



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

**MARCHITEZ DEL CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.):
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL, DETECCIÓN EN
SEMILLAS, HISTOPATOLOGÍA Y ALTERNATIVAS DE CONTROL**

MALLY NATY RIVERA JIMÉNEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

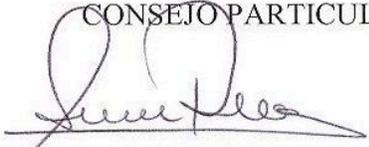
2009

La presente tesis titulada: “**Marchitez del chile poblano (*Capsicum annuum* L.): Identificación molecular del agente causal, detección en semillas, histopatología y alternativas de control**”, realizada por la alumna: **Mally Naty Rivera Jiménez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

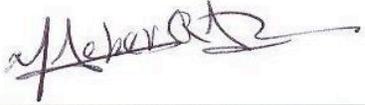
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



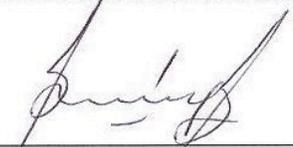
DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESORA:



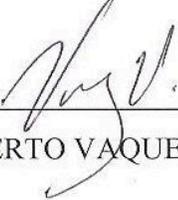
DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

ASESOR:



DR. GABINO GARCÍA DE LOS SANTOS

ASESOR:



DR. HUMBERTO VAQUERA HUERTA

Montecillo, Texcoco, México, 10 de diciembre 2009

**MARCHITEZ DEL CHILE POBLANO (*Capsicum annum* L.):
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL, DETECCIÓN EN
SEMILLAS, HISTOPATOLOGÍA Y ALTERNATIVAS DE CONTROL**

Mally Naty Rivera Jiménez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2009

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar la marchitez del chile Poblano, se colectaron plantas y frutos con síntomas de esta enfermedad en tres localidades de San Martín Texmelucan, Puebla. Durante el ciclo P/V 2007 se evaluaron 5 tratamientos: *Glomus intrarradix*, Bat Guano, Agrohomeopatía, Control químico tradicional y testigos, como alternativas para reducir el daño causado por los patógenos. De este experimento se aislaron de la base del tallo y cuello de la raíz, cepas patogénicas las cuales se identificaron mediante estudios filogenéticos y morfológicos como *Fusarium oxysporum* y *F. solani* species complexes. Mediante microscopía de luz se observó que estos aislamientos causaron daño a nivel histológico en epidermis, parénquima, endodermis y sistema vascular del cuello de la raíz. Asimismo, se confirmó en las semillas obtenidas de los frutos colectados en 2007, la presencia de comunidades microbianas dentro y sobre las semillas. Las alternativas de control se evaluaron en plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* (10^6), *Fusarium oxysporum* (10^5) y *F. solani* (10^5) y la mezcla de ambos *Fusarium* spp. en invernadero. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo inoculado, para las variables peso seco y altura de planta. *Glomus intrarradix* y Bat guano mostraron ser superiores a los otros tratamientos.

Palabras clave: Histopatología, marchitez, oomycetos, transmisión.

PEPPER POBLANO WILT (*Capsicum annuum* L.):
MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT, SEED
DETECTION, HISTOPATHOLOGY AND CONTROL ALTERNATIVES

Mally Naty Rivera Jiménez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2009

SUMMARY

With the aim to study pepper Poblano wilt, plants and fruits showing symptoms of this disease were collected in three localities of San Martín Texmelucan, Puebla. During the cycle P/V 2007, five treatments were evaluated: *Glomus intraradix*, Bat Guano, Agrohomeopatía, traditional Chemical applications and controls, as alternatives to reduce the damage caused by the pathogens. Of this experiment pathogenic strains were isolated from the base of the stem and root neck, from which *Fusarium oxysporum* and *F. solani* species complexes were identified through phylogenetic and morphological approaches. By means of light microscopy, these isolations caused histological lesions in epidermis, parenchyma, endodermis and vascular system of the root neck. Likewise, the presence of microbial communities, inside and over the seed was confirmed in the seeds previously obtained from the fruits collected in 2007. The alternatives of control were evaluated in plants inoculated with *Phytophthora capsici* (10^6), *Fusarium oxysporum* (10^5) and *F. solani* (10^5) and the mixture of both *Fusarium* spp. in greenhouse, the analyses showed significant differences for dry weight and height of plant variables. *Glomus intraradix* and Bat guano showed to be statistically over the other treatments.

Keywords: Histopathology, wilt disease, oomycetes, transmission.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme su apoyo para lograr concluir mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por proporcionarme las condiciones académicas y de infraestructura necesarias para desarrollar plenamente mis estudios doctorales.

A mi Consejera, Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por su guía, dirección, apoyo, consejos, por darme las herramientas esenciales durante todo el periodo de estudios doctorales y crear en mí un ideal de superación continua.

A todos los miembros de mi consejo particular, por su disposición, sugerencias y apoyo.

A todos los profesores, por su instrucción y dedicación otorgados durante mi estancia en la institución.

A todo el personal de apoyo y de campo que labora en el Campus, por su colaboración durante el desarrollo del proyecto de tesis.

Al Dr. Ángel Rebollar Alviter, de la Universidad Autónoma Chapingo “Centro Regional Morelia”, Morelia, Michoacán, México, por su valiosa cooperación y ayuda.

A todo el personal administrativo del IREGEP, especialmente a la Sra. Alicia Martínez, por todas sus atenciones y ayuda.

A mi familia, mis amigos y amigas, por su apoyo incondicional y por proporcionarme un ambiente cordial, el cual me permitió crear armonía en mi entorno.

DEDICATORIA

*A mi Padre Todopoderoso, **Jehová Dios**, por su amor incondicional, su
paciencia, instrucción y por mostrarme en todo momento la belleza de su
presencia en mi vida*

*A mi precioso salvador **Jesucristo**, por su sacrificio bendito pleno de amor,
piedad, comprensión y su hermoso ejemplo que sustenta mi existencia y mi
esperanza*

A mis muy amados padres: Antonio Rivera Peralta y Josefina Jiménez González

A mis amadísimos hermanos: Cristal, Antonio, Alfredo y Noemí

A mi amado esposo Isidro y nuestra pequeña bebé

A todas mis queridas amigas

*A mis profesores y a todas las personas a quienes pudiera ser útil el trabajo y
esfuerzo vertido en este proyecto*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Aspectos generales del cultivo de chile Poblano en México	1
1.2 Importancia económica y social del chile	2
1.3 Problemática del cultivo	4
1.4 Importancia de la Marchitez del chile y agentes causales	5
1.5 Interacción de los agentes causales de la marchitez del chile en la producción de semilla	9
1.6 Calidad de la semilla de chile	10
1.7 Histopatología	12
1.8 Microscopía electrónica	13
1.9 Planteamiento general	14
II. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
III. HIPÓTESIS	17
IV. LITERATURA CITADA EN LA INTRODUCCIÓN GENERAL	18

CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Fusarium</i> spp. CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL CHILE POBLANO EN LA REGIÓN DE CORONACO, PUEBLA, MÉXICO	26
1.1 RESUMEN	26
1.2 SUMMARY	28
1.3 INTRODUCCIÓN	29
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
1.6 CONCLUSIONES	44
1.7 LITERATURA CITADA	45
 CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE FITOPATÓGENOS EN LA SEMILLA DE CHILE MEDIANTE EL USO DE GENES NUCLEARES	 50
2.1 RESUMEN	50
2.2 SUMMARY	51
2.3 INTRODUCCIÓN	52
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
2.6 CONCLUSIONES	61
2.7 LITERATURA CITADA	61
 CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA INFECCIÓN DE <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> SPECIES	

COMPLEXES EN PLÁNTULAS DE CHILE POBLANO (<i>Capsicum annuum</i> L.)	64
3.1 RESUMEN	64
3.2 SUMMARY	65
3.3 INTRODUCCIÓN	66
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	68
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.6 CONCLUSIONES	74
3.7 LITERATURA CITADA	74
CAPÍTULO 4. ALTERNATIVAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CHILE POBLANO (<i>Capsicum annuum</i> L.) EN PLANTAS AFECTADAS POR MARCHITEZ	78
4.1 RESUMEN	78
4.2 SUMMARY	79
4.3 INTRODUCCIÓN	80
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	83
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
4.6 CONCLUSIONES	95
4.7 LITERATURA CITADA	96

INDÍCE DE CUADROS

CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Fusarium</i> spp. CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL CHILE POBLANO EN LA REGIÓN DE CORONACO, PUEBLA, MÉXICO	26
Cuadro 1. Severidad final obtenida durante 35 días en 25 plantas de chile poblano inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> species complexes y la mezcla de ambos y un testigo son inocular.	41
CAPÍTULO 4. ALTERNATIVAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CHILE POBLANO (<i>Capsicum annuum</i> L.) EN PLANTAS AFECTADAS POR MARCHITEZ	78
Cuadro 1. Arreglo de los tratamientos para las alternativas de control de <i>Fusarium</i> species complex y <i>Phytophthora capsici</i> durante 2008.	88
Cuadro 2. Criterio de la prueba de MANOVA para evaluar severidad.	89
Cuadro 3. Criterio de la prueba de MANOVA para evaluar incidencia	90
Cuadro 4. Cuadrados medios del ANOVA para peso seco y altura de planta	90

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Fusarium</i> spp. CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL CHILE POBLANO EN LA REGIÓN DE CORONACO, PUEBLA, MÉXICO	26
Figura 1. Fig. 1. Árbol filogenético, construido con el método de Máxima Parsimonia utilizando 973 bp de la región del Espacio Interno de Transcripción (ITS). Las amplificaciones correspondieron a <i>Fusarium</i> species complexes aislados de <i>Capsicum annum</i> cv. Poblanos, que mostraron síntomas de marchitez.	38
Figura 2. Fragmentos amplificados por PCR para identificar <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium solani</i> .	41
Figura 3. Plantas de chile poblano inoculadas, mostrando las diferentes etapas de severidad. A: Etapa cero (E0) = plantas sanas, B: Etapa 1 (E1) = con manchas en la base del tallo, C: Etapa 2 (E2) = las manchas se unen en una sola mancha, y D: Etapa 3 (E3) = plantas muertas.	42
Figura 4. Microestructuras (MEB) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A-D) y <i>Fusarium solani</i> (E-H) species complexes.	43
CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE FITOPATÓGENOS EN LA SEMILLA DE CHILE MEDIANTE EL USO DE GENES NUCLEARES	50
Figura 1. Panel A. DNA de semilla de chile sin desinfestar. Panel B. DNA de semilla de chile desinfestada con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% y etanol 96° (V/V) 30%.	59
Figura 2. Amplificación de 750 pares de bases del gen Tef en DNA de semilla	

de chile desinfestada de chile poblano de tres localidades del estado de Puebla y 5 tratamientos con tres repeticiones.	60
Figura 3. Amplificación de 750 pares de bases del gen Tef en DNA de semilla de chile sin desinfestar de chile poblano de tres localidades del estado de Puebla y 5 tratamientos con tres repeticiones	60
CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA INFECCIÓN DE <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> SPECIES COMPLEXES EN PLÁNTULAS DE CHILE POBLANO (<i>Capsicum annuum</i> L.)	64
Figura 1. Microfotografías de cortes transversales del área del cuello de raíz de plantas de chile poblano.	73
CAPÍTULO 4. ALTERNATIVAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CHILE POBLANO (<i>Capsicum annuum</i> L.) EN PLANTAS AFECTADAS POR MARCHITEZ	78
Figura 1. Evaluación de incidencia (%) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo de la fecha 6.	91
Figura 2. Evaluación de severidad (%) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo de la fecha 6.	91
Figura 3. Evaluación del peso seco (mg) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo en la fecha 6.	92
Figura 4. Evaluación de altura de planta (cm) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo en la fecha 6.	93

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Aspectos generales del cultivo de chile poblano en México

El género *Capsicum*, es originario de América del Sur, de los Andes y la Cuenca alta del Amazonas, que actualmente son parte de Perú y Bolivia y de algunas regiones de Argentina y Brasil (Desai et al., 1997; Laborde y Pozo-Campodonico, 1984). Este género agrupa un conjunto de aproximadamente 20 a 30 especies, entre ellas cinco corresponden a especies domesticadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L.; *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. y *Capsicum baccatum* L. var *pendulum* (Willd.) (Esbaugh, 1993; Bosland, 1994; Pickersrgill, 1997), los cuales fueron seleccionados para siembra miles de años antes de la colonia por parte de comunidades precolombinas y de manera independiente en regiones separadas del Sur, Centro y Norte América (Yamamoto and Nawata, 2005; Moscone et al., 2003; Votava et al., 2005).

Las especies de *Capsicum* domesticadas por las comunidades ancestrales han sido explotadas a escala global después del descubrimiento de América, según al valor de sus frutos. Actualmente son 30 especies las que se cultivan ampliamente en el mundo, de las cuales 5 se cultivan en México (SINAREFI, 2009), siendo *C. annuum* una de las más importantes debido a su uso como condimentos, hortalizas y plantas medicinales (Yamamoto and Nawata, 2005; Moscone et al., 2003).

El cultivo de chile poblano se inició a gran escala en el centro del país, en el Valle de Puebla, por lo que se le conoce con ese nombre cuando se consume en estado fresco; sin embargo, en algunas regiones de México se le conoce como chile ancho (Laborde y

Pozo-Campodonico, 1984). En Aguascalientes y regiones del Bajío recibe el nombre de *chile joto* y en Durango, *chile corazón*.

El chile crece como cultivo anual en regiones templadas con climas cálidos y húmedos, los que favorecen el crecimiento de las plantas, además son susceptibles al frío. La alta intensidad de luz incrementa el rendimiento, pero reduce el contenido de capsaicina, un alcaloide cristalino de alto valor industrial, gastronómico y farmacéutico (Desai et al., 1997).

Al deshidratarse, el chile poblano adquiere los nombres de chile ancho o chile mulato, de acuerdo a la intensidad de rojo que toma después de perder humedad. El chile poblano tiene un fruto muy grande y con bajo contenido de capsaicina. Su uso en la gastronomía mexicana es intenso debido a su tamaño. Además, la planta de este tipo de chile tiene algunos usos ornamentales, en Guerrero se emplea como parte de los *masúchiles*, literalmente, manojos de flores (Long, 1998).

1.2 Importancia económica y social del chile

El consumo de chile *per capita* internacional es de 3.6 kilogramos, mientras que la preferencia de chile en México registra un consumo *per capita* de 14.5 kg (FAOSTAT, 2005).

México exporta anualmente a Estados Unidos, Canadá y países de la Unión Europea más de 416,800 toneladas de diferentes variedades de chile, por lo que se ubica como el segundo país exportador de esta hortaliza en el ámbito mundial (SAGARPA, 2005).

México también ocupa el segundo lugar en producción mundial de esta hortaliza con 1.8 millones de toneladas (alrededor de 150 mil hectáreas sembradas en el país), que representa un valor comercial de más de siete mil millones de pesos, lo que ha derivado que en el 2004 el 25 % de la producción total del país se exportara (FAOSTAT, 2005).

La producción nacional anual de chile poblano deshidratado es de más de 33,316 toneladas (valor comercial de 1,438,900 pesos). El estado de Zacatecas se ubica como el principal productor de chile con 60 % de la producción nacional, anualmente registra una producción de chiles secos: guajillo, poblano, pasilla y árbol de cerca de 50 mil toneladas (valor comercial de más de 1,978,994 pesos); en chile verde tiene una producción de 107,475 toneladas al año (valor comercial de más de 2,210,625 pesos). El segundo lugar en el cultivo de chile seco lo ocupa el estado de San Luis Potosí, con el 27% de la superficie cosechada con un valor de producción de más de 970,743,000 pesos, otras entidades productoras de esta hortaliza son Aguascalientes y Chihuahua. El cultivo de chile poblano es de los más rentables, con un rendimiento promedio nacional de 30 ton ha⁻¹ (SAGARPA, 2005).

La cantidad de chile seco que se consume en el país es de 50 mil toneladas, 50% de esta proviene de China, y las semillas de las variedades de chile que se consumen en fresco o en seco provienen de USA. Este cultivo es considerado de importancia económica y generador de 200 a 350 jornales por hectárea. La producción de chile (particularmente de las variedades secas), atraviesa por un periodo crítico debido a que los productores de chile en el país se enfrentan a la carencia de semillas y al ingreso ilegal de estas, las que se siembran en casi todo el territorio nacional, además de chiles frescos del extranjero por lo que gradualmente se reduce la cantidad de superficie que se

siembra anualmente con semilla certificada. Para el tipo poblano la crisis de producción se observa en la modalidad de deshidratados, actualmente, se ha convertido en una especia de importancia mundial (Kuss and Hernández, 2008; Pozo-Campodónico, 2004; Pedraza y Gómez, 2008).

1.3 Problemática del cultivo

En México el consumo de chile constituye una tradición cultural (López-Carrillo et al., 1995). Geográficamente la producción de chile poblano se ha ido desplazando del estado de Puebla, sitio de origen de esta variedad a los estados de Guanajuato, Aguascalientes y posteriormente a Zacatecas. La principal causa de este desplazamiento se explica por el incremento en la incidencia de enfermedades (entre ellas marchitez del chile), el mal manejo de agua y la ausencia de programas de rotación (Gaitán, 2001; Chávez-Alfaro et al., 1994).

Los requerimientos anuales de semilla de los diferentes tipos de chile que se siembran en México, superan las 130 toneladas que en su mayoría corresponden a cultivares criollos que son producidos por el propio productor para cubrir sus necesidades, y también para comercializar regionalmente sus excedentes. Según estadísticas de la FAO (1961), el rendimiento promedio de semillas de chile fluctuaba de 25 a 50 kg ha⁻¹, en 1955 se reportó que en México, se obtenían 40 kg ha⁻¹ en promedio.

Un aspecto importante era el porcentaje de germinación mínimo aceptado oficialmente en USA que era de 51%, mientras que en México se obtenía el 65% (Montes y Martínez, 1992).

Existen programas gubernamentales que apoyan el desarrollo tecnológico del cultivo de chile, principalmente para reducir los daños causados por las enfermedades. En el estado de Zacatecas disminuyó la mortandad de plantas en un 60% lo que permitió incrementar la producción en 3.0 t ha⁻¹; el aumento en la conversión a chile deshidratado fue de 20% y la eficiencia en la aplicación del agua de riego se incremento del 50 al 80%, significando un ahorro de agua de 700 m³ ha⁻¹ y una disminución de costos de \$3400 ha⁻¹ por consumo de energía eléctrica y mano de obra. En el indicador global de competitividad de sistema producto para cadenas agroalimentarias con tendencia a la competitividad el crecimiento porcentual de 2001 a 2004 fue de 7.41 % para el cultivo de chile (SAGARPA, 2005).

