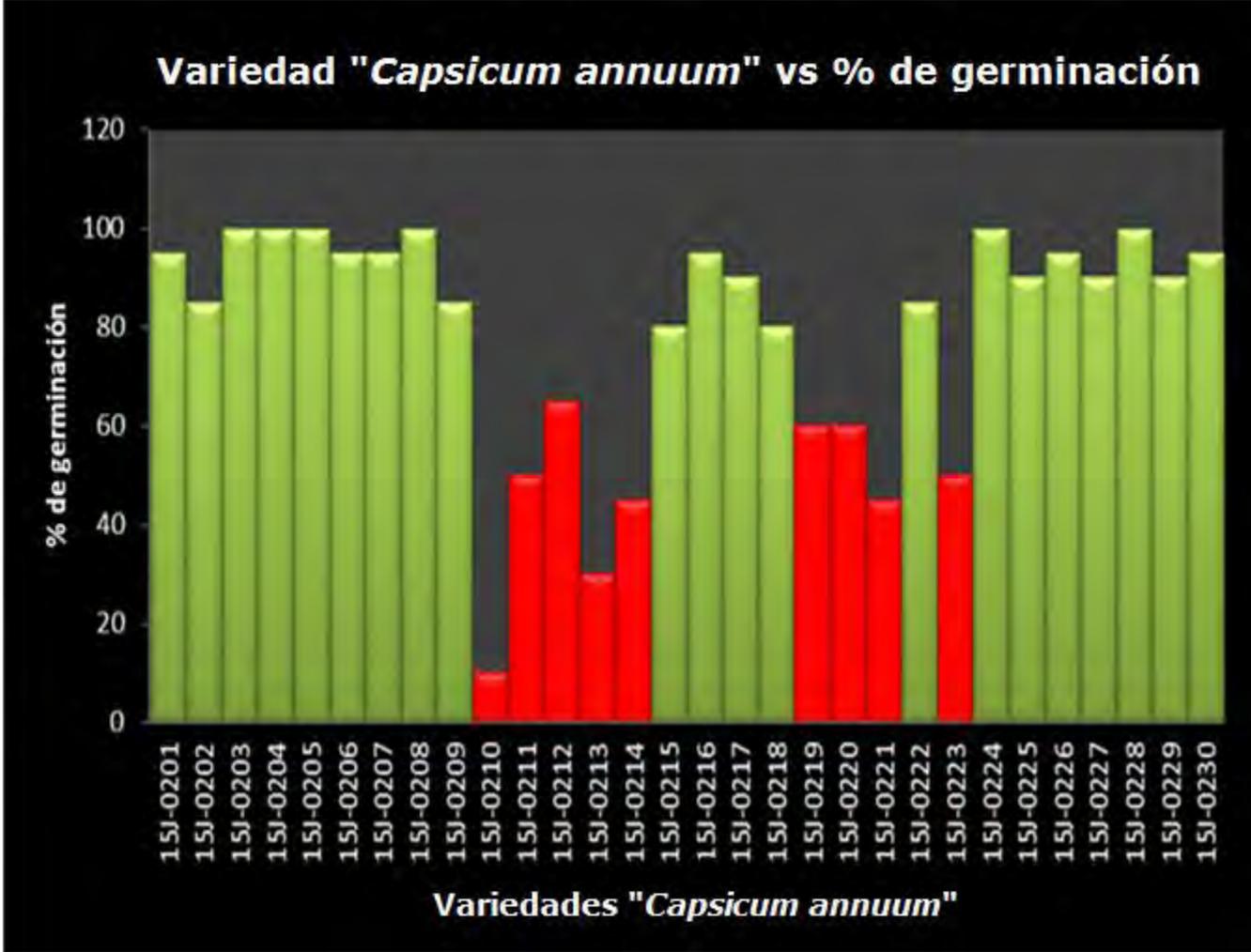
Germinación de 30 variedades de Chile picoso (*Capsicum annuum*).

Se germinaron 30 variedades de *Capsicum annuum*, registrando en tablas la fecha de brote de la plántula, así como los días transcurridos hasta el día de su brote (**Anexo D**), graficando de esta forma los datos obtenidos:



Grafica 1: Variedad de semilla "*Capsicum annuum*" vs DTB (días transcurridos hasta el día de su brote).

Otros datos que se recopilaron son el número de plantas que brotaron para calcular el % de germinación (**Anexo E**), realizando a través de estos datos la gráfica 2:



Grafica 2: Variedad de semilla “*Capsicum annum*” vs % de germinación, barras de color verde muestran el porcentaje de germinación aceptable 80% y en rojo el porcentaje de germinación no aceptable menor al 80%.

Inoculación de *P. capsici* en 30 variedades de *Capsicum annum*.

Se llevó a cabo la inoculación de *P. capsici* en 30 variedades de chile, tomando 10 testigos y 10 sujetos experimentales en el caso de variedades que presentaron el 100% de germinación y en los que se obtuvo un menor porcentaje se tomaron las hileras con presencia de mayor número de plántulas como experimentales y las otras como testigo, una hora antes se les regó para después llevar a cabo la inoculación con 10,000/mL de zoosporas.

Se contaron las zoosporas en los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

Datos:

Tabla 5: Número de zoosporas contadas por cuadrante en cámara de Neubauer. X=Promedio del conteo, R=Repetición, C=Cuadrante.