1.4 Importancia de la Marchitez del chile y agentes causales

Phytophthora capsici fue el primer oomyceto descrito por Leonian (1922) como el agente causal de marchitez del chile en Nuevo México (USA) (Erwin and Ribeiro, 1996), otros fitopatógenos como *Fusarium* spp. se han reportado también como agentes causales de esta enfermedad en México desde 1967 (García, 1971) y en estudios recientes realizados en Oaxaca para otros tipos de chile (Vasques et al., 2009).

Se han observado daños con incidencia y severidad variable por infecciones de *F. oxysporum*, provocando daños vasculares que originan marchites y muerte de plantas y por *F. solani* que causa pudrición de raíz y cuello. En estos casos se puede notar un estrangulamiento en el cuello de la raíz, similar al que causa *Rhizoctonia solani*, en todos estos casos se observa desprendimiento de la epidermis (Mendoza-Zamora, 1996).

En condiciones favorables los patógenos que causan marchitez ocasionan pérdidas económicas devastadoras al afectar del 60 al 100% de la superficie cultivada. En México existen regiones donde se presentan pérdidas hasta del 80% y estados como Aguascalientes y San Luis Potosí donde la superficie de siembra de chile se ha reducido un 60% por causa de marchitez (SAGAR, 1999). En muestreos preliminares en la región de San Martín Texmelucan, Puebla se observaron síntomas de marchitez y reducción de la producción de hasta 90% (González-Pérez et al., 2004).

Entre los principales agentes causales de la marchitez del chile se encuentran *F. oxysporum* y *F. solani* y *P. capsici* (Erwin and Ribeiro, 1996; Mendoza-Zamora, 1996). A continuación se describen los principales agentes causales responsables de la marchitez de esta enfermedad:

Fusarium oxysporum Schlechtend. Emend.Snyder &Hansen, es un parásito facultativo que se ha aislado de raíces y semillas en un gran número de plantas (Booth, 1971). Tiene habilidad de existir como saprófito, y degrada lignina y carbohidratos complejos asociados con suelos a desechos orgánicos y también en tejido vegetal. También se encuentra como endófito de plantas y pueden colonizar raíces; con frecuencia las especies no patogénicas protegen a las plantas o son la base para la supresión de enfermedades. Aunque el papel predominante de estos hongos en suelos nativos puede ser perjudicial o benéfico, algunos endófitos de plantas o saprófitos de suelo, dentro de *F. oxysporum* species complex son patogénicos de plantas, especialmente en cultivos agrícolas (Summerell et al., 2002).

Entre las cepas patogénicas de *F. oxysporum* algunas causan pudrición de raíz, pero las más devastadoras inducen marchitez vascular en cultivos de importancia económica.

Estas cepas se caracterizan por su habilidad para entrar a la planta a través del sistema vascular, induciendo amarillamiento y finalmente, la muerte de la planta. Los mecanismos que demuestran la ausencia o la presencia de esta enfermedad son aún pobremente entendidos, y ambas cepas, patogénicas y no patogénicas pueden penetrar dentro de las raíces y desencadenar las reacciones de defensa de las plantas (Di Pietro et al., 2001; Gómez-Gómez et al., 2002; Inoue et al., 2002).

Fusarium solani (Mart.) Sacc., esta especie fue descrita por C.F.P. Von Martius en 1842, (estado sexual *Nectria haematococca*) conforma un grupo de más de 50 especies conocidas como “species complex”, los cuales tienen diversas propiedades biológicas entre ellas, causan enfermedades a más de 100 géneros de plantas (Coleman et al., 2009). *F. solani* species complex (FSSC) son organismos difíciles de diferenciar entre ellos debido a su alta similitud morfológica y filogenética. Este grupo conocido como patógenos ubicuos de plantas y saprófitos, comprende más de 45 especies filogenéticamente distintas, distribuidas en tres clados mayores (Zhang et al., 2006). *F. solani* species complex es un grupo sumamente diverso y cosmopolita conformado por distintos linajes incluye cepas que causan enfermedades de plantas y animales (Nalim et al., 2003).

Phytophthora capsici Leo. Dentro de las especies patogénicas devastadoras más importantes para este género y se caracteriza por el evento inicial del ataque a la planta hospedante es la adhesión a la cutícula y el crecimiento directo del tubo germinativo en la superficie de la planta. En el sitio de penetración se forma el apresorio, el cual ejerce una marcada presión sobre la epidermis. Posteriormente crece la hifa de penetración, la cual se diferencia a partir de la base del apresorio en contacto con la superficie de la

planta, la cual en muchos casos secreta enzimas que degradan la pared y maceran los tejidos de la planta. Una vez que se ha producido la invasión del tejido por la hifa de penetración, el crecimiento activo del hongo requiere el establecimiento de una relación parasítica con el hospedero que le proporcione al hongo los nutrientes necesarios para su crecimiento en la planta (Mendgen, 1996; Trapero, 1996; Tucker and Talbot, 2001).

Ante el ataque de los patógenos las plantas desarrollan mecanismos naturales de resistencia, siendo importante la influencia que ejercen los factores epidemiológicos y la susceptibilidad de las plantas a la infección. Los mecanismos de resistencia al ataque de *Phytophthora* se dividen en dos: aquellos que le confieren resistencia general (que es la resistencia de todas las especies de plantas a todos los patógenos y aquellos que confieren resistencia específica (aquella que es efectiva dentro de una especie de planta a ciertas razas de especie única y que es controlada por genes individuales de resistencia en el hospedante (Erwin et al., 1983; Hammerschmidt, 1999; Velásquez-Valle et al., 2001).

Dentro de los mecanismos de variación de *Phytophthora* podemos mencionar la recombinación sexual basada en la existencia de dos tipos sexuales A1 y A2, por lo que este mecanismo es solo efectivo en aquellas áreas donde coexisten ambos tipos (Erwin et al., 1983).

1.5 Interacción de los agentes causales de la marchitez del chile en la producción de semillas de chile

En la producción de semillas de hortalizas de fruto (solanáceas), las semillas se producen al mismo tiempo que el producto comercial, para lo cual se deben aplicar estrictamente las condiciones generales recomendadas por la FAO como: rotación, aislamiento, y depuración de las plantas. Después de la recolección de frutos, la extracción de las semillas puede ser manual (corte circular al pedúnculo) o por deshidratación del fruto (aprovechamiento simultáneo del fruto y la semilla) (Besnier, 1989).

Las semillas y otras formas de material vegetal son las unidades de inicio de los ciclos de cultivo y también pueden ser el punto final. Es importante resaltar en el proceso de producción de semillas de chile que las infecciones que se desarrollan durante el crecimiento de un cultivo sembrado en época tardía pueden afectar las partes florales de las plantas y por consiguiente infectar las semillas (Maude, 1996).

Es común encontrar patógenos que se transporten vía interna en la semilla (Barros and Teichert, 2005). La presencia del inóculo de patógenos que se desarrollan durante el establecimiento de las plántulas en el campo es un importante factor en la epidemiología para el desarrollo posterior del patógeno. La transmisión por semilla es compleja y depende de varias interacciones como factores ambientales, susceptibilidad del hospedante para establecimiento de la infección y agresividad del patógeno. En semillas de chile ocurre una separación común en la cubierta de la semilla, lo que resulta en una cámara entre la cubierta de la semilla y el endospermo, lo cual proporciona un punto de entrada para los patógenos (Agarwal and Sinclair, 1996).

Los hongos que se alojan en las semillas causan diferentes daños; si la infección es muy severa, el daño puede ocasionar la muerte del embrión, como es el caso de *Fusarium* spp. que causa pudriciones de mazorca en maíz. Con infecciones leves, las semillas no pierden su poder germinativo, sin embargo, si puede verse afectado el vigor (y además aumenta su predisposición para ser afectadas por los demás patógenos que se encuentran en la semilla y en el suelo), por lo tanto, si llegan a germinar son portadoras directas de patógenos, lo cual tendrá un efecto determinante en el desarrollo de las enfermedades, bajo las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad (Moreno, 1993).

Cuando la planta madre se infecta en campo por *P. capsici*, en algunos frutos enfermos, las semillas llegan a infectarse, se tornan café y disminuyen su tamaño (Erwin and Ribeiro, 1996), además se ha reportado que es un patógeno que se transmite por semilla (FAO, 1983; Copeland and McDonald, 1985).

El género *Fusarium* se clasifica como patógeno causante de enfermedades transmitidas por semilla de hortalizas (Besnier, 1989; Gil, 1991). *F. oxysporum* y *F. solani* es un patógeno por esta vía, penetra a través del sistema vascular de la planta madre e infecta a la semilla (McGee, 1988) y se encuentra también asociado a la semilla de chile (Pupo y Heredia, 1998).

1.6 Calidad de la semilla de chile

El desarrollo y la ordenación del sector de las semillas requieren diversas actividades, entre las que se incluyen la recolección y conservación de germoplasma, el

mejoramiento de variedades y la producción de semillas de calidad y su distribución a los agricultores (FAO, 2006).

La calidad de semillas es un concepto que comprende diversos componentes, aunque para muchos agricultores, semilla de calidad es aquella que germina y está libre de especies invasoras no deseadas, por lo que algunos laboratorios de análisis de semillas, señalan que entre 80 y 90% de todos los análisis solicitados son de pureza y germinación. Sin embargo se considera que los componentes de calidad de la semilla son: Física, Fisiológica, Genética y Sanitaria.

Los problemas potenciales creados por plagas (patógenos, insectos y plantas invasoras) asociadas a los lotes de semillas son reconocidos hace tiempo y la mayoría de los países tienen legislación de cuarentena para la importación de semillas (Hampton, 2002).

Según las normas de calidad para la producción de semillas de Chile, se considera como germinación mínimo de 65%, Pureza analítica 98%, pureza varietal 98%; los niveles máximos por unidad de peso de semilla de malezas o de otros cultivos, la presencia de enfermedades que se transmiten por la semilla y contenido de humedad deben estar de acuerdo a lo establecido para cada especie (FAO, 1995).

Las pérdidas de semillas son muy variables y están en función de la especie y la variedad del cultivo, presencia de plagas y enfermedades, clima, sistema de cosecha, procesamiento, almacenamiento, manejo, métodos de mercadeo y la existencia de leyes que regulan la comercialización nacional e internacional de semillas. Las pérdidas nutritivas y el poder germinativo de las semillas, pueden ser combinación de pérdidas de cantidad y calidad las cuales son difíciles de ensayar y medir. Las causas

generales de las pérdidas de semillas de los cultivos incluyen factores precosecha, tales como características genéticas de la variedad, las cuales influyen en las pérdidas del cultivo, durante la pre y post cosecha. En el sur de América las pérdidas en cuanto a la de producción de semillas es debido a la presencia plagas son del 33% debido a: Insectos: 10%, enfermedades 15% y malas hierbas 8%. Entre los factores biológicos que causan la pérdida de semillas, se ha mencionado a *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* como responsables de las enfermedades en semillas y plántulas, en un amplio rango de semillas (Desai et al., 1997).

A pesar del gran éxito que ha tenido la generación de cultivares mejorados e híbridos de la mayoría de Chile, alrededor del 70% del área nacional sembrada se establece con cultivares “criollos” y semilla artesanal (semilla del productor o regional), con escasos o ningún tipo de selección. Se considera que en general, los cultivares criollos tienen baja capacidad genética para la producción de frutos, así como alta heterogeneidad y por consiguiente dan productos de mediana o baja calidad visual, que no satisfacen la demanda del mercado (Pozo-Campodónico, 2004). La mayoría de las semillas de Chile de las variedades en fresco para deshidratación provienen de USA (Kuss y Hernández, 2008).

1.7 Histopatología

Los hongos son los patógenos de plantas económicamente más importantes, las técnicas de microscopía incrementan nuestro conocimiento de la interacción entre los patógenos y las plantas hospedantes (Gold et al., 2001). La histoquímica y la histología son técnicas de microscopía de gran utilidad. La histología microscópica,

particularmente de las plantas vasculares incorpora la fijación química, la deshidratación, la infiltración en parafina y los cortes ultrafinos. Los procedimientos histológicos estándar involucra la fijación del tejido en un fluido químico diseñado para preservar la estructura celular, donde el agua es removida de la célula gradualmente por deshidratación con alcohol (deshidratación), el tejido se infiltra en parafina y se embebe en un bloque del mismo material, el tejido infiltrado y embebido se secciona con un micrótopo y las secciones se fijan en cortes seriados, después la parafina se remueve y el tejido se tiñe, finalmente el tejido se cubre con un cubre objetos y se coloca de forma permanente en un porta objetos para observar las muestras al microscopio de luz (William, 1962). Las propiedades de soluciones fijadoras afectan la calidad de fijación, incluida la temperatura, el pH, osmolaridad, tiempo de fijación, tasa de penetración del fijador y autólisis dentro el tejido (Ruzin, 1999).

1.8 Microscopía electrónica

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Permite la observación de muestras con cortes ultrafinos. Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces (Ojeda, 1997).

Microscopía Electrónica de Barrido. Los parámetros fundamentales que intervienen en las cualidades de una imagen de un microscopio electrónico de barrido (MEB) son aumentos, resolución, profundidad de foco, contraste y la relación señal ruido. El MEB de barrido utiliza un fino haz de electrones para explorar la muestra y formar la imagen. Los tipos de imágenes que se pueden obtener varían y dependen de las señales que se producen por la interacción entre los electrones y la muestra. Cuando un haz de electrones choca con una muestra penetra en ella. La profundidad a la que penetran los electrones es directamente proporcional al número atómico de los átomos que la constituyen. A medida que se produce la penetración, los electrones pierden su energía. El MEB es un aparato diseñado para que un fino haz de electrones haga una exploración sistemática de la muestra en observación, produciendo así electrones secundarios que una vez recogidos por un detector son empleados como una señal a partir de la cual se obtiene, en la pantalla de un tubo de rayos catódicos, una imagen tridimensional aumentada de la superficie de la muestra (Ojeda, 1997).

1.9 Planteamiento general

Los intentos por controlar la enfermedad de marchitez de chile han tenido logros parciales o nulos, la tendencia se centra en obtener cultivares resistentes mediante mejoramiento genético, más es también válido evaluar alternativas de control que permitan delinear el vasto marco de investigación y aislar en plantas enfermas, cultivadas en regiones afectadas, cepas patogénicas para evaluar y determinar la susceptibilidad de la especie de chile en estudio y su respuesta a diferentes tratamientos dirigidos a promover un control de la enfermedad, es además muy importante analizar la

calidad fitosanitaria de la semillas de dichas plantas, utilizando técnicas modernas y confiables, como PCR, para identificar patógenos presentes sobre y dentro de la semilla. Habitualmente los productores utilizan la semilla de sus cultivares criollos para el ciclo de siembra posterior, dado que la semilla es un medio eficaz de diseminación, utilizando semilla sana es posible evitar una nueva infección o re-infección en los terrenos de cultivo y a partir de los resultados que se obtengan, prever un control más específico en la calidad de la semilla y en su producción.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Detectar e identificar molecular y morfológicamente los agentes causales de la marchitez del chile en plantas y semillas con síntomas de la enfermedad y evaluar alternativas de control en invernadero.

2.1 Objetivos específicos

- 2.1.1 Identificar molecular y morfológicamente cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* sp. complex y *Fusarium solani* sp. complex en tallo y raíz de plantas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de marchitez de chile.
- 2.1.2 Identificar hongos fitopatógenos causantes de marchitez del chile en la semilla de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso de genes nucleares.
- 2.1.3 Caracterizar histopatológicamente la infección de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.).
- 2.1.4 Evaluar alternativas de control para incrementar la producción de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) en plantas afectadas por marchitez.

III. HIPÓTESIS

La identificación molecular de fitopatógenos aislados en plantas y semillas de chile poblano (*Capsicum annum* L.) afectadas por marchitez de chile es tan eficiente como la identificación morfológica tradicional de los agentes causales, además, con técnicas moleculares es posible establecer análisis filogenéticos confiables de los microorganismos identificados.

Al realizar inoculaciones con *Fusarium solani* species complex y *Fusarium oxysporum* species complex en plántulas de chile poblano a 45 días a la siembra, mediante histopatología es posible observar la invasión del micelio y el daño a la pared celular con microscopía de luz y microscopía de barrido, lo cual permite caracterizar la entrada de los patógeno desde la raíz a la base del tallo donde se presenten los síntomas.

Existen alternativas de control, además de tratamientos químicos, que permiten incrementar la sobrevivencia de plantas de chile poblano (*Capsicum annum* L.) que son infectadas con patógenos causantes de marchitez de chile (*Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* species complex y *Fusarium oxysporum* species complex).

VI. LITERATURA CITADA EN LA INTRODUCCIÓN GENERAL

- Agarwal, V. K., and Sinclair, J. B. 1996. Principles of Seed Pathology. 2^a ed. Boca Raton. CRC Press. 539 p.
- Barros, C. S., and Teichert, P. S. 2005. Producción de semillas en América del Sur. p. 1. In: Seed News. Revista Internacional de Semillas. UPF. Editora Becker & Peske Ltd.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas, Biología y Tecnología. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 637 p.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England. 237 p.
- Bosland, P.W. 1994. Chiles. History, cultivation and uses. pp. 347-366. En: Spices, Herbs, and edible Fungi. Charambous, G. (ed.). Elsevier Pub. N.Y.
- Chávez-Alfaro, J. J., Zavaleta-Mejía, E., Téliz-Otíz, D., y Juárez, P. C. 1994. Control integrado de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) ocasionada por *Phytophthora capsici* en la región de Valsequillo, Puebla. p. 26. En: Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Cuernavaca, Morelos.
- Coleman, J. J., Rounsley, S. D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., et al. 2009. The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. PLoS Genet 5(8): e1000618. doi:10.1371/journal.pgen.1000618vv.