Repetición	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	X
R ₁	5	9	14	9	9,25
R ₂	9	11	9	10	9,75
R ₃	5	8	7	6	6,5
R ₄	5	7	6	15	8,25
R ₅	9	11	8	7	8,75
R ₆	11	5	16	5	9,25

Promedio de zoosporas por repetición:

$$\frac{(9.25+9.75+6.5+8.25+8.75+9.25)}{6} = 8.625 \text{ zoosporas.}$$

Cálculo de zoosporas por mL de solución:

$$8.265 \times 10,000 = 86250 \text{ zoosporas/mL}$$

Cálculo para el volumen donde se encuentran 10,000 zoosporas:

$$\begin{array}{l} 86,250 \text{ zoosporas} \Rightarrow 1000 \mu\text{L} \\ 10,000 \text{ zoosporas} \Rightarrow X=? \end{array} \quad X = 115.9 \mu\text{L} = 116 \mu\text{L}$$

Obtenidos los datos anteriores la inoculación se hizo esparciendo un volumen de 116 μL de la suspensión de zoosporas obtenidas a las plántulas experimentales, y 116 μL de agua estéril a los testigos.

Se esperó a que las plántulas presentaran signos dentro de la primera semana, lo cual no fue así, por lo que se tuvo que hacer una segunda inoculación 8 días después de la primera, de la misma manera que la primera vez.

Datos:

Tabla 6: Número de zoosporas contadas por cuadrante en cámara de Neubauer. X=Promedio del conteo, R=Repetición, C=Cuadrante.

Repetición	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	X
R ₁	1	2	1	1	1.25
R ₂	2	0	1	1	1
R ₃	1	1	1	0	0.75
R ₄	2	1	1	1	1.25
R ₅	1	1	1	1	1
R ₆	0	1	1	1	0.75

Promedio de zoosporas por repetición:

$$\frac{(1.25+1+0.75+1.25+1+0.75)}{6} = 1 \text{ zoospora.}$$

Cálculo de zoosporas por mL de solución:

$$1 \times 10,000 = 10,000 \text{ zoosporas/mL}$$

Obtenida la concentración de zoosporas por mL se realizó la inoculación esparciendo un volumen = 1 mL de la suspensión a las plántulas experimentales, y 1 mL de agua estéril a los testigos.

De esta manera algunas variedades empezaron a presentar signos después de los dos días de la inoculación o hasta los 7 días, tabla 12-41.

Tabla 7: Variedad 15J-0201, con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0201	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
7mo día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Tabla 8: Variedad 15J-0202 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0202	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	xx	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	xxx	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	xxxx	√	√	xx	√	xx
4to día	xx	xx	xx	xxxx	xx	xx	xxx	xx	xx
5to día	xx	xx	xx	xxxx	xx	xx	xxx	xxx	xxx
6to día	xxx	xxx	xxx	xxxx	xxx	xxx	xxxx	xxx	xxxx
7mo día	xxx	xxx	xxx	xxxx	xxx	xxx	xxxx	xxx	xxxx

Tabla 9: Variedad 15J-0203 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0203	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
7mo día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Tabla 10: Variedad 15J-0204 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0204	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	√	√	x	x	√	√	xx	√	√
7mo día	√	xx	√	xx	xx	x	√	xxx	x	√

Tabla 11: Variedad 15J-0205 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0205	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
7mo día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Tabla 12: Variedad 15J-0206 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0206	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	xx	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	xxx	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	xxx	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	xxxx	xxx								
7mo día	xxxx	xxx								

Tabla 13: Variedad 15J-0207 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0207	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	xx	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	xx	√	√	√	xx
5to día	√	√	√	√	√	xxx	√	√	√	xxx
6to día	xxx	xxx	xxx	√	xxx	xxxx	xxx	xxx	xxx	xxxx
7mo día	xxxx	xxx	xxxx	√	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xxxx

Tabla 14: Variedad 15J-0208 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0208	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
7mo día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Tabla 15: Variedad 15J-0209 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0209	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	√	x	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	xx	√	√	√	√
3er día	√	√	x	√	xxx	√	√	√	√
4to día	√	√	xxx	√	xxx	√	√	√	√
5to día	√	√	xxx	√	xxx	√	√	√	√
6to día	x	xx	xxxx	xx	xxxx	xxx	xx	xx	xx
7mo día	x	xx	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx

Tabla 16: Variedad 15J-0210 con 1 sujeto experimental. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0210	1
1er día	√
2do día	√
3er día	√
4to día	√
5to día	√
6to día	x
7mo día	xx

Tabla 17: Variedad 15J-0211 con 7 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0211	1	2	3	4	5	6	7
1er día	√	√	√	√	x	√	√
2do día	√	√	√	xx	xxx	xx	√
3er día	√	√	√	xxx	xxxx	xxx	√
4to día	√	√	√	xxx	xxxx	xxx	√
5to día	√	xx	xxx	xxx	xxxx	xxxx	xx
6to día	xx	xxx	xxxx	xxx	xxxx	xxxx	xxx
7mo día	xx	xxx	xxxx	xxx	xxxx	xxxx	xxxx

Tabla 18: Variedad 15J-0212 con 6 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0212	1	2	3	4	5	6
1er día	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√
3er día	x	x	x	√	√	x
4to día	x	x	x	√	√	x
5to día	xx	xx	xx	√	√	xx
6to día	xxx	xxx	xxx	xx	x	xxx
7mo día	xxxx	xxx	xxx	xx	xx	xxx

Tabla 19: Variedad 15J-0213 con 3 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0213	1	2	3
1er día	√	√	x
2do día	√	xx	xxx
3er día	√	xxx	xxxx
4to día	√	xxx	xxxx
5to día	√	xxxx	xxxx
6to día	x	xxxx	xxxx
7mo día	xxx	xxxx	xxxx

Tabla 20: Variedad 15J-0214 con 5 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0214	1	2	3	4	5
1er día	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√
4to día	√	√	xx	√	√
5to día	√	√	xxx	√	√
6to día	xx	xx	xxxx	xx	xx
7mo día	xx	xx	xxxx	xxx	xx

Tabla 21: Variedad 15J-0215 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0215	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	xx	√	xx	xx
6to día	x	√	xx	xx	√	xxx	√	xxx	xxx
7mo día	xx	√	xxx	xx	√	xxx	√	xxx	xxx

Tabla 22: Variedad 15J-0216 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0216	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	xx	√	√
6to día	x	xx	x	x	√	√	xxx	xx	xx
7mo día	x	xxx	xx	xx	√	√	xxx	xxx	xxx

Tabla 23: Variedad 15J-0217 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta

15J-0217	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	x	√	√	√	√	√	√	x	x
4to día	x	√	√	√	√	√	√	x	x
5to día	xx	√	√	√	√	√	√	xx	xx
6to día	xxx	√	x	xx	xx	xx	xx	xxx	xx
7mo día	xxx	√	x	xx	xx	xx	xx	xxxx	xxx

Tabla 24: Variedad 15J-0218 con 8 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0218	1	2	3	4	5	6	7	8
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	xx	√	√	xxx
4to día	√	√	√	√	xx	√	√	xxx
5to día	√	√	√	√	xxx	√	√	xxxx
6to día	√	√	√	xxx	xxxx	xxx	√	xxxx
7mo día	√	√	√	xxxx	xxxx	xxx	√	xxxx

Tabla 25: Variedad 15J-0219 con 5 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0219	1	2	3	4	5
1er día	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√
6to día	xx	√	xx	xx	xx
7mo día	xx	x	xxx	xxx	xxx

Tabla 26: Variedad 15J-0220 con 6 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0220	1	2	3	4	5	6
1er día	√	√	√	√	x	√
2do día	√	√	√	√	x	√
3er día	√	√	√	√	xx	√
4to día	√	√	xx	√	xxx	√
5to día	xx	xx	xxx	xx	xxx	xx
6to día	xxx	xxx	xxxx	xxx	xxxx	xxx
7mo día	xxx	xxx	xxxx	xxx	xxxx	xxx

Tabla 27: Variedad 15J-0221 con 5 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0221	1	2	3	4	5
1er día	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√
3er día	x	√	√	√	√
4to día	xx	√	√	√	√
5to día	xx	xx	xx	√	√
6to día	xxx	xxx	xxx	xx	√
7mo día	xxx	xxx	xxx	xxx	√

Tabla 28: Variedad 15J-0222 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0222	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	xxx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
7mo día	√	xxx	xx	xx	xx	xxx	xxx	xx	xx

Tabla 29: Variedad 15J-0223 con 7 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0223	1	2	3	4	5	6	7
1er día	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√
3er día	xxx	x	x	xxx	xxx	x	x
4to día	xxx	xx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx
5to día	xxxx	xxxx	xxx	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx
6to día	xxxx						
7mo día	xxxx						

Tabla 30: Variedad 15J-0224 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0224	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
6to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
7mo día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Tabla 31: Variedad 15J-0225 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0225	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4to día	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
5to día	xx	xxx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
6to día	xxx	xxxx	xxx	xx						
7mo día	xxx	xxxx	xxx	xx						

Tabla 32: Variedad 15J-0226 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0226	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	xx									
4to día	xx									
5to día	xxx									
6to día	xxx									
7mo día	xxxx									

Tabla 33: Variedad 15J-0227 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0227	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	x	√	√	√	xxx	√	xx	√	√	xx
4to día	xx	√	x	√	xxx	√	xx	xx	xx	xxx
5to día	xxx	xx	xx	xx	xxx	√	xx	xxx	xxx	xxx
6to día	xxxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	xxxx	xxxx	xxxx
7mo día	xxxx	xxx	xxxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxxx	xxxx	xxxx

Tabla 34: Variedad 15J-0228 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0228	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	xx	xx	√	√	√	√
5to día	xx	xx	xx	xx	xxx	xxx	xx	xx	xx	xx
6to día	xxx	xxx	xxx	xxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xxx	xxx
7mo día	xxx	xxx	xxx	xxx	xxxx	xxxx	xxx	xxx	xxx	xxx

Tabla 35: Variedad 15J-0229 con 9 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta

15J-0229	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3er día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4to día	√	√	√	√	√	√	√	√	√
5to día	xxx	√	xxx	xxx	√	√	√	√	√
6to día	xxxx	xxx	xxxx	xxxx	xx	xxx	xx	xx	xxx
7mo día	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx	xx	xxxx	xxx	xxx	xxxx

Tabla 36: Variedad 15J-0230 con 10 sujetos experimentales. Presencia de síntomas en plántulas al 1er, 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo día después de la inoculación. √= Sanas, x= Lesiones pequeñas, xx= Lesiones evidentes en tallo, xxx= Lesiones presentes en tallo, hojas amarillas y xxxx= Planta muerta.

15J-0230	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1er día	√	√	√	√	√	√	√	√	x	√
2do día	√	√	√	√	√	√	√	√	xx	√
3er día	xx	xx	√	xx	√	√	√	√	xxx	√
4to día	xxx	xxx	√	xxx	√	√	√	√	xxx	√
5to día	xxx									
6to día	xxxx									
7mo día	xxxx									

Durante el experimento las variedades **15J-0201, 15J-0203 y 15J-0219**, se presentó una plaga, la cual provocó un amarillamiento en las hojas hasta su deshojamiento.