- Copeland, L. O., and McDonald, B. M. 1985. Principles of Seed Science and Technology. 2a Ed. Burguess. USA. 409 p.
- Desai, I. B. B., Kotecha, M. P., and Salunke, K. D. 1997. Seeds Handbook Biology, Production, Processing and Storage. Marcel Dekker, Inc. USA. 627 p.
- Di Pietro, A. F. I., Garcia, M., Mégkecz, E., and Roncero, M. I. G. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. Molecular Microbiology 39:1140-1152.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota, 562 pp.
- Erwin, D. C., Bartnicki-García, S., and Tsao, P. H., eds. 1983. *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. St. Paul, Minnesota. 392 p.
- Esbaugh, W. H. 1993. Peppers: history and exploitation of a *Serendipitous* new crop discovery. pp. 132-139. En: New Crops. Janick, J., and Simon, J. (eds). Wiley, New York, USA.
- FAO. 1983. Guía para la Tecnología de Semillas de Hortalizas. pp. 81-82. Raymond AGT. Roma.
- FAO. 1995. Semilla de Calidad Declarada: Directrices Técnicas sobre Normas y Procedimientos. Estudio FAO (Organización de las Naciones Unidos para Agricultura y la Alimentación) Producción y Protección Vegetal 117. FAO, Roma.
- FAO. 2006. 24ª Conferencia regional para África. Programa de semillas y biotecnología para África. Bamako, Malí, África. URL:

<ftp://ftp.fao.org/unfao/bodies/arc/24arc/J6882S.pdf> (Cons.09/2008).

FAOSTAT. 2005. URL <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (Cons.09/2008)

Gaitán, G. J. 2001. Diseño de un programa de desarrollo de proveedores de Chiles Secos en Zacatecas, México, como estrategia de integración de la cadena productiva agroindustrial. Programa de Alianzas Estratégicas para el Desarrollo Rural Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Monterrey Nuevo León, México. 30 p.

García, A. M. 1971. Patología vegetal Práctica. Limusa. México. 256 p.

Gil, O. R. 1991. Transmisión de enfermedades por las semillas de hortalizas. Su prevención. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Folleto divulgativo N° 6/90 HD. Madrid. 16 p.

Gold, S. E., García, P. M., and Martínez, E. A. 2001. New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. Annual Review. of Phytopathology 39: 337-365.

Gomez-Gómez, E., Ruiz-Roldán, M. C., Di Pietro, A., Roncero, M. I., and Hera, C. 2002. Role in pathogenesis of two endo- β -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology 35:213-222.

González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M. de J., Santiago-Santiago, V., y Montero-Pineda, A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, el Verde, Puebla. Agrociencia 38:653-661.

Hampton, J. G. 2002. What is seed Quality? Seed Sci. Technol. 30:1-10.

- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years. Annual Review of Phytopathology 37:285-306.
- Inoue, I., Nmiki, F., and Tsuge, T. 2002. Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. Plant Cell 14:1869-1883.
- Kuss, E., and Hernández, G. 2008. Mexico Planting Seeds Annual. USDA Foreign Agricultural Service. Global Agriculture Information Network Report MX8054.
URL: <http://www.Fast.usda.gov/gainfiles/200808/146295565.pdf>
(Cons. 08/2009).
- Laborde, C. A. y Pozo-Campodónico, O. 1984. Presente y pasado del chile en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). México, D.F. 80 p.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E., and Tousson, T. A. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. Phytopathology 80:343-350.
- Long, S. J. 1998. *Capsicum* y cultura: la historia del chilli. Fondo de Cultura Económica. México. 203 p.
- López-Carrillo, L., Fernández-Ortega, M., Costa-Díaz, R., Franco-Marina J., y Alejandre-Badillo, T. 1995. Creencias sobre el consumo de chile y la salud en la ciudad de México. Salud Pública de México 37:339-343.
- Maude, R. B. 1996. Seedborne Diseases and their Control: Principles and Practice. Cab International. UK: 280 p.

- McGee, D. C. 1988. Patología de Semillas. pp. 1-28. Curso Internacional de Capacitación sobre Tecnología de Producción de Semillas de Maíz. CIMMYT. México.
- Mendoza-Zamora, C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México. 85 p.
- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34:367-386.
- Montes, C. F., y Martínez, C. G. 1992. Prácticas culturales relacionadas con la producción de semillas de chile. Situación actual de la producción e investigación y comercio de semillas en México. pp. 80-101. Memorias del 3er Simposio Mexicano sobre Semillas Agrícolas. 20-22 Mayo. Torreón, Coahuila, México. SOMEFI. UACH, Chapingo.
- Moreno, E. 1993. Tratamiento Químico de las Semillas para el Combate de los Hongos. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 68 p.
- Moscone, E. A., Baranyi, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F., and Hunziker, A. T. 2003. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany* 92:21-29.
- Nalim, F. A., Mc Govern, R. J., Elmer, W. H., and Geiser, D. M. 2003. New clades of the *Fusarium solani* species complex associates with tuber root of Caladium. *Phytopathology* 93:64S.

- Ojeda, S. J. L. 1997. Métodos de Microscopía de Barrido en Biología. Santander: Universidad de Cantabria, D. L. España. 50 p.
- Pedraza, R. L., y Gómez, G. A. 2008. Comercialización de chile piquín (*C. annuum* var. *aviculare* Dierb.) en México. TECSISTECATL. URL: <http://www.eumed.net/rev/tecsistecat/n5/prgg.htm> (Cons. 22.09.09).
- Pickersgill, B. 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. Euphytica 96:129-133.
- Pupo, P. E. y Heredia, R. I. 1998. Lista de hongos asociados a la semillas. INISAV. Boletín técnico 1. La Habana, Cuba. 12 p.
- Pozo-Campodonico, O. 2004. Importancia económico-social y cultural del chile. pp. 5-12. En: Curso-Taller producción y manejo integral del cultivo de chile. Consejo nacional de productores de chiles S.C. Folleto técnico No 2.
- Ruzin, S. 1999. Plant Micro-Technique and Microscopy. New York, Oxford University Press, Inc. 322 p.
- SAGAR. 1999. Anuario estadístico. Anuario Agrícola Nacional. Centro de Estadística Agropecuaria. URL <http://www.sagar.gob.mx> (Cons. 03/07).
- SAGARPA. 2005. Estadísticas del cierre agrícola 2005. (Cons.01/2008). URL www.sagarpa.gob.mx/dlg/bajacaliforniasur/Agricultura/index.htm
- SINAREFI. 2009. Macroredes.Hortalizas: Red de Chile. URL <http://www.sinarefi.org.mx/chile.html> (Cons. 11.09).

- Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., and Burgues, L. W. eds. 2002. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press. St. Paul, Minnesota, 392 p.
- Trapero, A. 1996. Los hongos fitopatógenos. pp. 773-765. En: Patología Vegetal (Vol II), Llácer, G., López, M. M., Trapero, A., y Bello, A., eds. Sociedad Española de Fitopatología. Madrid, España.
- Tucker, L. S., and Talbot, J. N. 2001. Surface attachment and prepenetration stage development by plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 39: 385-417.
- Vasques-López, A., Tlapal-Bolaños, B., Yañez-Morales, M. de J., Pérez-Pacheco, R., y Quintos-Escalante, M. 2009. Etiología de la marchitez del “chile de agua” (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana 32:127-134.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M., y Luna-Ruiz, J. de J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:175-181.
- Votava, E. J., Baral, J. B., and Bosland, P. W. 2005. Genetic diversity of Chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. Economic botany 59:8-17.
- William, A. J. 1962. Botanical Histochemistry Principles and Practice. W. H. Freeman & Company San Francisco and London. Printed in the USA. 408 p.

Yamamoto, S., and Nawata, E. 2005. *Capsicum frutescens* L. in Southeast and East, Asia, and its dispersal routes to Japan. *Economic Botany* 59:18-28.

Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D. A., Nalim, F. A., Summerrell, R. C., Padhye, A. A., and Geiser, D. M. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common environment. *Journal of Clinical Microbiology* 44:2186-2190.

CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Fusarium* spp.
CAUSANTES DE MARCHITEZ AISLADOS EN PLANTAS ENFERMAS DE
CHILE POBLANO EN CORONACO, PUEBLA, MÉXICO

1.1 RESUMEN

Fusarium solani y *F. oxysporum* son hongos mitospóricos asociados a la marchitez del chile en el mundo. Sin embargo, en Mesoamérica los responsables de esta enfermedad no están claros, por tal razón se realizó el presente trabajo con el objetivo de identificar a los agentes causales involucrados en esta enfermedad. Se analizaron plantas de chile poblano días que mostraron síntomas de marchitez, los aislamientos se obtuvieron de la base del tallo y del cuello de raíz de plantas de chile poblano al final del ciclo Primavera-Verano 2007, en la región de Coronaco, Puebla, México. Se realizaron cultivos monoconidiales de los cuales se seleccionaron 13 para estudios filogenéticos y morfológicos. Para el análisis filogenético, se realizó la extracción de DNA y para la PCR se utilizaron iniciadores para amplificar el Espacio Transcrito Interno del ribosoma (ITS region), una secuencia parcial del gen 28S rDNA, y el gen que codifica para el Factor de elongación de la transcripción 1- α (Tef). Los resultados del análisis filogenético indicaron que los aislamientos correspondieron a *F. solani* y *F. oxysporum* species complexes. Las características morfológicas se analizaron con Microscopía electrónica de barrido y los resultados fueron concordantes con lo obtenido previamente. Del total de aislamientos, cinco correspondieron a *F. oxysporum* species complex y se obtuvieron del cuello de raíz y ocho aislamientos correspondieron a *F. solani* species

complex y se obtuvieron de la base del tallo. De acuerdo a nuestro conocimiento este es el primer reporte acerca de *F. solani* aislado del cuello de la raíz y *F. oxysporum* de la base del tallo, los cuales están involucrados en la marchitez del chile poblano en la región de Coronaco, Puebla, Mx. Esta confirmación fue realizada a través de la prueba de patogenicidad.

Palabras clave: *Fusarium solani* species complex, *Fusarium oxysporum* species complex, chile, marchitez

1.2 SUMMARY

Fusarium solani and *F. oxysporum* are mitosporic fungi associated to pepper wilt disease anywhere in the world. However, in Mesoamerica the causal agents of this disease are not clear, for this reason in order to clarify what pathogens are involved in the wilt symptoms, this work was done. Pepper plants from 75 days-ago showing symptoms of decay were analyzed. Isolated from base of the stem and neck roots in ‘pepper poblano’ were recovered to the end of Spring-Summer 2007 in the Coronaco region, located in the south of the State of Puebla, Mx. Monoconidial isolates were carried out, and thirteen isolates were selected for phylogenetic and morphological approaches. DNA extraction procedures and PCR using primers to amplify the Internal Transcribed Spacer (ITS), 28S rDNA partial sequence, and Translation elongation factor 1- α (Tef) were performed. Morphological features were studied through scanning electronic and *F. solani* and *F. oxysporum* species complexes were consistent with phylogenetic approach. Five isolations from the neck of the root and they belonged to *F. oxysporum* species complex, and eight isolations from the base of the stem belonged to *Fusarium solani* species complex were obtained. According our knowledge this is the first report about *F. solani* was isolated only from the neck root and *F. oxysporum* of the base of the stem and they are two fungi that are involved in the wilt of ‘poblano pepper’ in the region of Coronaco, Puebla, Mx. This confirmation was done through pathogenicity tests.

Keywords: *Fusarium solani* species complex, *Fusarium oxysporum* species complex, pepper, wilt.

1.3 INTRODUCCIÓN

México es uno de los países más importantes en Mesoamérica dedicado a la producción comercial de chile (*Capsicum annuum* L.), se siembran alrededor de 150 mil hectáreas en el país con una producción anual de 1.8 millones de toneladas ocupando el segundo lugar a nivel mundial como productor de esta hortaliza (FAOSTAT, 2005). En México se siembran aproximadamente 150 tipos de chile, de los cuales el chile poblano es uno de los más importantes debido a sus usos gastronómicos, como especia y por sus aplicaciones como colorante en la industria textil y farmacéutica.

El chile poblano se ha sembrado en el Centro del país desde épocas anteriores a la llegada de los españoles en el Valle de Puebla, lugar del que ha tomado su nombre (Laborde y Pozo-Campodonico, 1984), sin embargo, actualmente su cultivo ha ido desplazándose poco a poco hacia el Norte del país, debido a la presencia de enfermedades fungosas que han afectado la producción del cultivo (Gaitán et al., 2001; Velásquez-Valle et al., 2001; González-Pérez, 2004).

Dentro de las enfermedades fungosas más devastadoras se encuentra la marchitez, que ocasiona pérdidas en casi todas las regiones donde se cultiva esta hortaliza. En condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la marchitez se han registrado pérdidas económicas que varían del 60 al 100% de la superficie cultivada (SAGAR, 1999). En la región de San Martín Texmelucan, Puebla, se observaron plantas con síntomas de marchitez y reducción de la producción de hasta 90% (González-Pérez et al., 2004).

Se han reportado como agente causales de la marchitez del chile en México desde 1967 a *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* afectando haces vasculares que

originan marchitamientos y muerte de plantas, y *F. solani* causando pudrición de raíz y cuello, que dan como consecuencia la marchitez y muerte de la planta y (García, 1967). En estos casos se puede notar un estrangulamiento y desprendimiento de la epidermis a nivel del cuello de la planta similar al de *Rhizoctonia solani* (Mendoza-Zamora, 1996).

Anteriormente, se consideraba a *F. oxysporum* fsp. capsici como el agente causal de la marchitez del chile, debido a la existencia de formas especiales con especificidad en un hospedante (Katan, 1999; Ortoneda et al., 2004; Van der Does et al., 2008). Sin embargo, *F. oxysporum* es un complejo monofilético, filogenéticamente diverso de otros ascomicetos filamentosos que son responsables de infecciones oportunistas localizadas y diseminadas (O'Donnell et al., 2004).

No obstante, los análisis de secuencias de DNA han indicado que algunas formas especiales de *Fusarium* son polifiléticas (Desjardins, 2006; Baayen et al. 2000; O'Donell et al. 1998). Los esfuerzos que actualmente se realizan para clasificar *F. solani* species complex y las cepas de *F. oxysporum* species complex consisten en varios métodos, incluyendo diversidad de grupos de compatibilidad vegetativa, estudios sobre morfología y secuenciación de DNA (Geiser et al., 2004; Lievens and Thomma, 2005; Sholberg et al., 2005; Summerell et al., 2003).

Sin embargo, a pesar de haberse obtenido aislamientos de *Fusarium* de plantas con síntomas de marchitez, se ha cuestionado la patogenicidad de estas especies para causar enfermedad en México; por tal razón se planteo la presente investigación con el objetivo de aislar de plantas enfermas los agentes causales de la marchitez del chile poblano en la región Centro del país, comprobar la patogenicidad de las cepas aisladas y la

identificación mediante la amplificación de genes nucleares y estudios morfológicos a través de microscopía electrónica de barrido.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y aislamiento de hongos. En el ciclo agrícola Primavera-Verano 2007, se colectaron plantas con síntomas de marchitez en la región de Juárez Coronaco, Puebla. Se cortaron secciones de tejido correspondientes a la base del tallo y el cuello de la raíz, se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de Sodio al 1.5%, y se enjuagaron con agua destilada estéril y una segunda inmersión en alcohol etílico 90° (V/V) al 35% y se enjuagó con agua destilada estéril como en la primera desinfección. Las porciones de tejido se secaron en una cámara de flujo laminar; posteriormente se cortó 1 cm² del sistema vascular y se colocó en cajas de Petri conteniendo medio Papa Dextrosa Agar (PDA). A los cinco días, se observó crecimiento micelial, el cual se purificó por punta de hifa en nuevas cajas con PDA para la obtención de cultivos monoconidiales. De estos se seleccionaron 13 aislamientos para estudios filogenéticos y morfológicos.

Extracción de DNA. Los aislamientos monoconidiales utilizados para la extracción de DNA se sembraron en PDA y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 días bajo luz UV. El micelio se raspó de la superficie del medio de cultivo, se maceró en un mortero con 1 mL de solución de lisis (10 mM TRIS base HCL pH 8.0, Tritón x 100 0.5%) y 10 µL de proteinasa K (10 mg mL⁻¹). Después se transfirió 600 µl a un tubo Eppendorf de 2.0 mL y se utilizó el protocolo de Bainbridge et al. (1990) con algunas modificaciones. Cada pastilla de DNA se disolvió en 50 µL de buffer TE (10 mM Tris-

HCl, pH 8, 1mM EDTA). La calidad de DNA se verificó por electroforesis con un gel de agarosa al 1.2 %, buffer TAE 1x (Tris Acetato-EDTA) a 87 V cm⁻¹ durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹) y las bandas se visualizaron en un transluminador Gel Doc 2000 UV (BIORAD, USA). La concentración de DNA se cuantificó con un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda BIO 10, USA) y se diluyó a 20 ng/μl para las reacciones de PCR.

Amplificación de genes ribosomales. Se amplificó la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno del ribosoma (ITS) y parte de la región 28S rDNA correspondiente al extremo 5' del gen con los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μL con: 1 x *Taq* buffer DNA polimerasa, 2 μM dNTPs, 100 ng DNA, 10 pmol de cada primer y 2 U de enzima *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo con una temperatura inicial de desnaturalización a 95°C por 4 min; seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min, y una extensión a 72°C por 2 min. Finalmente, un ciclo 72°C por 10 min.

Amplificación del Factor de Elongación de la Transcripción 1 α (Tef). Para la amplificación de este gen nuclear se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 μL que contenían 1 x *Taq* buffer DNA polimerasa, 2 μM dNTPs, 20 ng DNA, 10 pmol de cada iniciadores EF1 (5'-GCTAACAATCATCTACAGAC-3') y EF2 (5' GACGGATGAGAGAGCAAC-3') y 2 U de *GoTaq* DNA (Promega, USA). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 97°C por 1 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 96°C por 1 min, alineamiento a 61°C por 1

min y una extensión a 72°C durante 1.5 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 7 min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, Mexico); los productos de PCR se verificaron por electroforesis cargando 5 µL en un gel de agarosa al 1.2%, el gel se tiñó como se describió anteriormente. Los productos de PCR amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para asegurarse de que los resultados fueran confiables, los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones con el Sistema automático de Applied Biosystems model 3730XL (Applied BioSystems, USA).

Análisis filogenéticos. Las secuencias correspondientes a ambas regiones se ensamblaron utilizando el software BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999); se creó una secuencia consenso para cada aislamiento, la cual se comparó con las secuencias depositadas en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), que encuentra regiones de similitud entre secuencias con alineamientos significativos, las secuencias consenso de cada aislamiento obtenido se analizó a través de BLASTN 2.2.19 (Zhang, 2000).