Se tomaron muestras donde se encontraba presente la plaga, identificándola como ***Tetranychus sp.*** (**Imagen 24**)

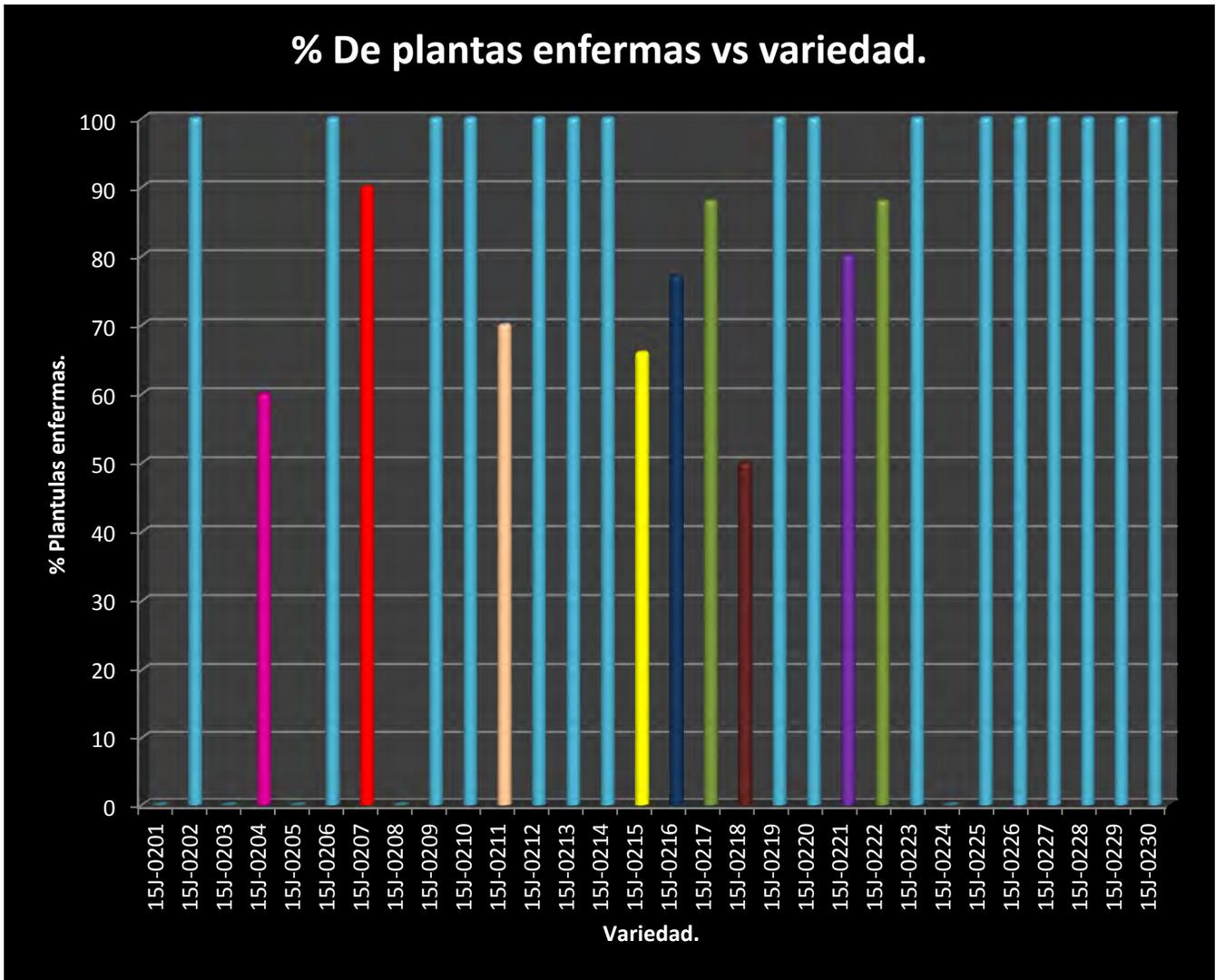


Imagen 24: *Tetranychus sp.* causante del des-hojamiento en las variedades 15J-0201, 15-J0203 y 15J-0219.

Porcentaje de plantas que presentaron la enfermedad.

Tabla 37: Datos de % de plantas que presentaron la enfermedad por variedad. En amarillo se muestran las variedades resistentes al ataque.

Variedad	% de plantas enfermas	Variedad	% de plantas enfermas
15J-0201	0	15J-0216	77
15J-0202	100	15J-0217	88
15J-0203	0	15J-0218	50
15J-0204	60	15J-0219	100
15J-0205	0	15J-0220	100
15J-0206	100	15J-0221	80
15J-0207	90	15J-0222	88
15J-0208	0	15J-0223	100
15J-0209	100	15J-0224	0
15J-0210	100	15J-0225	100
15J-0211	70	15J-0226	100
15J-0212	100	15J-0227	100
15J-0213	100	15J-0228	100
15J-0214	100	15J-0229	100
15J-0215	66	15J-0230	100



Grafica 3: Porcentaje de plantas enfermas vs variedad de “*C. annuum*”. Barras azules muestran las plántulas que fueron susceptibles en un 100% a *P. capsici*.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de *Phytophthora capsici*

El aislamiento de *P. capsici* se realizó con muestras de suelo donde la incidencia de la enfermedad fuera alta, así como la manifestación de esta afección en cultivos de *Capsicum annuum*, con el fin de encontrar a este fitopatógeno y aislar una cepa virulenta.

Este procedimiento se realizó en medios de cultivo que favorecieran su crecimiento, como el agar papa dextrosa y el agar jugo de verduras V8, los cuales fueron suplementados con cloranfenicol para evitar el crecimiento bacteriano. A las colonias que cumplieran con las características macroscópicas de *Phytophthora*, se les realizó un examen directo para verificar si sus estructuras correspondían al Oomyceto por lo que una vez identificadas se seleccionaron los cultivos que no presentaran contaminación bacteriana con el fin de beneficiar el crecimiento del Oomyceto.

Aisladas las cepas se realizó la caracterización macro y microscópica en los dos medios de cultivo (V8 y PDA), encontrando que en general presentaron crecimiento ilimitado, marcadamente radiado, de color blanca de aspecto vellosa-seca, al reverso sin la difusión o presencia de pigmentos. Su micromorfología se caracterizó por hifas cenocíticas, hialinas y ramificadas, con la presencia de estructuras especializadas como esporangios de forma ovalada, hialinos y papilados, cabe resaltar que para visualizar estas estructuras fue de importancia la adición de agua he incubar la colonia al menos por 5 días.