Las secuencias consenso se compilaron en un archivo (Formato Fasta) y se alinearon con el programa Clustal W (Thompson et al., 1994), incluido en el software MEGA 4 (Tamura et al., 2007). El análisis filogenético se realizó con el método de Máxima Parsimonia utilizando las secuencias correspondientes a los genes amplificados con la opción Close Neighbor Interchange (CNI) (level=1), con un árbol inicial por adición aleatoria (10 reps); los espacios y los datos perdidos se consideraron completamente

eliminados. Para determinar los valores de confiabilidad para cada agrupamiento dentro del árbol consenso se realizó un análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Para la construcción del árbol filogenético se consideraron las secuencias de referencia de *F. dimerum* y *F. penzigii*, además se incluyó a *Phoma herbarum* (GenBank EU082106) como fuera de grupo (Fig. 1).

Secuencias nucleotídicas. Las nuevas secuencias para ITS se depositaron en el GenBank de NCBI bajo los siguientes números de acceso: EU082106, EU082095 y para las secuencias de Tef con EU925653, EU925651.

Características morfológicas. Para identificar los hongos a nivel de género se utilizó como referencia la descripción de Burgess, Lidell, y Summerell (1994) y la resolución de las especies se realizó de acuerdo a la clave de Seifert (1996).

Obtención de los aislamientos. Se tomaron pequeñas porciones de agar con micelio de ~5 mm² de cada aislamiento y se transfirieron a cajas de Petri con PDA (Difco, Mexico). Para estudiar las características morfológicas, cada aislamiento se sembró en medio Agar Hoja de Clavel-Carnation Leaf Agar medium (CLA), las cuales se incubaron a ±24°C con 12 h de luz blanca y 12 h de luz UV durante 15 días. Posteriormente se resembró en PDA y mediante la técnica de cámara húmeda se indujo la producción de macro y microconidios bajo luz UV durante 15 días.

Microscopía Electrónica de Barrido para estudio de estructuras morfológicas. Para este estudio se tomó un cubo de PDA con micelio (crecido en cámara húmeda bajo luz UV) de cada aislamiento previamente identificado a través del estudio filogenético como: *F. oxysporum* cepa F3 y *F. solani* cepa F5, los cuales se fijaron en Glutaraldehído al 2.5% con buffer Sorensen de fosfato (NaH₂PO₄ H₂O y Na₂PO₄) 0.1 M pH 7.2 durante

12 h. Posteriormente, cada muestra se lavó con la solución amortiguadora de Sorensen tres veces durante 5 min., se sometieron a proceso de deshidratación cada 2 h en alcohol isopropílico a las siguientes concentraciones: 30, 40, 50, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Una vez deshidratadas, cada muestra se llevó a punto crítico con CO₂ en un secador Samdri-780A. Posteriormente, se adhirieron las muestras a un portaobjeto con cinta de cobre y se recubrieron con una capa de oro (500 Å grosor). Las observaciones se realizaron con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JEOL 35C, con un voltaje de aceleración de 25 Kv.

Preparación del inóculo para la prueba de patogenicidad. El incremento de inóculo de *Fusarium* spp. se realizó mediante el método de glumas de avena. Este método se llevó a cabo con glumas de avena esterilizada en un frasco (dos veces durante 45 min. a 15 lb). Previamente, cada aislamiento se sembró de manera individual en cajas de Petri con PDA, los cuales se cortaron en cubos y se mezclaron con las glumas; los frascos se incubaron a temperatura de 22-24°C durante 15 días bajo luz UV y luz blanca. Posteriormente, el micelio que creció sobre las glumas se removió frotando las glumas en agua destilada estéril, de esta suspensión se preparó con un hematocitómetro una suspensión de 10⁵ conidias mL⁻¹.

Prueba de patogenicidad. Todos los aislamientos identificados como *F. oxysporum* y *F. solani* se utilizaron en la prueba de patogenicidad (Cuadro 1). Se consideraron cuatro tratamientos: inoculaciones con *F. oxysporum*, *F. solani*, una mezcla de *F. oxysporum* – *F. solani* y un testigo. Se inocularon 25 plántulas por tratamiento de chile poblano cv. “San Luis” de 25 días (después del trasplante) mantenidas en invernadero mediante la técnica de Punja et al. (2000). La evaluación de severidad se midió con la

siguiente escala: Etapa cero (E0) = plantas sanas, Etapa 1 (E1) = con manchas en la base del tallo, Etapa 2 (E2) = las manchas se unen formando una sola mancha y Estado3 (E3) = plantas muertas. La evaluación se inició cuando se observaron los primeros síntomas en la base del tallo y finalizó al morir la planta. Todas las pruebas se condujeron separadamente dos y tres veces para confirmar la patogenicidad de los aislamientos. Los testigos se inocularon con agua destilada estéril.

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos de *Fusarium* spp. Se obtuvieron trece aislamientos de *Fusarium* spp. de plantas de chile poblano infectadas (base del tallo y cuello de la raíz), las cuales presentaban síntomas de decaimiento.

La identificación preliminar fue sustentada con las descripciones morfológicas para *Fusarium* spp. que se mencionan en la clave de Seifert (1996). Los resultados sugieren que *F. oxysporum* y *F. solani* son patógenos aislados de plantas de chile poblano con síntomas de marchitez en la región de Juárez, Coronaco en el estado de Puebla.

Análisis filogenéticos. Las amplificaciones realizadas de los genes nucleares ITS y Tef, se llevaron a cabo exitosamente, se obtuvieron fragmentos de 1,100 bp y 550 bp respectivamente en todos los casos, como se esperaba. Los resultados de BLASTN confirmaron que la mayoría de los aislamientos que causan síntomas de marchitez en plantas de chile poblano cv. "San Luis" pertenecen a *F. oxysporum* species complex y *F. solani* specie complex. La región ITS rDNA y la porción del gen nLSU rDNA revelaron identidades de secuencias nucleotídicas de 99 a 100% para estas especies (Fig. 2). La

comparación entre ellas se llevó a cabo con fragmentos de la misma longitud (1,100 bp) que fueron bajadas del GenBank, así como secuencias de referencia *F. oxysporum* número de accesoión AY188919 de Francia y *F. solani* S-0900 número de accesoión EU029589 de USA.

Estas observaciones se confirmaron con los análisis filogenéticos de las poblaciones de *Fusarium* spp., actualmente caracterizados. Los resultados de los datos moleculares, descripciones morfológicas y pruebas de patogenicidad indicaron que del total de las poblaciones de *Fusarium* spp. de plantas de chile poblano, 40% pertenecen a *F. oxysporum*, y 60% de los aislamientos pertenecen a *F. solani* species complexes; todos los aislamientos fueron considerados poblaciones habitantes en plantas de chile poblano. Las secuencias de los aislamientos incluidos en este estudio como referencia (*Fusarium* spp., *F. dimerum* and *F. penzigii*) fueron agrupados claramente en tres grupos diferentes (Fig. 1).

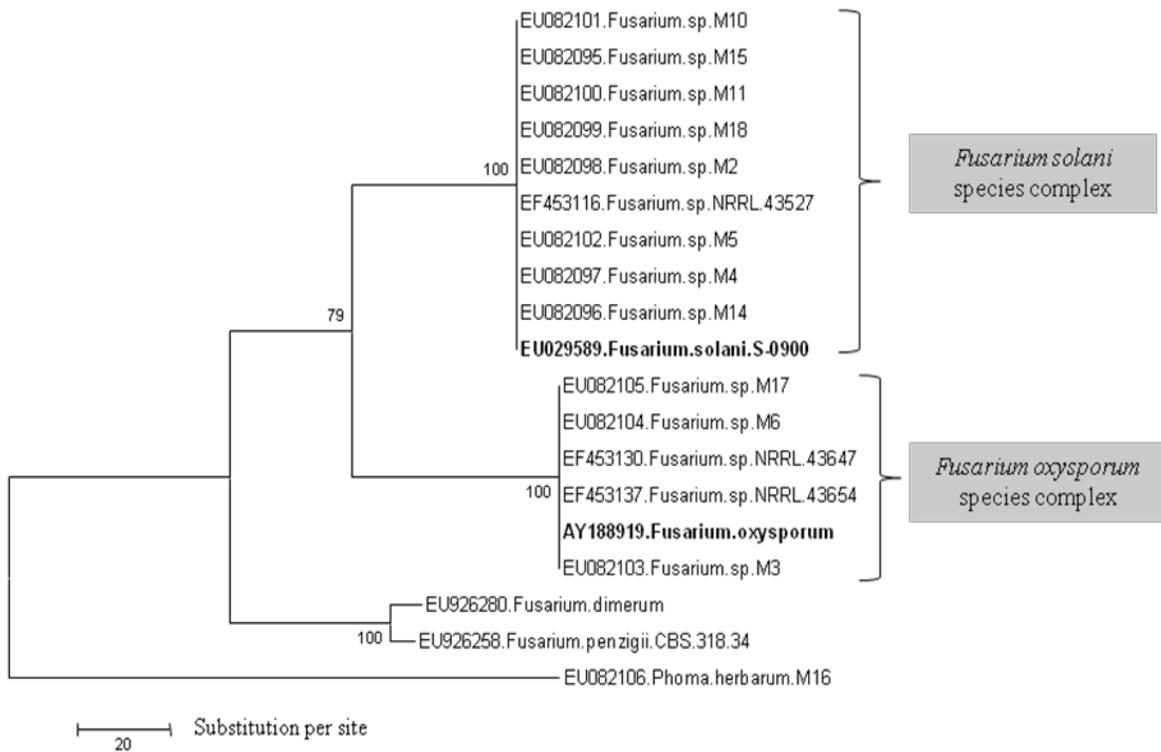


Figura 1. Árbol filogenético, construido con el método de Máxima Parsimonia utilizando 973 pares de bases de la región del Espacio Interno de Transcripción (ITS). Las amplificaciones correspondieron a *Fusarium* species complexes aislados de *Capsicum annum* cv. Poblanos, que mostraron síntomas de marchitez.

Características morfológicas de *F. oxysporum* y *F. solani* species complexes. Después de 10 días de que ambos *Fusarium* spp. se sembraron en medio PDA, *F. oxysporum* tuvo una tasa lenta de crecimiento (menos de 6 cm diám.), el crecimiento aéreo del micelio se observó en forma convexa, el color en todos los aislamientos varió del rosa pálido al púrpura oscuro, con textura algodonosa. Los macroconidios observadas fueron del tipo C, en forma de coma o elipsoidal, con tres o cuatro divisiones dentro de cada célula. Se observaron clamidosporas simples o en pares. Las cepas de *F. oxysporum* species complex pueden presentar alta variabilidad en medio de cultivo en

cuanto a morfología y color. En medio de cultivo PDA, las cepas producen escaso o abundante micelio que puede variar de blanco a violeta pálido. Los macroconidios tienen tres septos en promedio, son cortos a medianos en longitud, lisos o ligeramente curvos. La mayoría de las cepas de *F. oxysporum* producen abundantes clamidosporas, microconidios en gran cantidad de forma arriñonada a oval en cabezas falsas, en monofialides muy cortas y abundantes, con un tamaño de 5-12 x 2,3-3,5 μm y, ocasionalmente, con uno o dos divisiones. Los microconidios pueden formar masas (simulan cabezas), pero nunca cadenas. Los macroconidios tienen de uno a cinco septos y su tamaño puede variar de 23-54 x 3-4,5 μm . Tienen forma de media luna, ligeramente curvadas, con pared fina y delicada. Su célula apical es afilada y la célula basal con forma de pie, pero pueden tener ambos extremos afilados o punteagudos. En la mayoría de los cultivos las clamidosporas son abundantes, son grandes, hialinas, de pared lisa o rugosa y pueden observarse aisladas o en parejas, intercalares o terminales.

En *F. solani*, se observó una tasa de crecimiento más lenta que en *F. oxysporum* (menos de 3 cm diámetro), el crecimiento aéreo del micelio tiene una forma cóncava, el color en todos los aislamientos fue del blanco al amarillo claro, con una textura suave. Los macroconidios fueron del tipo C, de forma elipsoidal, lisas, de estatura media a robusta, con células apicales y basales aplanadas con dos o tres divisiones dentro de cada célula, tienen un tamaño aproximado de 28-65 x 4-6 μm y se observan en menor cantidad que los microconidios y nacen de conidióforos cortos y ramificados que frecuentemente forman esporodoquios, que son las que producen el color crema, azul o azul-verdoso, pero nunca naranja. Presentan entre tres y cinco tabiques y tienen forma de media luna, con la superficie ventral y dorsal paralelas en la mayor parte de su longitud.

La célula apical es corta y redondeada y la célula basal redondeada o claramente con forma de pie. Los microconidios son abundantes y ovoides, pueden tener una división. Su tamaño oscila entre 8-16 x 2-4,5 μm y son producidas en monofiálides alargadas y finas que suelen medir 40-80 x 2,5-3 μm . Las monofiálides nacen lateralmente de la hifa y a veces son ramificadas. Hacia la punta se afilan y presentan collaretes poco definidos. Las clamidosporas son frecuentes, con una pared lisa o rugosa. Se observan aisladas o en parejas, terminales o intercalares y tienen un tamaño de 6-10 μm de diámetro. Todas las descripciones corresponden a las características reportadas para *F. oxysporum* y *F. solani* species complexes (Seifert, 1996; Nelson et al., 1983; Desajardins, 2006).

Prueba de patogenicidad. Las lesiones típicas de marchitez fueron reproducidas con este método en plantas de chile poblano inoculado con *F. oxysporum*, *F. solani* species complexes, y la mezcla de ambos. El desarrollo de la enfermedad inició con pequeñas manchas cafés, las cuales se unían y formaban una sola mancha oscura alrededor de la base del tallo hasta que la planta muere. Los primeros síntomas se observaron a los seis días después de la inoculación. Las plantas testigo no desarrollaron ningún síntoma.

Se verificó la presencia de síntomas internos en las plantas inoculadas como pudriciones leves sobre el tejido de la epidermis, parénquima y haces vasculares; la infección fue confirmada para cada inoculación evaluada. No se observaron diferencias notorias en el desarrollo de las manchas necróticas entre *F. oxysporum* y *F. solani* en la base del tallo y la pudrición suave en los tejidos internos, mientras que en las plantas inoculadas con la mezcla de patógenos, se observaron los síntomas con características similares (Cuadro 1, Fig. 2).

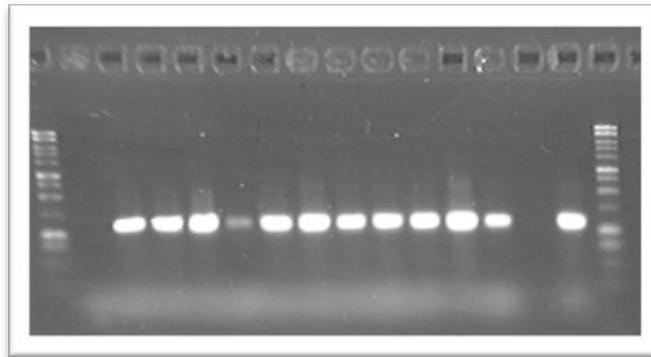


Figura 2. Fragmentos amplificados por PCR para identificar *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

Cuadro 1. Severidad final obtenidas después de 35 días en 25 plantas de chile poblano inoculadas con *Fusarium oxysporum*, *F. solani* species complexes y la mezcla de ambos y un testigo sin inocular.

Aislamiento	Etapas 0 (E0)	Etapas 1 (E1)	Etapas 2 (E2)	Etapas 3 (E3)
<i>F. oxysporum</i> species complex	2	3	6	14
<i>F. solani</i> species complex	1	2	8	14
<i>F.oxysporum</i> - <i>F. solani</i> species complexes	1	2	10	12
Testigo	25	0	0	0

(E0) = plantas sanas, (E1) = con manchas en la base del tallo, (E2) = las manchas se unieron en una sola mancha, y (E3) = plantas muertas.

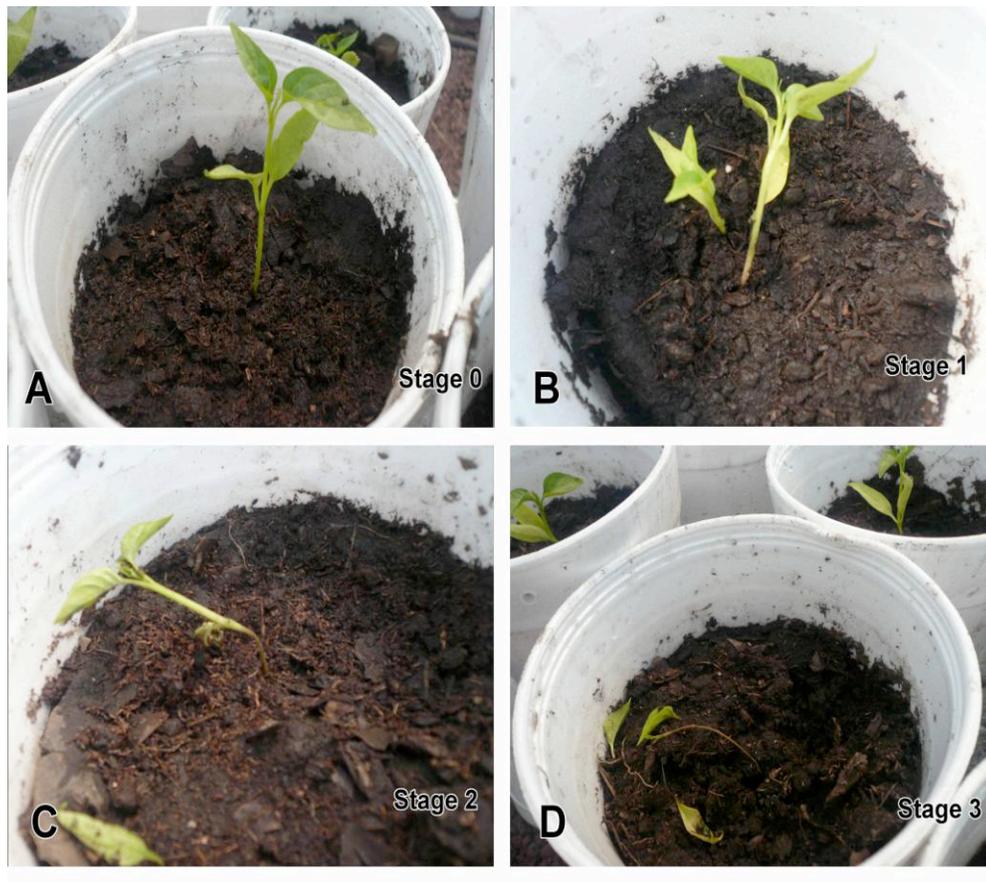


Figura 3. Plantas de chile poblano inoculadas mostrando las diferentes etapas de severidad. A: Etapa cero (E0) = plantas sanas, B: Etapa 1 (E1) = con manchas en la base del tallo, C: Etapa 2 (E2) = las manchas se unen en una sola mancha, y D: Etapa 3 (E3) = plantas muertas.