Se logró visualizar la liberación de zoosporas y el nado de las mismas en el medio acuoso en el que se encontraban. Con los resultados morfológicos se podía tener certeza de que el microorganismo presente se trataba de *Phytophthora*, sin embargo

este tipo de exámenes no nos facilitan la identificación hasta especie, por lo que fue necesario realizarle PCR para su identificación mediante la amplificación del ADN de las regiones ITS4 e ITS6 conocidos como indicadores universales⁵⁸, obtenida la secuencia, se alineo con las depositadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015), la cual reveló que coincidía con el Oomyceto *Phytophthora capsici*.

Identificado el Oomyceto como *Phytophthora capsici*, se realizaron las pruebas de virulencia a través de los postulados de Koch, utilizando plántulas de *Lycopersicon esculentum* y *Capsicum annuum*, como hospederos. Obteniendo resultados positivos, el 100% de las plántulas presentaron la enfermedad después de una semana de su inoculación, mostrando los signos característicos de la enfermedad presentes en plantas de donde se aisló el fitopatógeno, se procedió con el aislamiento de este microorganismo en plantas susceptibles, obteniendo el mismo agente causal de la enfermedad *P. capsici*.

Germinación

Las semillas de las 30 variedades de *Capsicum annuum*, en su mayoría presentaron sus primeros brotes en un periodo de entre 6-11 días después de establecidas **(tabla 38 y 39 del anexo D)** predominando el día 6, la variante 15J-0223 prolongó su tiempo de germinación notablemente a diferencia de las otras variedades, al emerger 24 días después de que se establecieron. Este dato se desvía en comparación de las demás variedades, marcando una dormancia inusual de la especie.

Otra variable evaluada, es el porcentaje de germinación de cada variedad de semillas, considerándose en este experimento un rango entre 80-90% de germinación como aceptable, comparando los resultados **(tabla 40, 41 del anexo**

E y gráfica 2), se observa que el 70% de las semillas tuvieron porcentajes de germinación aceptables, y el resto fuera de rango.

Estos resultados fuera de rango así como la dormancia de la variedad 15J-0223, nos indican que las semillas no tuvieron un almacenaje adecuado o en su transportación hasta el laboratorio, este factor es de gran importancia para que el embrión se encuentre viable dentro de la semilla, por lo que la demanda de cuidados especiales en el almacén es trascendental para garantizar la conservación de su calidad; la cual debe mantenerse durante el tiempo que permanecerán en condiciones de almacenamiento y hasta el momento en que serán utilizadas. Dentro de los factores que influyen en el deterioro de las semillas se encuentran el alto porcentaje de humedad en el ambiente, las elevadas temperaturas, una concentración dominante de impurezas mezcladas y la presencia de plagas⁵⁹.

Por lo que es de suma importancia que al momento de almacenarse las semillas deban de cumplir con estar secas, limpias, enteras, sanas y sin impurezas. Mientras que el almacenaje debe ser en bodegas secas, higiénicas y libres de plagas, donde los productos almacenados se mantengan frescos, secos y protegidos de insectos, bacterias, hongos, roedores y pájaros.

Inoculación de *P. capsici*.

Un factor primordial para la viabilidad de las zoosporas, es el tiempo de vida que tienen fuera del esporangio, el cual es de una hora. En la primera inoculación se observó que las plántulas no mostraron signos de enfermedad, un resultado que se esperaba, ya que el tiempo que transcurrió desde su liberación hasta su inoculación fue de más de una hora y media, por lo que las plántulas no presentaron ningún signo relacionado.

Con base en lo anterior, para la segunda inoculación, se redujo el tiempo transcurrido entre la liberación de las zoosporas y la inoculación, este fue de máximo treinta minutos. Obteniéndose que después de un día de su inoculación hubo variedades que presentaron indicios de afecciones en por lo menos una plántula, como lo fueron las variedades 15J-0202, 15J-0209, 15J-0211, 15J-0213, 15J-0220 y 15J-0230, indicando la susceptibilidad que tienen estas ante el patógeno, por lo que las plántulas restantes presentaron signos de enfermedad hasta llegar a la marchitez, mientras que los testigos no manifestaron la enfermedad.

Las variedades que mostraron resistencia a *Phytophthora capsici* fueron 15J-0201, 15J-0203, 15J-0205, 15J-0208 y 15J-0224 Criollo Morelos, esta última funcionando como testigo positivo. Obteniendo que el 100% de las plántulas presentaron resistencia, indicando que estas variedades son homocigotas a este gen.

Otras variedades como la 15J-0204, 15J-0207, 15J-0210, 15J-0215, 15J-0216, 15J-0217, 15J-0219, 15J-0221 y 15J-0222, presentaron tolerancia al ataque de este fitopatógeno al encontrar que las plántulas presentaron signos hasta el sexto día, y ser lesiones pequeñas o que no mostraron signos en hojas, llegando viables al séptimo día, lo que nos hace suponer que se tratan de variedades heterocigotas que expresaron una codominancia o un caso de dominancia incompleta.

Las variedades 15J-0204, 15J-0207, 15J-0215, 15J-0216, 15J-0217, 15J-0218 y 15J-0221 muestran que no todas las plántulas inoculadas presentaron síntomas ante la enfermedad causada por *P. capsici*, señalando que poseen resistencia ante el Oomyceto, por lo tanto la posibilidad de que se trate de plántulas heterocigotas que hayan logrado expresar fenotípicamente el gen de resistencia.

Para finalizar la parte experimental se tomaron las plántulas enfermas para aislar el agente causal. Corroborando de esta forma que los signos presentados fueron

causados por *P. capsici*, al encontrar este fitopatógeno en los medios de cultivo donde se aisló.