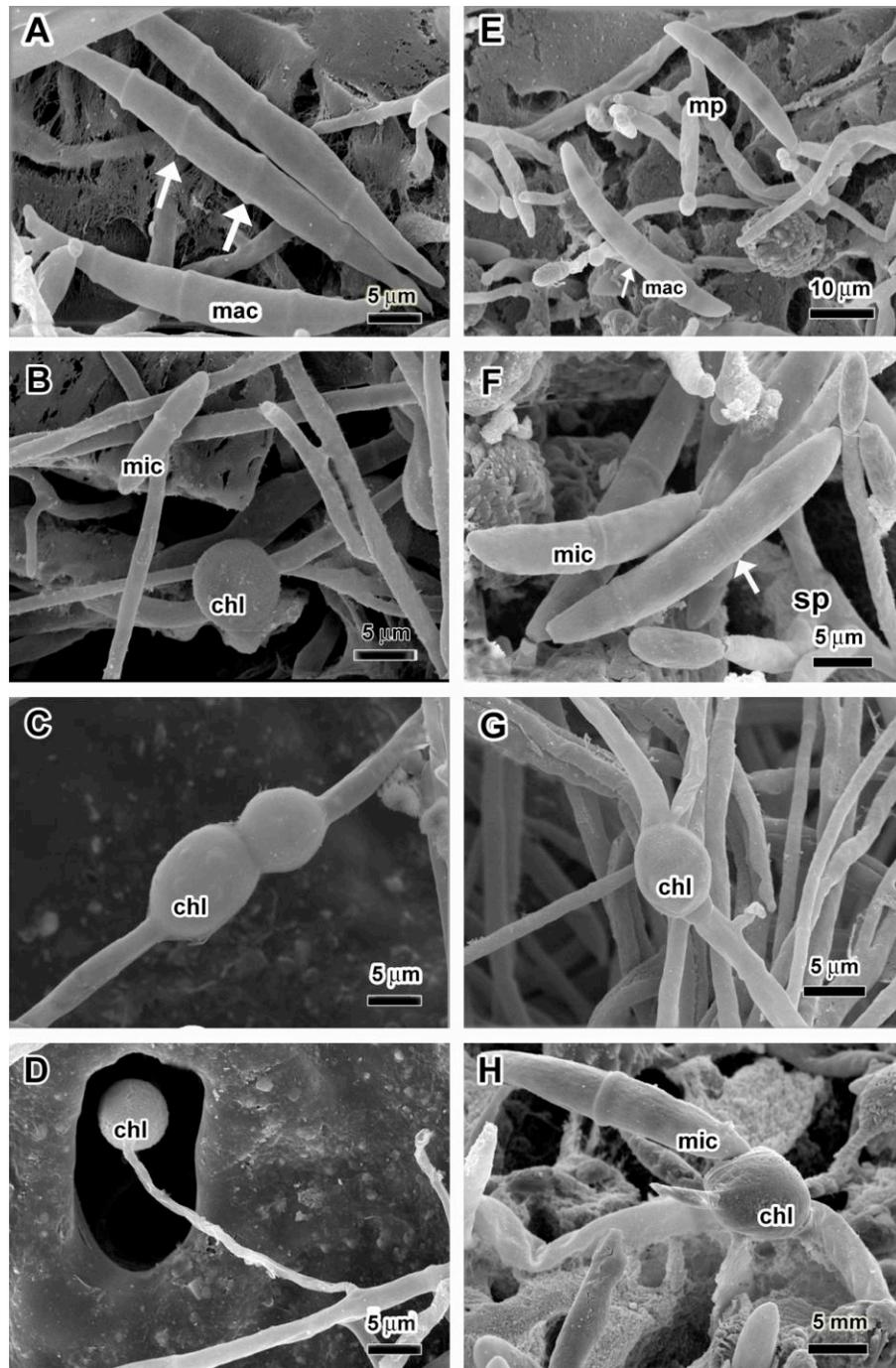


Figura 4. Microestructuras (MEB) de *Fusarium oxysporum* (A-D) y *F. solani* (E-H) species complexes. A muestra macroconidias(mac) con tres o cuatro divisiones entre cada célula, B microconidias (mc) con una sola división y clamidospora (ch) simple, C muestran clamidosporas (ch) en par y D clamidospora simple penetrando poro del medio de crecimiento. E muestra macroconidias (mac) con dos o tres divisiones entre células y mono fiálides (mp) largas, F microconidias (mic) con una división y parte del esporoquicio (sp), G clamidospora (ch) simple y H muestra una microconidia (ch) aún adherida a la clamidospora (chl).

1.6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis filogenéticos de las poblaciones de *Fusarium* spp., actualmente caracterizados, los resultados de los datos moleculares, descripciones morfológicas y pruebas de patogenicidad indicaron que del total de las poblaciones de *Fusarium* spp. de plantas de chile poblano, 40% pertenecen a *F. oxysporum*, y 60% de los aislamientos pertenecen a *F. solani* species complexes; todos los aislamientos fueron considerados poblaciones habitantes en plantas de chile poblano.

Las descripciones morfológicas que se obtuvieron con microscopía de barrido corresponden a las características reportadas para *F. oxysporum* y *F. solani* species complexes.

Los aislamientos F3, F6, F8 y F12 fueron obtenidos del cuello de raíz y corresponden a *F. oxysporum* sp. complex y los aislamientos F2, F4, F5, F10, F11, F14, F15, y F18 de la base del tallo a *F. solani* sp. complex, lo cual indica que encontramos en ubicaciones específicas a los patógenos en estudio y además, en diferente proporción en una misma planta.

1.7 LITERATURA CITADA

- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A., and Waalwijk, C.** 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non monophyletic formae specialis causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., and Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia.
- Coleman, J. J., Rounsley, S. D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., et al. 2009. The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PLoS Genet* 5(8): e1000618. doi:10.1371/journal.pgen.1000618v
- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology. APS press, San Paul, Minnessota, USA.
- FAOSTAT. 2005. URL <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. (Cons.09/2008).
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- Gaitán, G. J. 2001. Diseño de un programa de desarrollo de proveedores de Chiles Secos en Zacatecas, México, como estrategia de integración de la cadena productiva agroindustrial. Programa de Alianzas Estratégicas para el Desarrollo Rural Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Monterrey Nuevo León, México. 30 p.
- García, A. M. 1967. Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana. Limusa-Wiley, S.A. México. 63 p.
- Geiser, D. M., del Mar Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zheng, N., Kulda, G. A., and **O'Donnell, K.** 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. *European Journal of Plant Pathology* 110:473-480.
- Gerlach, W., and Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium*-A pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dhalem* 209:1-406.
- González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M. de J., Santiago-Santiago, V., y Montero-Pineda, A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, el Verde, Puebla. *Agrociencia* 38:653-661.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Katan, T. 1999. Current status of vegetability groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 27:51-64.

- Laborde, C. A. y Pozo-Campodonico, O. 1984. Presente y pasado del chile en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). México, D.F. 80 p.
- Lievens, B., and Thomma, B. P. H. J. 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology* 95:1374-1380.
- Mendoza-Zamora, C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México. 86.
- Nalim, F. A., McGovern, R. J., Elmer, W. H., and Geiser, D. M. 2003. New clades of the *Fusarium solani* species complex associated with tuber rot of caladium. *Phytopathology* 93:S64.
- Nelson, P. E, Toussoum, T. A., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park: Pennsylvania State University Press,
- O'Donnell, K., Klistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998.** Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceeding National of Academic of Science USA* 95:2044-2049.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., Sanchez, S., Geiser, D. M., Juba, J. H., van Burik, J. A., Padhye, A., Anaissie, E. J., Francesconi, A., Walsh, T. J., and Robinson, J. S. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment

length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* 42:5109-20.

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E., and Di Pietro, A. 2004. *Fusarium oxysporum* as multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and animals. *Infect. Immunology* 72:1760–1766.

Pasquali, M. 2003. Molecular Tools for *Fusarium oxysporum* Identification. Doctoral thesis. Università di Torino. Italia. 91p.

Punja, Z. K., and Parker, M. 2000. Development of Fusarium root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22:349-363.

SAGAR. 1999. Anuario estadístico. Anuario Agrícola Nacional. Centro de Estadística Agropecuaria. <http://www.sagar.gob.mx> (Cons. 03/07).

Sholberg, P., O’Gorman, D., Bedford, K., and Lévesque, C. A. 2005. Development of a DNA macroarray for detection and monitoring of economically important apple diseases. *Plant Disease* 89:1143-1150.

Summerell, B. A., Salleh, B., and Leslie, J. F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87:117-128.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology

Evolution 24:1596-1599.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Van der Does, H. C., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J.,
and Rep, M. 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. Environmental

Microbiology 10:1475-1485.

Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M., y Luna-Ruiz, J. de J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-14.

CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE FITOPATÓGENOS EN LA SEMILLA DE CHILE MEDIANTE EL USO DE GENES NUCLEARES

2.1 RESUMEN

Dentro de los patógenos transmitidos por semilla, los hongos son los de mayor importancia económica ya que en condiciones adecuadas para su desarrollo puede ocasionar severas epidemias y pérdidas de las cosechas. Una de las hortalizas más importantes que se cultiva en México es el chile, sin embargo la producción de este cultivo es afectado por patógenos que causan marchitez y otras enfermedades. Por esta razón, se planteó el siguiente trabajo con el objetivo de conocer si semillas asintomáticas de chile poblano son portadoras de fitopatógenos. Durante el ciclo P/V 07 se colectaron frutos de chile procedentes de plantas enfermas para extraer la semilla en tres localidades del Estado de Puebla: Juárez Coronaco, San Miguel Tenguistengo y San Salvador el Verde, y semilla obtenida de un lote experimental ubicado en Juárez Coronaco, en el cuál se evaluaron previamente 5 tratamientos para el control de marchitez: Agrohomeopatía, Guano de murciélago, *Glomus intrarradix*, Control químico tradicional y testigo. Se utilizaron 25 semillas por repetición de cada uno de los tratamientos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio. Se hizo otra replica igual que la primera, pero se procesaron las semillas sin desinfectar. Con el DNA obtenido se amplificó por PCR el Factor de Elongación de la Transcripción 1 α y el gen de la cápside para la detección de geminivirus. De acuerdo a los resultados obtenidos se identificó sobre y dentro de las semillas de chile poblano sin desinfectar a *Fusarium*

oxysporum y *F. solani*, mientras que en el interior de la semilla se encontró a *F. oxysporum* solamente. No se detectó presencia de geminivirus en ninguna de las semillas evaluadas.

Palabras clave: TEF, desinfestación, semilla de chile poblano

2.2 SUMMARY

Within seed-borne pathogens transmission by seed, fungi are the most economically important because under appropriate to their development can cause severe epidemics and crop losses. One of the most important vegetables grown in Mexico is the pepper, but production of this crop is affected by pathogens that cause wilt and other diseases. It has been reported like causal agents of this disease to *Fusarium* spp. For this reason, the following work was made with the aim to know if poblano pepper seeds are asymptomatic carriers of pathogens. During the cycle P/V 07 were collected from diseased plants pepper to remove seeds from three localities of the State of Puebla: Juárez Coronaco, San Miguel Tenguistengo and San Salvador el Verde, and seed obtained from experimental plot located in Juárez Coronaco, that were previously 5 treatment for the control of pepper wilt: Agrohomoepaty, Bat Guano, *Glomus intrarradix*, traditional chemical management and control. 25 seeds per replication of each treatment were utilized, which disinfested with sodium hypochlorite. There was snother replica like the first one, but the seed were processed without sanitizing. With the DNA obtained was amplified for PCR the Translation Elongation Factor 1 α gene

and capsid gene for detection of geminivirus. According to the results identified on and seed poblano pepper without disinfestation to *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, while inside the seed was found to *F. oxysporum* only. Not detected the presence of was detected of geminivirus in the seeds that were testing.

Keywords: TEF, disinfestation, poblano pepper.

2.3 INTRODUCCIÓN

La marchitez de chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las enfermedades que se encuentra presente en casi todas las regiones del mundo donde se cultiva esta hortaliza. En México, se considera como la más importante enfermedad y se ha asociado a un complejo de hongos y oomicetos entre los que destacan *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Pythium* spp., los cuales pueden afectar las plantas individualmente o en combinación (Velásquez y Medina, 2003). Se ha reportado la presencia de marchitez en todos los estados productores de chile donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo (Guigón y González, 2001). Una de las formas de asociación entre el patógeno y la semilla es la que presenta la planta madre cuando el patógeno se mueve a través del sistema vascular, como ocurre con *F. oxysporum* (McGee, 1988). *F. oxysporum* es un parásito del suelo y un agente económicamente devastador de enfermedades causantes de marchitez en un amplio rango de familias de plantas (Umemura et al., 2004).

En el caso de *P. capsici*, el inóculo puede ingresar al fruto a través del pedúnculo, causando una pudrición que se inicia alrededor del cáliz como una mancha verde oscura; la epidermis del fruto pierde su brillo y toma un aspecto acuoso, hasta arrugarse. Las semillas infectadas toman una coloración parda y luego se arrugan (Bustamante, 1999).

Aunque los patógenos que se han reportado como agentes causales de la marchitez se encuentran en el suelo, la mayoría de estos hongos producen estructuras de resistencia (esclerocios, oosporas o clamidosporas) que les permite sobrevivir por periodos prolongados (Velásquez et al., 2002), además es común encontrar patógenos que se transporten sobre o dentro de la semilla (Barros y Teichert, 2005). Dentro de los principales patógenos que se transmiten a través de la semilla se encuentran bacterias y hongos, estos últimos presentes en forma vegetativa, como micelios dentro o en el exterior de la semilla (Valadez, 1985), los cuales van a reducir la calidad de la semilla al portar patógenos que pueden introducirse en áreas donde habían estado ausentes.

Este es un aspecto muy importante dentro del proceso de producción de semillas, la cual involucra la utilización de alta tecnología (Barros y Teichert, 2005) para obtener semillas con la calidad fundamental para la producción moderna de cultivos (Hampton, 2002). Un lote de semillas de alta calidad está libre de semillas contaminantes y de enfermedades, además debe contar con los niveles de germinación y vigor establecido en las normas nacionales e internacionales (Perry, 1978; Finch-Savage, 1995; Hampton, 2002). Sin embargo, se ha presentado dificultad para proporcionar una medida fisiológica consistente del vigor de la semilla, como un indicador del subsiguiente desempeño en campo (Hampton, 2002). Una razón posible para esto es que, más allá del número limitado de patógenos específicos, el rango completo de microorganismos que

habitan en la semilla no se ha tomado en consideración (Noots et al., 1999). Otros, microorganismos no reconocidos puede esperarse que tengan un efecto significativamente perjudicial bajo condiciones de estrés o ser benéficos al desempeño de la semilla en campo bajo condiciones particulares (Dent et al., 2004). Es común observar que algunos lotes de semillas muestren altos niveles de germinación en la prueba de germinación Standard (ISTA, 1999), pero pueden ser lotes de semillas con bajo vigor, cuando se evalúan en condiciones de campo. Para estudiar microorganismos en semillas, se requieren técnicas de alta sensibilidad como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) porque permite identificar un amplio rango de microorganismos y evaluar su contribución a la variación en el desempeño en campo de los lotes de semillas. Solo una pequeña porción de bacterias y hongos en el ambiente han sido caracterizados en laboratorio (Skinner et al., 1952; Kowalchuk, 1999; DeLong y Pace, 2001).

Con el objetivo de determinar la población de microorganismos sobre o dentro la semillas, se estableció el presente trabajo con el fin de detectar si los agentes causales de la marchitez del chile poblano y geminivirus, que se encuentran en las semillas mediante la amplificación de genes nucleares y de la cápside.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de semillas. Se colectaron frutos procedentes de plantas enfermas que mostraron síntomas de marchitez en tres localidades del Estado de Puebla: Juárez Coronaco, San Miguel Tenguistengo y San Salvador el Verde, y semilla obtenida de un lote experimental ubicado en Juárez Coronaco, cultivado en el ciclo P/V 07, en el cuál se

evaluaron 5 tratamientos para controlar marchitez de chile: Agrohomeopatía, Bat Guano, *Glomus intrarradix*, Control químico tradicional y testigo. Se manejaron dos tratamientos: semillas desinfestadas con hipoclorito de sodio al 1.5% y 35% de etanol 96% (V/V) por 5 min, posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente. Se utilizaron 25 semillas desinfestadas y 25 sin desinfectar por cada tratamiento con tres repeticiones.

Extracción de DNA. Se utilizó el kit UltraClean™ Soil DNA Isolation (Mo Bio, USA), para lo cual se pulverizaron 25 semillas de cada uno de los tratamientos. El protocolo para extracción fue el siguiente: Se utilizaron tubos de 2 mL con la solución bead, se agregó la muestra de semilla molida y se agregaron 500 µL de solución de lisis. Se colocaron en el vórtex para mezclar, después se agregaron 60 µL de solución S1 y se agitó en el vortex brevemente, se añadieron 200 µL de la solución IRS (Inhibitor Renoval Solution). Se aseguró con cinta los tubos bead horizontalmente en una cámara plana y se colocaron en un vortex a velocidad máxima durante 25 min., posteriormente se centrifugaron los tubos a 10, 000 X *g* durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, para lo cual se obtuvieron entre 400 y 450 µL, luego se agregaron 250 µL de solución S5 y se colocaron en el vortex durante 5 s. Posteriormente se incubó a 4°C durante 5 min y se centrifugaron los tubos durante 1 min a 10,000 x *g*. Se transfirieron 450 µL de sobrenadante a tubos limpios. Se añadieron 900 µL de solución S3 al sobrenadante y se colocó en el vortex por 5 s. Se cargaron aproximadamente 700 µL en tubos spin filter a 10,000 x *g* durante 1 min, se desechó el fluido que atravesó el filtro y se añadió el sobrenadante restante al tubo spin filter y nuevamente se centrifugó (dos cargas para cada muestra). Luego se agregaron 300 µL de la solución S4 y se centrifugó

durante 10 mins a 10,000 x *g*. Se desechó el fluido que atravesó el filtro y se centrifugó otra vez durante 10 min.