Dentro de los resultados cabe añadir que las variedades resistentes de acuerdo a lo obtenido en el experimento 15J-0201, 15J-0203 y una susceptible a la enfermedad 15J-0219 presentaron des-hojamiento, por lo que se revisaron a detalle para verificar si los signos que se presentaron fueron causados por el Oomiceto, encontrando que la causa de estos signos fue por un ácaro identificado como *Tetranychus sp.*

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento del Oomiceto *P. capsici*, presente en suelo donde se encontraron plantas con signos característicos de la enfermedad causada por este fitopatógeno. Además de caracterizarlo macroscópicamente y microscópicamente.

Una vez aislado el patógeno se aplicaron los postulados de Koch para comprobar si efectivamente el organismo aislado fue el causante del necrosamiento o ahorcamiento en tallo, así como la virulencia del mismo en plantas susceptibles.

Se identificaron 5 variedades 100% resistentes al inóculo de *P. capsici*:

- ✓ 15J-0201
- ✓ 15J-0203
- ✓ 15J-0205
- ✓ 15J-0208
- ✓ 15J-0224 Criollo Morelos.

Las cuales no presentaron signos de enfermedad, comprobando de esta manera la resistencia de estas variedades, las cuales se tenían como homocigotas para el gen de resistencia.

Las variedades susceptibles (15J-024, 15J-0207, 15J-0215, 15J-0216, 15J-0217, 15J-0218 y 15J-0221) donde hubo plantas que presentaron tolerancia al inóculo de *P. capsici*, se concluye que se tratan de plántulas heterocigotas, las cuales lograron expresar fenotípicamente el gen de resistencia, por lo que se sugiere tomar la progenie de estas y exponerlas ante el fitopatógeno para evaluar si estas presentan resistencia ante el Oomiceto al expresar el gen que les confiere dicha cualidad.

Generalizando los resultados en la **Gráfica 3**, se observa que el 83.33% de las variedades manejadas tuvieron susceptibilidad a *P. capsici*, y solo el 16.66% presentan resistencia al 100%, datos que indican la importancia de seguir en busca de generaciones que hereden este gen, el cual resulta importante para los agricultores al poder evitar la pérdida de las cosechas, además de ofrecer un porcentaje de germinación entre 95- 100%.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castro-Rocha Ar., Fernández Pavía, S. P., Osuna-Ávila P: "**Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum*-*Phytophthora capsici*.**" Rev. Mex. de Fitopatol., v-30 (1), 2012, pp. 49-65. Soc. Mex. de Fitopatol. A.C. Cd. Obregón, México.
2. Herrera, T., Ulloa, M.: "**El reino de los hongos: Micología básica y aplicada**"/**Teófilo Herrera y Miguel Ulloa**; colab. De Manuel Ruiz Oronoz., 2da edición, México; FCE, IB, UNAM, 1998.
3. Díaz-Puentes L. N., "**Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico.**" Artículo de revisión, Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 10 N° 2 (257-267). Julio-Diciembre 2012.
4. Schaechter, M.: "**Eukaryotic microbes**", 3ra Edición, Editorial ELSEVIER, 2009.
5. Agrios-George N., "**Plant pathology**", 4ta Ed., Dpto de fitopatología Univ. de Florida, editorial Academic Press.
6. Gil-Ortega R: "**Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en pimiento**", Tesis doctoral, Universidad politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología (Genética). España. 1990
7. Ramírez V. J: "**Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de la *Marchitez del chile***", Tesis para obtener el grado de M. en C., Esc. Nal. de Agricultura, Colegio de Postgraduados Chapingo, México. 1977
8. Bautista, C. J.; "**Manejo de fitopatógenos del chile (*Capsicum annum* L) con origen en el suelo**", Tesis para obtener el grado de M. en C., Colegio de Postgraduados, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Instituto de fitosanidad programa en Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Edo. de Mex. 2002
9. Tlapal-Bolaños, B., Leyva-Mir, G.: "**Manual de micología taxonómica**", Univ. Aut. Chapingo, Dpto. parasitología agrícola, 2013.

10. Gutiérrez-Ayala, H.: ***"Resistencia de 20 cultivares de chile (Capsicum annuum L) a Phytophthora capsici Leo"***, Tesis para obtener el grado de M. en Ciencias, Colegio de posgraduados, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Instituto de fitosanidad programa en Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Edo. de Mex. Nov., 2000.
11. Echemendia-Medina Y.: ***"Phytophthora: características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control."***, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Recuperado desde: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
12. González-Mendoza, D.: ***Hongos micorrizicos arbusculares en el biocontrol de la marchitez fungosa en plántulas de chile jalapeño (Capsicum annuum L.) var. "Tres lomos"***, Tesis para obtener el grado de M. en C., Colegio de posgraduados, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Instituto de recursos naturales, programa en Edafología, Montecillo, Texcoco, Edo. de Mex. 2003.
13. Álvarez-Rodríguez, B.: ***"Phytophthora nicotianae, causante del tizón y marchitez de Vinca rosea en Culiacán, Sin."***, Tesis para obtener el grado de M. en C., Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación Culiacán del CIAD en Ciencia y Tecnología de productos agrícolas de zonas Tropicales y subtropicales., Culiacán, Sin Mex., Julio 2013.
14. Avelar-Mejía J. J., ***"Intentos de control de la marchitez del chile ocasionada por el hongo Phytophthora capsici L. en la región de valsequillo, Puebla, Mex."*** Tesis para obtener el grado de M. en C., Colegio de posgraduados, Inst. de Ens. Inv. en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco, Edo. Mex. 1989.
15. Chavez-Alfaro J. J., ***"Control integrado de la marchitez del chile (Capsicum annuum L.) ocasionado por el hongo Phytophthora capsici L. en la región de Valsequillo, Pue."*** Tesis para obtener el grado de M. en C., Colegio de posgraduados, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Centro de Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Edo. de Mex. 1994.