Cuidadosamente se colocó el filtro en un tubo limpio. Finalmente se agregaron 50 µL de solución S5 al centro del filtro de la membrana blanca y se centrifugó durante 10 min luego se desechó el spin filter.

La calidad de DNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con una solución amortiguadora TAE 1x (Tris Acetato-EDTA) a 87 V cm⁻¹ durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹) y las bandas se visualizaron en un transluminador Gel Doc 2000 UV (BIORAD, USA). La concentración de DNA se cuantificó con un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda BIO 10, USA) y se diluyó a 20 ng/µl para las reacciones de PCR.

Amplificación del Factor de Elongación de la Transcripción 1 α (Tef) en la semilla. Para la amplificación de este gen nuclear se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL que contenían 1 x *Taq* buffer DNA polimerasa, 2 µM dNTPs, 20 ng DNA, 10 pmol de cada iniciador EF1 (5'-GCTAACAATCATCTACAGAC-3') y EF2 (5' GACGGATGAGAGAGCAAC-3') y 2 U de *GoTaq* DNA (Promega, USA). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 97°C por 1 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 96°C por 1 min, alineamiento a 61°C por 1 min y una extensión a 72°C durante 1.5 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 7 min.

Identificación de geminivirus en la semilla. Para geminivirus, se amplificó el gen correspondientes a la cápside (o cubierta proteica de los virus) mediante PCR (utilizando oligonucleótidos degenerados), a partir del DNA obtenido con el Kit MoBio. La mezcla

de reacción fue en un volumen total de 25 μ L que contenía: DNA 100 ng, *Taq* DNA polymerasa, dNTP's, Iniciador 1 (AC1048), Iniciador 2 (AV494), MgCl₂, 1 X Buffer DNA polimerasa y agua HPLC. La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa: Una desnaturalización inicial a 95°C por 4 min., posteriormente 35 ciclos son una desnaturalización a 95°C por 1 min., alineamiento a 55°C por 1 min., y una extensión a 72°C por 2 min. Finalmente un ciclo a 72°C por 10 min.

Clonación de Fragmentos. Los fragmentos amplificados con el gen del Factor de Elongación de la Transcripción 1 α , se clonaron usando pGEM®-T Easy Vector System II (Promega, USA). La reacción de ligación se realizó en tubos de 0.5 mL y se preparó un volumen final de 10 μ L conteniendo: 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, pGEM®-T Easy Vector (50ng), el producto de PCR, el control positivo y agua desionizada para completar el volumen. Los tubos se colocaron a 4°C toda la noche para obtener el máximo número de transformantes.

Después de este tiempo se centrifugaron las reacciones de ligación y los tubos se colocaron inmediatamente en un baño de hielo, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, 2 μ L de la reacción de ligación, más 50 μ L de las células competentes *Escherichia coli* JM 109 previamente descongeladas, se dejaron en hielo por 20 min. Posteriormente, se colocaron los tubos a 42°C por 45-50 s e inmediatamente se colocaron en hielo nuevamente. Luego se agregó 950 μ L de medio LB líquido a cada uno de los tubos, se incubaron a 37°C por 1.5 h en agitación, aproximadamente 150 rpm.

Transcurrido este tiempo, se colocaron 100 μ L de cada tubo conteniendo las células transformadas en las cajas de Petri conteniendo agar LB más ampicilina, IPTG y Xgal de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Amplificación del inserto. Después de 24 h de incubadas las placas de Petri se observó el crecimiento de colonias de color azul y blancas. Se seleccionaron las colonias blancas las cuales se tocaron con un tip y se colocó en una mezcla de reacción de 25 μ L conteniendo: 1 x *Taq* buffer DNA polymerasa, 2 μ M dNTPs, 20 ng DNA, 10 pmol de cada iniciador universal M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') y 2 U de Go*Taq* DNA (Promega, USA). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95°C por 4 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 58°C por 1 min y una extensión a 72°C durante 1.5 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 7 min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México); los productos de PCR se verificaron por electroforesis cargando 5 μ L en un gel de agarosa al 1.2%, el gel se tiñó como se describió anteriormente. Los productos de PCR amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para asegurarse de que los resultados fueran confiables, los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones con el Sistema automático de Applied Biosystems model 3730XL (Applied BioSystems, USA).

Las secuencias correspondientes a ambas regiones se ensamblaron utilizando el software BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999); se creó una secuencia consenso para cada aislamiento, la cual se comparó con las secuencias depositadas en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), que encuentra regiones de similitud entre secuencias con alineamientos

significativos, las secuencias consenso de cada aislamiento obtenido se analizó a través de BLASTN 2.2.19 (Zhang, 2000).

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la utilización del kit UltraClean™ Soil DNA Isolation, se obtuvo un DNA de las semillas de excelente calidad para todos los tratamientos realizados (Fig. 1).

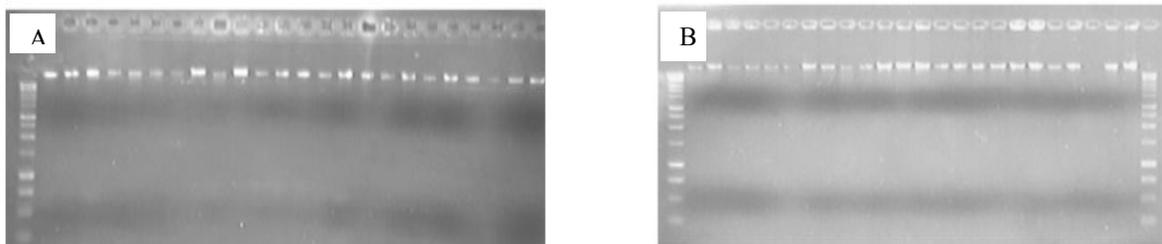


Figura 1. Panel A. DNA de semilla de chile sin desinfectar. Panel B. DNA de semilla de chile desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% y etanol 96° (V/V) 30%. Las semillas fueron obtenidas de tres localidades del estado de Puebla y de un lote experimental establecido en Juárez Coronaco , durante el ciclo primavera-verano 2007.

Con este DNA se realizó la amplificación de una porción del gen Factor de Elongación de la Transcripción 1 α . Asimismo, el vector de clonación pGEM y las células competentes de *E. coli* JM 109 funcionaron eficientemente para la transformación y separación de las hebras de DNA obtenidas durante la amplificación del gen nuclear (Fig. 2).

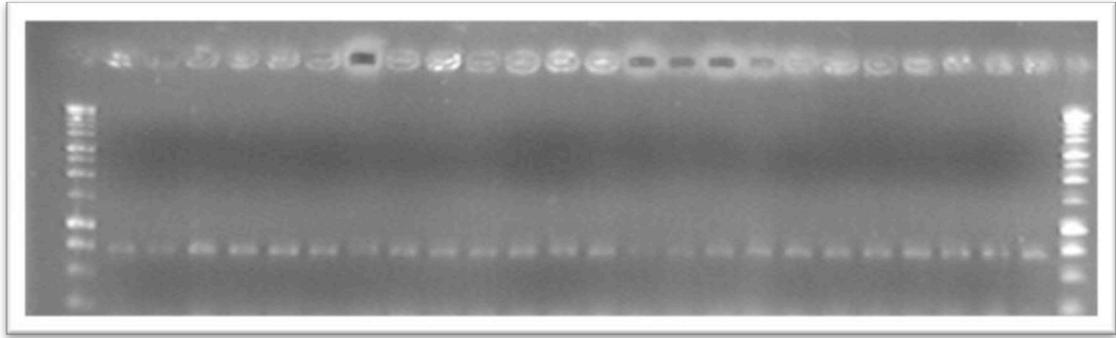


Figura. 2. Amplificación de 750 pares de bases del gen Tef en DNA de semilla desinfectada de chile poblano de tres localidades del estado de Puebla y 5 tratamientos con tres repeticiones.

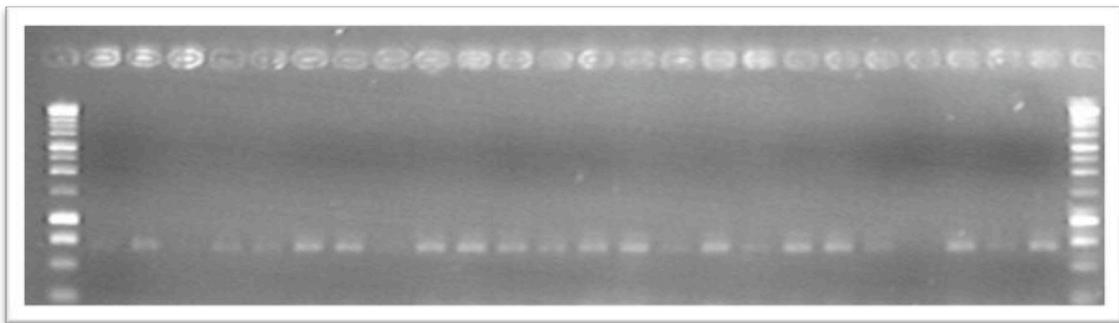


Figura. 3. Amplificación de 750 pares de bases del gen Tef en DNA de semilla sin desinfectar de chile poblano de tres localidades del estado de Puebla y 5 tratamientos con tres repeticiones.

Los resultados de secuenciación indicaron la presencia de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* sobre y dentro de las semillas de chile poblano de semillas sin desinfectar y *F. oxysporum* en las semillas de chile desinfectadas en los cinco tratamientos evaluados. No se observó ninguna amplificación con los iniciadores para detectar geminivirus en la semilla de chile de chile poblano en ninguno de los tratamientos ni en las repeticiones, tal como se esperaba.

2.6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se identificó sobre la semillas de chile poblano sin desinfectar a *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, mientras que en el interior de la semilla se encontró a *F. oxysporum* solamente.

2.7 LITERATURA CITADA

- Barros, C. S., y Teichert, P. S. 2005. Producción de semillas en América del sur. P. 1
In: Seed News. Revista Internacional de Semillas. UPFel. Editora Becker &
Peske Ltda.
- DeLong, E. F., and Pace, N. R. 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea.
Syst. Biology 50:470-478.
- Dent, K. C., Stephen, R., and Finch-Savage, W. E. 2004. Molecular profiling of
microbial communities associated with seeds of *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*
(sugar beet). Journal of Microbiological Methods 56:17-26.
- Finch-Savage, W. E. 1995. Influence of Seed Quality on Crop Establishment, Growth
and Yield. pp. 361-384. In Basra, A.S. (Ed.), Seed Quality. Basic Mechanism
and Agricultural Implications. Haworth Press. USA.
- Guigón, C. y González, P. A. 2001. Estudio regional de la enfermedades del chile
(*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua,
México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:49-56.
- Hampton, J. G. 2002. What is seed Quality? Seed Sci. Technol. 30:1-10.
- ISTA, 1999. International rules for testing, 1999. Seed Sci. Technol. 27 (supplement).

- Kowalchuk, G. A. 1999. New perspectives towards analysis fungal communities in terrestrial environments. *Current Opinion in Biotechnology* 10:247-251.
- McGee, D. C. 1988. Patología de Semillas. Curso Internacional de Capacitación sobre Tecnología de Producción de Semillas de Maíz. CIMMYT. 28 pp.
- Mendoza, A., Salazar, C., Alvarado, O., Cruz, A., y Barrera, H. 2005. Caracterización molecular de razas severas y débiles del virus tristeza de los cítricos. *Ciencia UANL* 8:250-258.
- Mirdha, M. A. U., and Siddique, A. B. M. 1989. Fruit rot of chilli in relation to seed infection. *Seed Research* 17:174-177.
- Noots, I., Delcour, J. A., and Michaels, C. W. 1999. From field barley to malt; detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Critical Review of Microbiology* 25:121-153.
- Nuez, R. J. y Ortega, C. J. 2003. El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies. Ed. Mundiprensa, España.
- Perry, D. A. 1978. Report of the vigour test committee 1974-1977. *Seed Science and Technology* 6:159-181.
- Skinner, F. A., Jones, P. C., and Mollison, J. E. 1952. A comparison of a direct and a plate counting technique for the quantitative estimation of soil microorganism. *Journal Gen. Microbiology* 6:261-271.
- Umemura, M., Tanino, S., Nagatsuka, T., Koga, J., Iwata, M., Nagashima, K., and Amemiya, Y. 2004. Cerebroside elicitor confers resistance to *Fusarium* disease in various plant species. *Phytopathology* 94:813-818.

- Valadez, M. E. 1985. Aspectos generales sobre la patología de las semillas. pp. 115-117. En: Memoria de la Reunión Nacional sobre la Producción Nacional de Semilla en México. SOMEFI.
- Velásquez-Valle, R. y Medina-Aguilar, M. M. 2003. La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte-centro de México. I. Estudios básicos. Folleto Científico No. 14. Campo Experimental Pabellón, CIRNOC - INIFAP. Aguascalientes, México. 26 p.
- Velásquez-Valle, R. Medina-Aguilar, M. M. y Luna-Ruíz, J. de J. 2001. Sintomatología y géneros patógenos asociados con las pudriciones de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:175-181.

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA
INFECCIÓN DE *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* SPECIES COMPLEXES
EN PLÁNTULAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)

3.1 RESUMEN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las hortalizas más importantes en Mesoamérica, su cultivo se ha extendido desde Sudamérica hacia otras regiones del continente, debido a su gran aceptación en los mercados locales e internacionales. En México uno de los tipos de chile con gran demanda y aceptación es el chile poblano, sin embargo, este cultivo es susceptible a varias enfermedades fungosas entre ellas la marchitez es una de las más importantes. Esta enfermedad ha desplazado el cultivo de chile poblano hacia otras áreas geográficas debido a que las pérdidas han alcanzado hasta el 80% de la producción total. Por esta razón se planteó el presente trabajo con el objetivo de evaluar la patogenicidad de los agentes causales de la marchitez y conocer las lesiones que pueden causar a nivel histológico. Durante el ciclo primavera verano 2007 se colectaron plantas con síntomas de marchitez y decaimiento en la región de Juárez, Coronaco, Puebla, se aislaron 13 cepas patogénicas que se identificaron mediante métodos filogenéticos y moleculares como *Fusarium oxysporum* species complex y *F. solani* species complex, los cuales fueron capaces de infectar solas y en combinación plantas de chile poblano, además de causar lesiones en la estructura anatómica del cuello de raíz. Se observó el mayor daño en epidermis y tejidos de conducción de plantas inoculadas con *F. oxysporum*, sin embargo, en las plantas donde se inoculó con *F. solani* fue posible apreciar tejido necrosado por pudrición y presencia

de micro y macroconidias en la región del parénquima y epidermis, pero cuando se observó el tejido infectado con la mezcla de ambos patógenos, solo se observó pudrición en el área de epidermis (periferia de un estoma) y no se presentó destrucción del tejido de las bandas de Caspary.

Palabras clave: *Fusarium* species complexes, marchitez, microscopía de luz, patogenicidad.

3.2 SUMMARY

The pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important vegetables in Mesoamerica, its cultivation has been extended from South America to other regions of the continent, due to its great acceptance in the local and international markets. In Mexico one types of pepper with high demand and acceptance is the Poblano pepper, however, this crop is susceptible to several fungal disease and wilt is one of the most important. This disease has shifted Poblano pepper cultivation to other geographical areas because the losses have reached up to 80% of total production. By this reason, the present work was done with the objective to evaluate the pathogenicity of the causal agents of the wilt and know the lesions that can cause to histological level. During the summer-spring 2007 cycle plants with symptoms of decay and wilt were collected in the region of Juarez, Coronaco, Puebla. Thirteen pathogenic isolations were obtained and they were identified such as *Fusarium solani* species complex and *F. oxysporum* species complex through phylogenetic and morphological approaches. They were capable to infect alone and in combination of Poblano pepper plants and besides caused wounds in the neck root anatomical structure. The greatest damage in epidermis was observed in

plants inoculated with *F. oxysporum*, while in the plants that were inoculated with *F. solani* was possible to appreciate by necrotic tissue decay and presence of microconidias and macroconidias in the region of parenchyma and epidermis, but when infected tissue with the mixture of both pathogens, alone decay was observed only in the area of epidermis (around stoma) and not showed destruction of the Caspary bands.

Keywords: *Fusarium* species complexes, wilt, light microscopy, pathogenicity.

3.3 INTRODUCCIÓN

La marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las enfermedades más importantes que afecta el cultivo en casi todas las áreas dedicadas a la producción de esta hortaliza. Se han descrito como agentes causales del decaimiento de las plantas a hongos del género *Fusarium* spp. y oomycetos como *Phytophthora capsici*, los cuales interactúan en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de estos patógenos. *F. oxysporum* y *F. solani* son dos de las especies de *Fusarium* más patógenas de plantas, afectan un gran número de hospedantes y estas se han diferenciado tradicionalmente usando el término subespecífico de formas especiales; sin embargo los análisis de secuencias de DNA han indicado que algunas formas especiales son mono o polifiléticos (Baayen et al., 2000; O'Donnell et al., 1998; O'Donnell, 2000; Van Etten et al., 2001).

Se han desarrollado varias técnicas para clasificar las cepas de *F. oxysporum* species complex y *F. solani* species complex, incluyendo diversidad de grupos y compatibilidad vegetativa, secuencias de DNA y marcadores moleculares de DNA y poblaciones apareadas (Geiser et al., 2004; Summerell et al., 2003).

Las técnicas basadas en DNA que incluyen la amplificación de genes nucleares ha permitido la precisa identificación de las especies aisladas del síntoma de marchitez en plantas de Chile. Además, las pruebas de patogenicidad han permitido establecer la capacidad de causar infección en plantas de cada una de las especies de *Fusarium* mencionadas. El marchitamiento de las plantas puede ser temporal debido a la rapidez excesiva de la transpiración, o bien, puede ser permanente por la continua pérdida de humedad, sobrepasando el punto de recuperación. Los microorganismos que ocasionan los marchitamientos, ya sea por reducción u obstrucción total de la conducción de agua, pueden ocasionar la enfermedad con carácter permanente (García, 1971). Sin embargo, no se conoce con exactitud el movimiento de estos fitopatógenos dentro de la raíz o el tallo, por lo cual las técnicas de microscopía nos permiten incrementar nuestro conocimiento sobre la interacción de este grupo de patógenos con las plantas hospedantes (Gold et al., 2001).

Estos fitopatógenos ingresan a la planta a través de la raíz primaria que se desarrolla a partir del meristemo radical, en el extremo de la raíz se encuentra la cofia; una estructura que protege el promeristemo radical y facilita la penetración de la raíz en crecimiento en el suelo. Esta estructura está formada por células parenquimáticas que contienen amiloplastos (gránulos de almidón) y controla el crecimiento geotrópico de la raíz. A cierta distancia del extremo de la raíz se encuentran dispuestos de fuera hacia dentro, la epidermis, el cortex radicular y el cilindro vascular. La epidermis se encuentra en la parte más externa de la raíz formada por células con paredes delgadas, careciendo normalmente de cutícula, cerca del ápice radical se producen en la epidermis pelos radicales, a medida que la raíz crece los pelos se secan, mueren y se reemplazan. El cortex radical es una corona cilíndrica formada por células parenquimáticas carentes de

clorofila, en *Capsicum* existen de 6 a 8 capas de células con abundantes espacios intercelulares. En el límite interno del cortex se diferencia una capa de uno o dos estratos de células formando la endodermis. Las paredes radiales y transversales de estas células contienen bandas de Caspary que impiden la difusión de agua y obligan a las soluciones a atravesar el protoplasma de las células endodérmicas, la capa de las bandas de Caspary bloquea el flujo de agua apoplástico y obliga a atravesar las membranas y el citoplasma de las células endodérmicas. El tejido vascular se sitúa en la región más interna de la raíz, conteniendo los tejidos vasculares, en los cuales, el floema transporta los elementos elaborados, mientras que el xilema es el tejido transportador de agua y otros solutos (Nuez y Ortega, 2003).

Con el objetivo de conocer el efecto de las especies de *Fusarium* sobre el sistema radical de plantas de chile poblano, se planteó el presente trabajo para determinar las lesiones que causan a nivel histológico *F. oxysporum* species complex (FOSC) y *F. solani* species complex (FSSC).

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Fusarium* spp. En el ciclo agrícola Primavera-Verano 2007, se colectaron plantas con síntomas de decaimiento y marchitez en la región de Juárez Coronaco, Puebla. Se cortaron de la base del tallo y el cuello de la raíz pequeñas porciones de tejido, los cuales se desinfectaron con una solución de Hipoclorito de Sodio al 1.5% por 5 min, se enjuagaron con agua destilada estéril; posteriormente se colocaron en alcohol etílico 90° (V/V) al 35% por 5 min, finalmente se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Las pequeñas porciones de tejido se secaron dentro de una cámara de

flujo laminar, posteriormente con un bisturí estéril, se seccionó el material vegetal a manera de dejar expuesto el sistema vascular. De esta parte se tomó aproximadamente 0.5 cm² y se colocaron en cajas de Petri conteniendo medio Papa Dextrosa Agar (PDA). A los 5 días se observó el crecimiento micelial y se procedió a purificar con la técnica de punta de hifa.

Incremento de inóculo. Se realizó el incremento de cada uno de los aislamientos en glumas de avena esterilizada (cosechadas en estado lechoso y secadas al momento de utilizarlas). Las glumas se sumergieron en agua caliente durante 2 h y se envasaron en frascos (500 mL), se esterilizó 2 veces durante 2 h a 15 Lb de presión. Una vez fríos los frascos, se cortaron cuadros de PDA de las cajas de Petri donde se sembró cada cepa y se mezclaron con las glumas, se cerraron y almacenaron a temperatura ambiente bajo luz ultravioleta, durante dos semanas para estimular la esporulación. Se extrajeron las glumas de los frascos y se colocaron en recipientes de plástico con agua destilada. Se removieron los conidios de las glumas por efecto de frotación y se filtraron a través de una gasa y con un hematocitómetro se cuantificó la cantidad de conidios; se preparó una suspensión con una concentración de 10⁵ conidios mL⁻¹.

Método de inoculación. Después de que las plantas tuvieron 45 días a la siembra, se procedió a realizar la inoculación de las cepas previamente identificadas por métodos filogenéticos y morfológicos como: *F. oxysporum* y *F. solani* y la mezcla de ambas utilizando la técnica de punta de raíz (Punja and Parker, 2000). Esta técnica consistió en extraer la planta del sustrato después de los cuales se enjuagaron las raíces con agua destilada estéril. Se procedió a cortar las puntas de las raíces secundarias y se sumergieron en la suspensión de macro y microconidios (10⁵) durante 5 min, posteriormente se volvieron a sembrar.

Preparación de las muestras. A los 30 días después de la inoculación, se fijó en fresco en solución FAA la región comprendida entre el tallo y el cuello de la raíz de plántulas inoculadas con FOSC y FSSC y la mezcla de ambos, y se refrigeró durante 24 h. Posteriormente las muestras se enjuagaron tres veces en agua corriente, se realizaron cortes transversales y se colocaron en bolsitas de material poroso las cuales se depositaron en cajas ranuradas pequeñas, después se colocaron en un cambiador de tejidos automático (en el cual se deshidratan las muestras durante periodos de 6 y 4 h en etanol en diluciones al 30, 40, 50, 70, 90 96, y 100%, luego en diluciones 3:1, 1:1 y 1:3 alcohol-xileno y 100% xileno), durante 72 h y se colocaron en parafina¹ a 60°C para eliminar los restos de xilol durante 24 h, después de colocar en parafina² por 24 h más se colocaron finalmente al vacío.

Para realizar los cortes, se colocaron moldes de aluminio rectangulares en una platina caliente donde se coloca parafina derretida, etiquetando las muestras, posteriormente se ponen a enfriar. Luego se corta la parafina en cubos y se montan estos sobre piezas de madera etiquetadoas para identificación. Finalmente, se preparan para realizar los cortes en el micrótopo, esculpiendo la punta donde se ha colocado la muestra en forma de pirámide. Se obtuvieron cortes de 20 micrones para poder observar las hifas, se tiñeron 2 preparaciones con safranina y verde fijo y una sin teñir de cada muestra, cada muestra se colocó y selló en un porta y cubreobjetos, luego se observaron en un microscopio de luz (Sorensen, 1909).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a lo observado en las micrografías se tiene el tejido de la muestra testigo que muestra tejido de epidermis, parénquima, bandas de Caspary y sistema vascular sano (Fig. 1. A-B), en plantas infectadas con *F. oxysporum* se observa la destrucción de las bandas de Caspary y severo daño en cutícula, parénquima y epidermis (Fig. 1 C-D), las plantas que se inocularon con *F. solani* muestran macroconidios en la periferia de la epidermis y en el área del parénquima cercana al tejido necrosado de la epidermis (Fig. 1 E-F) y en la mezcla de ambos, se aprecia que las bandas de Caspary no sufren daño y solo se observa tejido necrosado en periferia de un estoma (Fig. 1 G-H).

En el desarrollo de la enfermedad en estados tempranos, *F. oxysporum* actúa probablemente como filtro para asimilados del hospedante, como el almidón. Este es un estado biotrófico, establecido por el hongo a través de la inducción de células de transferencia en el hospedante, más bien por el ingreso intracelular del haustorio del hongo dentro de esas células. La fase biotrófica termina cuando la biomasa del hongo ha incrementado, en una extensión del hongo degradando la pared celular con enzimas o el daño por toxinas en el tejido colonizado. Las reacciones de defensa del hospedante seguirán, tal como la infusión y el engrosamiento interno de paredes con fenoles. Eventualmente, estas estructuras también son degradadas. La ventaja ecológica de tal estrategia de colonización es obvia. Comparados con necrotrófagos, los hongos con una fase biotrófica transitoria son capaces de absorber y utilizar la mayoría de los nutrientes del hospedante sin competencia por otros hongos de suelo o bacterias. Se desconoce si

otras formas patogénicas de *F. oxysporum* también tienen una fase biotrófica transitoria (Summerell et al., 2002).

Se observa daño en el área de la epidermis, evidentemente la primera estructura vegetal de la periferia del tallo es la cutícula, la primera barrera superficial que se abre para que los hongos patogénicos como *F. oxysporum* y *F. solani* puedan invadir y colonizar a sus hospedantes. La cutina es el mayor componente de la cutícula de las plantas y puede hidrolizarse por la serina esterasa cutinasa (Crowhurst et al., 1997)

En las plantas de Chile poblano a las cuales se les realizó el muestreo se observó el marchitamiento de las plantas, el cual fue causado por *F. oxysporum* y *F. solani*. Este marchitamiento se produjo por la dificultad para que el flujo de agua se distribuya en la planta, esta dificultad se debe a la presencia de agentes patógenos que incrementan la resistencia hidrodinámica para que el agua pase a través de la lumina, este incremento de resistencia es causada por la presencia de geles, micelio, esporas, vasos colapsados y tilosas. En plantas de tomate infectadas por *Fusarium*, se ha observado un incremento en la resistencia al flujo de agua en el floema, en este estudio se ha demostrado que esta resistencia es suficiente para inducir la marchitez de las hojas. Además, los polisacáridos coloidales, producto de pectinas, celulosa y pigmentos melanoidales pueden ser atrapados en las membranas.

El intercambio de agua entre los vasos y la redistribución de agua dentro de la planta, como consecuencia, se reducen. La presencia de los patógenos en los vasos es considerado algunas veces causa de marchitez, el micelio contribuye a la obstrucción, pero no como único responsable al incremento de resistencia al flujo de agua a través de los vasos (Goodman et al., 1986).

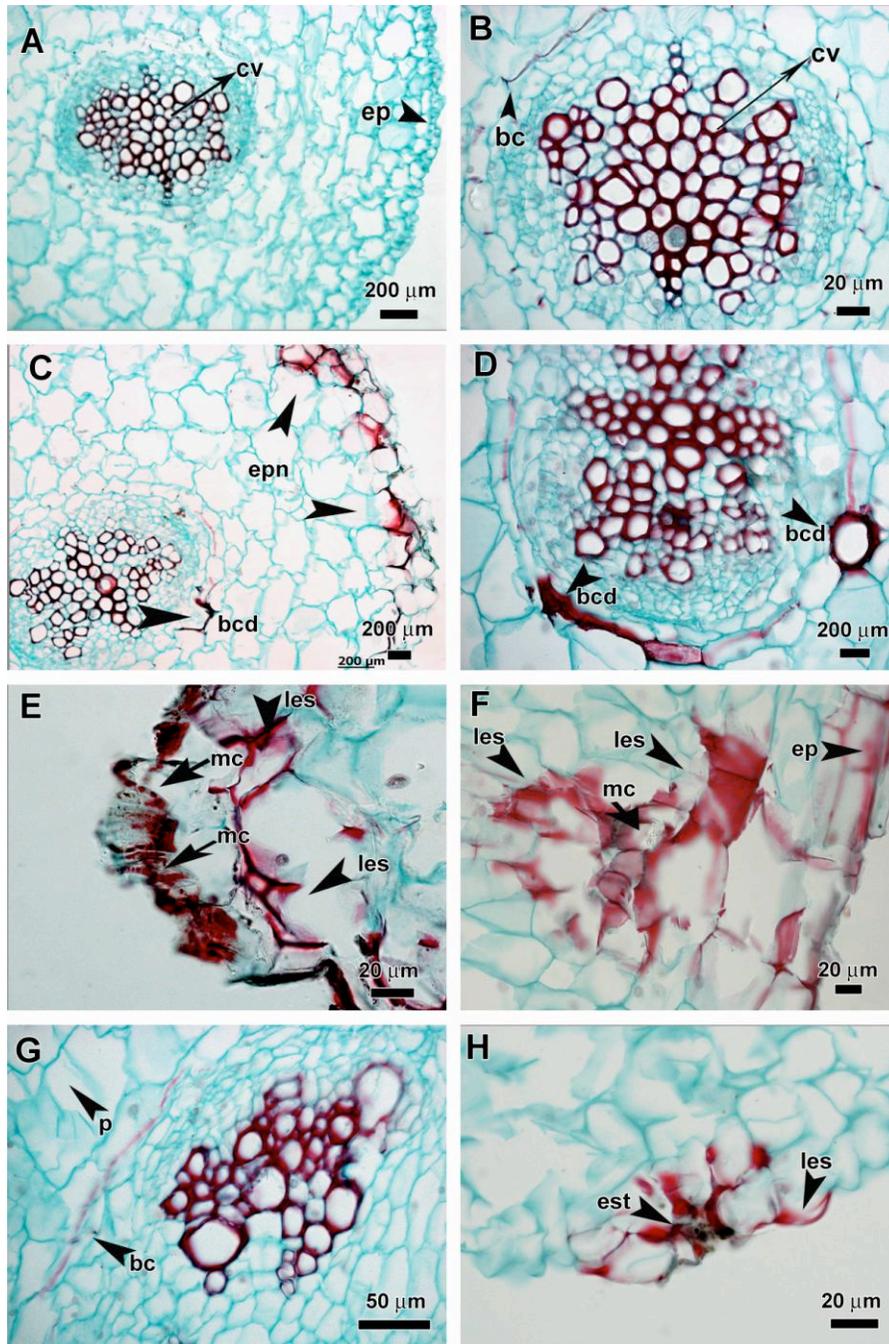


Figura 1. Microfotografías de cortes transvesales del área del cuello de raíz de plantas de chile poblano, A y B son el testigo, muestran tejido sano de epidermis, parénquima, bandas de Caspary y haces vasculares, C y D, se inocularon *Fusarium oxysporum* species complex, muestran tejido necrosado en la epidermis y bandas de Caspary, E y F, se inocularon con *Fusarium solani* species complex, muestra tejido epidérmico con pudrición y (E- F) se observa la presencia de macroconidias y microconidias. G y H se inocularon con la mezcla de ambos aislamientos, no se observó daño en bandas de Caspary, solo en la región de la epidermis, en la periferia de un estoma.

Para el caso de las especies de FOSC y FSSC se comprueba que ambas especies son capaces de causar lesión en el sistema radical y que estas cepas patogénicas son capaces de causar el declinamiento y marchitez del chile poblano.

3.6 CONCLUSIONES

Se evaluaron cepas patogénicas de *F. oxysporum* y *F. solani* species complexes en plantas de chile poblano, el daño en la estructura anatómica en el cuello de raíz se observó mediante microscopía de luz.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó mayor daño en epidermis y tejidos de conducción de plantas inoculadas con *F. oxysporum*, sin embargo, en las plantas donde se inoculó con *F. solani* fue posible apreciar tejido necrosado por pudrición y presencia de micro y macroconidias en la región del parénquima y epidermis, pero cuando se observó el tejido infectado con la mezcla de ambos patógenos, solo se observó pudrición en el área de epidermis (periferia de un estoma) y no se presentó destrucción del tejido de las bandas de Caspary.

3.7 LITERATURA CITADA

Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M.,
Roebroek, E. J. A., and Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP
analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non

- monophyletic formae specialis causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900.
- Crowhurst, R. N., Binnie, J. S., Bowen, K. B., Hawthorne, T. B., Plummer, M., Rees J. R., Rikkerink, A. E., and Templeton, D. M. 1997. Effect of disruption of a cutinase gene (*cutA*) on virulence and tissue specificity of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 toward *Cucurbita maxima* and *C. moschata*. *MPMI* 10:355-368.
- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology. APS press, St. Paul, Minnesota USA.
- García-Álvarez, M. 1971. Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana. Limusa-Wiley, S.A. México. 63 pp.
- Geiser, D. M., Jimenez-Gasco, M. del M., Kang, S., Makalowska, I., **Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zheng, N., Kuldau, G. A., and O'Donnell, K.** 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110:473-480.
- Gold, S. E., García, P. M., and Martínez, E. A. 2001. New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology* 39:337-365.
- Nuez, R. J. y Ortega, C. J. 2003. El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies. Ed. Mundiprensa, España.
- Punja, Z. K., and Parker, M. 2000. Development of *Fusarium* root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium*

oxysporum f. sp. *radicis-cucumerinum*. Canadian Journal of Plant Pathology 22:349-363.

Goodman, N. R., Király, Z., and Wood, K. R. 1986. The Biochemistry and Physiology of Plant Disease. Missouri. 433 p.

O'Donnell, K., Klistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceeding National of Academic of Science USA 95:2044-2049.

O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* – *Fusarium solani* species complex. Mycologia 92:919-938.

Seifert, K. 1996. *Fusarium* Interactive Key. Agriculture. and Agri - Food. Canada. P. 65.

Sorensen, S. P. 1909. Enzymstudien. II. Mittheilung. Über die messung und die Bedeutung der wasserstoffionen-konzentration bei enzymatischen progressen. Biochem. Z. 21:131-200.

Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., and Burgues, L. W. 2002. *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 392 p.

Summerell, B. A., Salleh, B., and Leslie, J. F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease 87:117-128.

Vanetten, H., Temporini, E., and Wasmann, C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: Why is it not required by all pathogens? *Physiological Molecular of Plant Pathology* 59:83-93.

CAPÍTULO 4. ALTERNATIVAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.) EN PLANTAS AFECTADAS POR MARCHITEZ

4.1. RESUMEN

La enfermedad conocida como marchitez del chile es causada por un complejo de hongos fitopatógenos, principalmente *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*. El chile poblano es una hortaliza afectada durante el ciclo de producción por esta enfermedad. En el estado de Puebla, considerado centro de origen, el cultivo de chile ha disminuido en los últimos años, debido a que las pérdidas han alcanzado hasta un 70% de la producción. En el presente estudio se evaluaron alternativas de control en invernadero en los ciclos P/V 07, utilizando los siguientes tratamientos: Agrohomeopatía (fitonosodes a base de semillas de plantas enfermas con dinamizaciones 30C y 60C, 30 gotas de cada uno por litro de agua, 200 succusiones, aplicando 5 mL por planta), micorrizas (*Glomus intrarradix* 60 esporas en 5 g de sustrato por planta), Guano de murciélago procesado (Fertiguano, 3 ml L⁻¹ en presentación líquida y 5 g de sustrato sólido por planta) comparados con un tratamiento químico (Ac. Fosfónico, Benlate 1.2 mL por planta), y un testigo (sin aplicación). Todos los tratamientos (excepto *G. intrarradix* que se aplicó al momento de la siembra y después del trasplante), los demás tratamientos se aplicaron en forma periódica desde el momento de la siembra en almácigo hasta el final de la evaluación (105 días). Las plantas se inocularon al momento del trasplante (45 días) con *P. capsici* (P) a una concentración de 10⁶ zoosporas por mL de la cepa Nuevo México, *F. oxysporum* species complex (FO) y *F. solani* species complex (FS) se inocularon a una concentración de 10⁵ conidios por ml,

aislados de plantas enfermas de la región de Juárez Coronaco, del Estado de Puebla, Méx. Los resultados observados demuestran que los tratamientos alternativos permiten la sobrevivencia de la planta aún en presencia de los fitopatógenos causantes de marchitez de chile.