16. Moreno-Pérez, E. C.; Avendaño-Arrazate, C. H.; Mora-Aguilar R.; Cadena-Iñiguez, J.; Aguilar-Rincón, V. H.; Aguirre-Medina J. F., "***Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (Capsicum annum L.) del centro-norte de México***", Rev. Chapingo Serie Horticultura 17(1); 23-30, 2011.
17. Madriz-Ordeñana K.: "***Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patogeno***", Manejo Integrado de plagas (Costa Rica), N° 63, p 22-32, 2002.
18. Garcia-Rodriguez, M. R., Chiquito-Almanza, E., Loeza-Lara P. D.: "***Producción de chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334, para el control de P. capsici***", Agrociencia 44:701-709-2010.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551261/pdf/nihms428878.pdf> (genoma ***P. capsici***) (consultado el lunes 27 de julio de 2015 a las 15:33 hrs)
20. http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7713/1/cuadbiod27_02.pdf consultado el 14 de Julio 2015 a las 10:40 am.
21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013895> consultado el 10 de Julio del 2015 a las 11:45
22. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/Oomycetes.aspx> consultado el 29 de Julio de 2015 a las 12:16
23. <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263128353006.pdf> consultado el jueves 02 de julio a las 15:00 hrs.
24. <http://www.monografias.com/trabajos101/enfermedades-fungosas-del-suelo-tomate/enfermedades-fungosas-del-suelo-tomate.shtml> consultado el 29 de Julio del 2015 a las 15:30 hrs.
25. <http://redepapa.org/2013/02/18/el-tizon-tardio-de-la-papa-es-mas-agresivo-en-el-africa-subsahariana/> consultado el 29 de Julio del 2015 a las 16:00 hrs.
26. <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf> consultado el 30 de Agosto del 2015 a las 18:09 hrs.

27. http://www.ipcnet.org/n/bpd/slowDecline/slowDecline_pathogen.htm
consultado el 8 de Febrero del 2016 a las 22:40 hrs.
28. <http://www.plantmanagementnetwork.org/elements/view.aspx?ID=1483>
consultado el 30 de Agosto del 2015 a las 19:40 hrs.
29. <http://panoramaagrario.com/tag/chile-jalapeno/> consultado el 3 de Dic. 2015
a las 11:00 hrs.
30. http://hydroenv.com.mx/catalogo/index.php?main_page=product_info&products_id=540 consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:00 hrs.
31. <http://www.tradewindsfruit.com/content/habanero-pastel-pepper.html>
consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:15 hrs.
32. <http://delachinampa.mx/nuevalimagen/verduras/chile-poblano-chico.html>
consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:18 hrs.
33. <http://www.ahernseeds.com/es/product-types/pimientos/page/2/> consultado
el 22 de Enero del 2016 a las 21:25 hrs.
34. http://eldiariodechihuahua.mx/El_Estado/2014-06-20/Captura-espec%C3%ADmenes-en-predio-de-CG-temen-sea-el-picudo-del-chile-/7d38ec004506cb310598d9484e9fb036 consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:32 hrs.
35. <http://www.hortalizas.com/cultivos/tomates/enemigos-naturales-de-la-mosca-blanca/> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:40 hrs.
36. <http://www.genomebiology.com/2003/4/7/221/figure/F1?highres=y>
consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:45 hrs.
37. <http://www.agrohuerto.com/bichitos-en-las-flores-trips-de-las-flores/>
consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:48 hrs.
38. https://www.google.com.mx/search?biw=1366&bih=667&noj=1&tbm=isch&sa=1&q=Aphis+gossypii&oq=Aphis+gossypii&gs_l=img.3..0I4j0i30j0i5i30j0i24I4.5334.5334.0.5625.1.1.0.0.0.0.116.116.0j1.1.0...0...1.1.64.img..0.1.115.G5LOV4YxR7o#imgrc=CiF1N1pri-2vkM%3A consultado el 22 de Enero del 2016 a las 21:54 hrs.
39. <http://insectoid.info/bugs/stink-bugs/southern-green-stink-bug/> consultado
el 22 de Enero del 2016 a las 21:57 hrs.
40. https://www.sfe.go.cr/intranet/documentos/fichas%20tecnicas/Gusano_cortador.pdf consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:09 hrs.
41. <http://www.agrohuerto.com/combatar-la-arana-roja-en-el-huerto-ecologico/>
consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:13 hrs.

42. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/vegetable_leafminer.htm consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:16 hrs.
43. <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/identification.html> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:18 hrs.
44. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SouthernBlight.aspx> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:23 hrs.
45. http://eplantdisease.blogspot.mx/2013_10_27_archive.html consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:27 hrs.
46. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoctonia.aspx> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:34 hrs.
47. <https://aslam02.wordpress.com/materi/biologi-kelas-x/protista/protista-mirip-jamur/> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:40 hrs.
48. <http://www.medical-labs.net/fusarium-species-colony-and-microscopic-description-3138/> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:47 hrs.
49. <http://www.geocities.ws/hbahadorani/A1-2-1.htm> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 22:53 hrs.
50. <http://www.prweb.com/releases/2012/9/prweb9942742.htm> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:18 hrs.
51. http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at3446/arti/guevara_y.htm consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:27 hrs.
52. http://nematode.net/NN3_frontpage.cgi?navbar_selection=home&subnav_selection=nacobbus_aberrans consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:35 hrs.
53. <http://www.ppi-bg.org/i/sn5.jpg> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:37 hrs.
54. <http://www.komodak.com/#!tobamovirus-jp/c18h1> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:42 hrs.
55. https://en.wikipedia.org/wiki/Pepper_mild_mottle_virus consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:45 hrs.
56. <http://ytpo.net/viruses/virus.php?id=252&name=Geminivirus&search=virus> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:48 hrs.
57. <http://www.mardre.com/homepage/mic/tem/samples/bio/virus/tmv2.htm> consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:55 hrs.
58. http://www.ecured.cu/Control_de_insectos,_plagas_y_virus_del_tabaco consultado el 22 de Enero del 2016 a las 23:59 hrs.
59. <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documents/fichasaapt/almacenamiento%20de%20semillas.pdf> consultado el 01 de Agosto del 2016 a las 7:00 hrs.

ANEXO A

Materiales
Asa micológica
Porta objetos
Cubre objetos
Cajas Petri
Sacabocados de 8mm de diámetro
Bisturí estéril
Campana de flujo laminar (Novatech)
Microscopio (Carl Zeiss)
Estereoscopio (Carl Zeiss)
Cámara de Neubauer
4 charolas para germinación de unicef con 200 pozos cada una.
Material biológico
Suelo (Campo)
50 semillas de tomate variedad IMAD
50 semillas de pimiento variedad STEPHANIA
20 semillas de 30 variedades diferentes de Capsicum annum
Reactivos
Jugo de verduras V8-AGAR (marca Herdez en México.)
CaCO₃
Agar (Bioxon)
Agar papa dextrosa (DIFCO)
Cloranfenicol (OFFENBACH)
Agua destilada estéril
Mechero (alcohol solido)
Reactivos

Peat moss "Mezcla N°. 3" (Sunshine)
Agua corriente
Vermiculita

ANEXO B

Agar V8

Ingredientes de la fórmula común:

Jugo V8 (marca Herdez en México) 200.0 mL

CaCO₃..... 3.0 g

Agar..... 10.0 a 20 g

Agua..... 1 litro

Preparación:

Se mezclan perfectamente todos los ingredientes y se esteriliza. La opacidad es eliminada centrifugando parcialmente el jugo o filtrándolo primero con una capa sencilla de papel filtro y luego una doble, o a través de una gasa. El jugo de verduras V8-agar es un medio en el que esporulan muchos hongos; esta fórmula básica puede ser modificada, haciendo variar la cantidad de jugo o de CaCO₃; en estos casos el pH puede variar entre 7.0 y 7.52

ANEXO C

Agar Papa Dextrosa

Marbete para la elaboración de Agar Papa Dextrosa (PDA), marca BD Difco®:

Base para cultivo de levaduras y mohos a partir de productos alimentarios y lácteos.

Cumple con las especificaciones USP/EP/JP, si procede.

Instrucciones: Suspenda 39 g del polvo en 1L de agua purificada. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para modificar la reacción a un pH de 3,5, enfríe la base a 45-50 °C y añada asépticamente una cantidad adecuada de ácido tartárico al 10% estéril por cada litro de medio. Mezcle bien. No vuelva a calentar el medio. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Fórmula aproximada* por litro

Almidón de patata (infusión)**	4,0 g
Dextrosa	20,0 g
Agar	15,0 g

*Ajusta y/o complementada en la medida necesaria para cumplir los criterios de rendimiento.

**Aproximadamente 200 g de infusión de patata.

Para uso de laboratorio • pH final: 5,6 ± 0,2

Higroscópico • Manténgase el envase bien cerrado.

ANEXO D

Tabla 38. Fecha de emergencia de las diferentes variedades de "Capsicum annum". DDE: días de emergencia después de establecida.

PLTID	Fecha de Emergencia.	DDE
15J-0201	23/04/2015	6 días
15J-0202	23/04/2015	6 días
15J-0203	23/04/2015	6 días
15J-0204	23/04/2015	6 días
15J-0205	23/04/2015	6 días
15J-0206	23/04/2015	6 días
15J-0207	25/04/2015	8 días
15J-0208	23/04/2015	6 días
15J-0209	25/04/2015	8 días
15J-0210	26/04/2015	9 días
15J-0211	28/04/2015	11 días
15J-0212	26/04/2015	9 días
15J-0213	28/04/2015	11 días
15J-0214	28/04/2015	11 días
15J-0215	28/04/2015	11 días

Tabla 39. Fecha de emergencia de las diferentes variedades de "Capsicum annum". DDE: días de emergencia después de establecida.

PLTID	Fecha de Emergencia.	DDE
15J-0216	26/04/2015	9 días
15J-0217	28/04/2015	11 días
15J-0218	26/04/2015	9 días
15J-0219	26/04/2015	9 días
15J-0220	26/04/2015	9 días
15J-0221	26/04/2015	9 días
15J-0222	26/04/2015	9 días
15J-0223	11/05/2015	24 días
15J-0224	23/04/2015	6 días
15J-0225	23/04/2015	6 días
15J-0226	23/04/2015	6 días
15J-0227	24/04/2015	7 días
15J-0228	22/04/2015	5 días
15J-0229	26/04/2015	9 días
15J-0230	23/04/2015	6 días

Anexo E

Tabla 40. Número de plantas emergidas y porcentaje de germinación de estas antes de la inoculación.

PLTID	Nº De plántulas emergidas hasta el 25 Mayo 2015	% De germinación
15J-0201	19	95
15J-0202	17	85
15J-0203	20	100
15J-0204	20	100
15J-0205	20	100
15J-0206	19	95
15J-0207	19	95
15J-0208	20	100
15J-0209	17	85
15J-0210	2	10
15J-0211	10	50
15J-0212	13	65
15J-0213	6	30
15J-0214	9	45
15J-0215	16	80

Tabla 41. Número de plantas emergidas y porcentaje de germinación de estas antes de la inoculación.

PLTID	Nº De plántulas emergidas hasta el 25 Mayo 2015	% De germinación
15J-0216	19	95
15J-0217	18	90
15J-0218	16	80
15J-0219	12	60
15J-0220	12	60
15J-0221	9	45
15J-0222	17	85
15J-0223	10	50
15J-0224	20	100
15J-0225	18	90
15J-0226	19	95
15J-0227	18	90
15J-0228	20	100
15J-0229	18	90
15J-0230	19	95