Palabras clave: Agrohomeopatía, guano de murciélago, *Glomus intrarradix*, chile poblano

4.2 SUMMARY

The disease known as wilt pepper is caused for a complex of mitosporic fungal pathogens, mainly *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. The poblano pepper crop is a vegetable affected during the production cycle for this disease. In the Puebla state, considered the center origin, the cultivation of poblano pepper has decreased in recent years, because the losses have reached up to a 70% of the production. In the present study control alternatives in a greenhouse in the spring summer 0'7 cycles, using the following treatments: Agrohomeopatya (fitonosodes from seeds of diseases plants with energizing 30C and 60C, 30 drops of each one per liter of water, 200 sucusiones, applying 5 mL by plant), micorrizas (*Glomus intrarradices* 60 spores in 5 g of substrate per plant), bat Guano processed (Fertiguano, 3 ml L⁻¹ in liquid presentation and 5 g of solid substrate per plant) compared with a chemical treatment (Phosphonic acid and Benlate 1,2 mL per plant), and a control (without application). All the processing (except *G. intrarradix* that applied at the time of planting and after transplattation), the other treatment were periodically from the time showing in nursery

to the end of the evaluation (105 days). The plants were inoculated at trasplanting (45 days) with *P. capsici* (P) at concentration of 10^6 zoosporas by ml of the New stump Mexico, *F. oxysporum* species complex (FO) and *F. solani* species complex (FS) they were inoculated to a concentration of 10^5 conidias per ml, isolated from diseased plants in the region of Juárez Coronaco, of Puebla satate, Méx. The observed results in demonstrate that all alternative treatments allow the plant to survive even in the presence of the pathogens causing wilt of pepper.

Key words: Agrohomeopatía, guano de murciélago, *Glomus intrarradix*, chile poblano

4.3 INTRODUCCIÓN

La importancia de la enfermedad marchitez de chile en México se debe a que en condiciones favorables, causa pérdidas económicas al afectar del 60 al 100% de la superficie cultivada. En Aguascalientes y San Luis Potosí se tienen pérdidas hasta del 80% y estados donde la superficie de siembra de chile se ha reducido un 60% por causa de la marchitez (SAGAR, 1999). En la región de San Martín Texmelucan, Puebla se observaron síntomas de marchitez y reducción de la producción de hasta 70% (González et al., 2004).

P. capsici fue primero descrito por Leonian (1922) como el principal agente causal de marchitez de *Capsicum annum* L. (chili pepper) en Nuevo México, Estados Unidos. (Erwin and Ribeiro, 1996), otros fitopatógenos como *Fusarium* spp.se han reportado también como agentes causales de marchitez de chile en México desde 1967 (García,

1971). En el cultivo de Chile, se han observado daños con incidencia y severidad variable por infecciones de *Fusarium oxysporum*, provocando daños vasculares que originan marchitamientos y muerte de plantas y por *Fusarium solani* que causa pudrición de raíz y cuello, que dan como consecuencia la marchitez y muerte de la planta. (Mendoza, 1996).

El marchitamiento de las plantas puede ser temporal debido a la transpiración excesiva, o permanente por la continua pérdida de humedad. Los microorganismos que ocasionan los marchitamientos por reducción u obstrucción total de la conducción de agua, pueden ocasionar la enfermedad con carácter permanente (García, 1971).

El creciente interés por un control seguro de plagas que protejan el ambiente y el problema de desarrollo de resistencia, que ocasiona el incremento de las dosis de plaguicidas, implica muchos esfuerzos para desarrollar métodos de control biológico de patógenos de plantas (Erwin and Ribeiro, 1996).

De acuerdo con lo anterior, es necesario buscar alternativas de control para marchitez, una de ellas es la agrohomeopatía se ha reportado que tiene el potencial de incidir en el proceso agrícola de forma directa a través de la aplicación en el agua de riego de dosis mínimas infinitesimales (Ruíz, 2001), tiene dos estrategias para el control de las plagas y enfermedades e incremento de biomasa, una de ellas es el uso de los fitonosodes, la otra es el uso de sustancias que en dosis cuantificables generen determinados síntomas, los cuales podrán revertirse con el uso en dosis infinitesimales dinamizadas (Ruíz *et al.*, 2001).

El Guano de murciélago es una alternativa viable para controlar enfermedades, pues entre sus propiedades se ha registrado como reconstituyente y depurador de suelo,

fungicida, nematicida y activador de abono orgánico. En una comparación entre fertilizantes orgánicos para la producción de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K), (estiércol de caballo, vaca, cerdo, oveja, aves de corral y sonteta de hormiga), el Guano de murciélago resulto ser el más rico en macroelementos, pues contiene 11.73 de N, 7.42 de P y 1.57 de K en ppm, junto con los todos los oligoelementos menores, necesarios para la salud de la planta (El-Hage et al., 2003; Jácome y Amo, 1999).

Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) como *Glomus intrarradix*, presentes en el suelo, forman relaciones simbióticas con las raíces de la mayoría de las plantas, su asociación beneficia la nutrición, crecimiento y sobrevivencia debido a que incrementan la explotación de los nutrientes del suelo. Se ha demostrado que el establecimiento de hongos MA en la raíz de las plantas reduce el daño causado por patógenos presentes en el suelo con el aumento de resistencia en plantas micorrizadas. Los hongos MA generalmente reducen la severidad de las enfermedades de las plantas para varios cultivos, se sugiere que pueden usarse como herramienta potencial en el manejo de enfermedades (Sayeed and Siddiqui, 2008).

Entre los químicos que se emplean para el control de marchitez se ha probado la habilidad del ácido fosfónico en forma de fosfonato en plantas para inhibir diferentes estados del ciclo de vida de *Phytophthora ramorum*. Aunque no todas las especies de *Phytophthora* son igualmente sensibles a todos los ingredientes activos, el fosfito tiene efecto directo sobre todos los oomycetos, que al entrar al tejido de la planta activa la formación de fitoalexinas (Garbelotto et al., 2009). Se ha reportado a Benomil como fungicida específico para *Fusarium* spp. en el control de la enfermedad de la pudrición de la raíz de chile campana (Simons et al., 1990).

Los intentos por controlar esta enfermedad han tenido logros parciales o nulos, la tendencia se centra en obtener cultivares resistentes mediante mejoramiento genético (Guigón y González, 2001), más es también indispensable evaluar alternativas de control que permitan delinear el vasto marco de investigación.

En el presente estudio se evaluaron alternativas de control para marchitez en chile poblano (*Capsicum annuum* L.) y se compararon con un tratamiento químico convencional y dos testigos inoculados y sin inocular.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético. Se utilizó semilla de chile poblano variedad San Luis tratada con fungicida cúprico (manzate). La semilla se sembró en almácigo, a los 15 días de la siembra se trasplanto en vasos de unicel de 250 mL de capacidad con distancia de 5 cm entre ellos; se utilizó sustrato estéril (15 lb durante 3 h) en siembra y trasplante.

Obtención de inóculo. Para *Phytophthora capsici* L. se utilizó la cepa Nuevo México proporcionada por el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, el incremento de la cepa se realizó en medio agar jugo V8 y ácido Láctico, el crecimiento de micelio se mantuvo a una temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 2 meses. Se cortaron discos (1.0 cm), los cuales se colocaron en cajas petri con 50 ml de agua destilada esterilizada (15 lb durante 45 min) en luz blanca (48 a 72 h), cuando se observó la cantidad suficiente de esporangios, las cajas de Petri se expusieron a 4°C por 15-30 min (para inducir liberación de zoosporas, fuente de inóculo) y se observó al estereoscopio este proceso. Cuando el aislamiento alcanzó la liberación de la mayoría de zoosporas, se

contó el número de ellas con un hematocitómetro. La concentración se ajustó 10^6 zoosporas mL^{-1} . Desde la liberación de las zoosporas a la inoculación el tiempo fue menor a 2 h.

Para *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se utilizaron los aislamientos obtenidos de plantas enfermas en la región de Juárez Coronaco, registrados en la base de datos NCBI, (Accesión EU082106, EU082105, EU082104 EU082103, EU082102, EU082101, EU082100, EU082099, EU082098, EU082097, EU082096, EU082095).

El incremento del aislamiento se realizó en glumas de avena esterilizada (cosechadas en estado lechoso y seco al momento de utilizar). Las glumas se sumergieron en agua caliente durante 2 horas y se envasaron en frascos (500 mL), se esterilizó 2 veces durante 2 hrs en cada ocasión a 15 Lb. Una vez fríos los frascos, se cortaron cuadros de PDA de cajas petri donde se sembró cada cepa y se mezclaron con las glumas, se cerraron y almacenaron a temperatura ambiente bajo luz ultravioleta para estimular la esporulación durante dos semanas. Se extrajeron las glumas de los frascos y se colocaron en recipientes de plástico con agua destilada. Se removieron los conidios de las glumas por efecto de frotación y se colaron a través de una gasa y con el hematocitómetro se midió la concentración de 10^5 conidios mL^{-1} .

Siembra e inoculación. Luego de que las plantas tuvieron 45 días a la siembra, se procedió a aplicar el inóculo, para *F. oxysporum* y *F. solani* se utilizó la técnica de punta de raíz (Punja and Parker, 2000), en la cual se extrajo la planta del sustrato, se enjuagó en agua destilada estéril, se cortaron las puntas de las raíces secundarias y se sumergieron en la suspensión de macro y microconidios (10^5) durante 5 minutos, posteriormente se volvieron a sembrar: *P. capsici* (10^6) se aplicó a las plantas mediante

un orificio de 1.5 cm de profundidad en suelo circundante a la raíz ,después de la inoculación se regó a saturación. Cuando se aplicó la mezcla de los tres patógenos se inoculó primero *F. oxysporum* y *F. solani* y después *P. capsici*. Luego de la inoculación se monitoreo de forma continua la sintomatología que presentaban las plantas.

Escala de evaluación de los tratamientos. Se utilizaron seis fechas de evaluación (10 días entre cada fecha a partir de la fecha presencia de síntomas), se evaluaron cuatro tratamientos como alternativas de control y un testigo para cada tratamiento, la fecha de aplicación fué uniforme para todos los tratamientos. Se evaluaron cuatro etapas de desarrollo de la enfermedad de acuerdo a la siguiente escala: E0= plantas sanas; E1= plantas con síntomas (necrosis apenas visible en la base del tallo); E2= plantas con necrosis evidente en la base del tallo; E3= plantas con necrosis y ahorcamiento en la base del tallo y hojas dobladas y E4= plantas completamente muertas o marchitas. La severidad se evaluó con la fórmula de Townsend and Heuberger (1943):

$$P = \frac{\Sigma (n \times v) \times 100}{4 N}$$

P = grado de ataque

n = número de plantas de cada categoría

v = valor numérico de cada categoría

N = número total de plantas

Aplicación de los tratamientos. Los hongos micorrízicos *Glomus intrarradix* fueron proporcionados por el Área de microbiología, IRENAT. Del Colegio de Postgraduados, Montecillo. México, la cual estaba contenida en tezontle al 90% de colonización, 1200 esporas por 100 g de sustrato, para obtener la cantidad de inóculo recomendado (60 esporas por planta) se pesaron 5 g de sustrato y se mezclaron con el suelo esterilizado a utilizar en el almácigo un día anterior a la siembra y se mantuvo a punto de saturación antes de la siembra. Al momento del trasplante se extrajo la planta con la mayor cantidad posible de sustrato mezclado.

Se utilizó el fertilizante a base de guano de murciélago FERTIGUANO®, cuyos componentes se enlistan a continuación: Nitrógeno 15%, Fósforo 10%, Potasio 15%, Calcio 2%, Magnesio 5%, Azufre 5%, Hierro 1.5%, Cobre 0.5%, Boro 0.01%, Manganeso 0.05%, Zinc 0.05%, Cobalto 0.01%. Ácidos húmicos, Ácidos Fúlvicos, Acéticos, Málico, Pescado Hidrolizado, Polifenoles, Carboxílicos, Oligosacaridos y Algas Marinas. Microorganismos presentes en la fórmula: Rhizobacterias pgpr (promotoras del crecimiento vegetal): 10,000ufc/g. Hongos Micorrizicos: *Glomus intrarradix*: 1000 esporas/g *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azospirillum brasilense*, *Spirulina* producida por el alga

Anabaena (Verde-Azul). c.b.p. Leonardita y adherentes. Se utilizó la fórmula sólida mezclando 5 g de sustrato por planta al momento de la siembra, posteriormente se diluyeron 3 mL de la fórmula líquida en un litro de agua y se asperjaron 5 mL de esta dilución al sustrato y luego al follaje una vez por semana hasta finalizar la evaluación. Al momento del trasplante se extrajo la planta con la mayor cantidad posible de sustrato mezclado.

Para Agrohomeopatía, se preparó la tintura madre en una solución de alcohol puro entre 45° y 60° grados. En el alcohol se colocaron las semillas de frutos de plantas con síntomas de marchitez, según el protocolo de Tichavsky, (2007), se prepararon dos fitonósodes 30C y 60C. La dinamización se preparó en un recipiente aséptico de 1.0 L de agua destilada estéril, se agregaron 30 gotas de cada dinamización y se realizaron 200 succiones; (movimiento vigoroso ascendente-descendente, que consiste en golpear sobre una superficie firme la mezcla durante 2 minutos o 200 agitaciones). Después de succionar se asperjaron 5 ml por planta. Este tratamiento se aplicó desde el momento de la siembra hasta terminar la evaluación, cuando la planta emergió se aplicó al follaje y al sustrato. La aplicación se realizó una vez por semana. En control químico se preparó una mezcla líquida de ácido Fosfónico (7 ml L^{-1}) y Benlate (0.5 g L^{-1}) asperjando desde el momento de la siembra, al sustrato y posteriormente al follaje 1.2 mL por planta. Al testigo sin inocular se le aplicaron los tratamientos y al testigo inoculado se le aplicaron los 3 patógenos y la mezcla entre ellos.

Diseño experimental y arreglo de los tratamientos para inoculación. Se utilizó un diseño factorial bloques al azar con 5 tratamientos por 3 fitopatógenos y la mezcla entre ellos, *Phytophthora capsici* (P), *Fusarium solani* species complex (FS) y *Fusarium oxysporum* species complex (FO) en forma individual y la mezcla de ellos como sigue: *Phytophthora capsici* (P), *Phytophthora capsici-Fusarium oxysporum* (PO), *Phytophthora capsici-Fusarium solani* (PS), *Phytophthora capsici-Fusarium oxysporum-Fusarium solani* (POS), *Fusarium oxysporum* (FO), *Fusarium solani*(FS), *Fusarium solani-Fusarium oxysporum* (FOS). U. E. con 4 repeticiones de 10 plantas por repetición por tratamiento. En total se utilizaron 1000 plantas, el arreglo de los tratamientos se ilustra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Arreglo de los tratamientos para las alternativas de control de *Fusarium* species complexes y *Phytophthora capsici* durante 2008.

Inoc/ Trat.	P	PO	PS	FO	FS	POS	FOS
AGH	AGH-P	AGH-PO	AGH-PS	AGH-FO	AGH- FS	AGH-POS	AGH-FOS
	BG-P	BG-PO	BG-PS	BG-FO	BG-FS	BG-POS	BG- FOS
G	G-P	G-PO	G-PS	G-FO	G-FS	G-POS	G-FOS
Q	Q-P	Q-PO	Q-PS	Q-FO	Q-FS	Q-POS	Q-FOS
T	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-

Análisis estadístico. Se realizó el análisis estadístico con el paquete estadístico SAS Ver. 9.0 con el procedimiento Modelo Lineal General (GLM) multivariado (MANOVA) para realizar comparaciones entre tratamientos y determinar al más sobresaliente y se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) para las variables evaluadas peso seco y altura de planta.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cuadros 2 y 3 se muestran los resultados del MANOVA para la prueba a través del tiempo de severidad e incidencia respectivamente, con la prueba de Lambda de Wilk transformada como una aproximación de F. Se detectaron diferencias significativas para todos los efectos: tiempo, tiempo*tratamiento, tiempo*inóculo y tiempo*tratamiento*inóculo para cada variable, con un $\alpha= 0.05$.

No se evaluaron los datos de los testigos sin inocular (5 y 9) debido a que solo registraron valores de cero, que indicaban plantas sanas, pero si se tomaron en cuenta para el ANOVA de peso seco y altura de planta.

Cuadro 2. Criterio de la prueba de MANOVA para evaluar severidad.

EFFECTOS	LAMBDA DE WILKS	VALOR DE F	PROBABILIDAD DE F
TIME	0.18488102	87.30	<0.0001
TIME*TRAT	0.33164865	6.50	<0.0001
TIME*INOC	0.56055584	2.07	<0.0010
TIME*TRAT*INOC	0.22564068	1.45	0.0035

Cuadro 3. Criterio de la prueba de MANOVA para evaluar incidencia.

EFFECTOS	LAMBDA DE WILKS	VALOR DE F	PROBABILIDAD DE F
TIME	0.04063567	467.46	<0.0001
TIME*TRAT	0.01076842	48.08	<0.0001
TIME*INOC	0.31112178	4.50	<0.0001
TIME*TRAT*INOC	0.08837082	2.61	<0.0001

En el Cuadro 4. se muestran los resultados del ANOVA para evaluar las variables Peso seco y Altura de planta, en los cuales se encontraron diferencias significativas para tratamiento, inoculo y tratamiento*inóculo con un $\alpha= 0.05$.

Cuadro 4. Cuadrados medios del ANOVA para peso seco y altura de planta.

FV	G.L.	PESO SECO	ALTURA DE PLANTA
TRAT	4	125435.136*	152831.1242*
INOC	8	81502.708*	18137.9875*
TRAT*INOC	32	49107.014*	16946.1812*
ERROR	131	2481.146	419.921
Coef. Var.		63.36603	57.10418
R ²		0.890711	0.959859

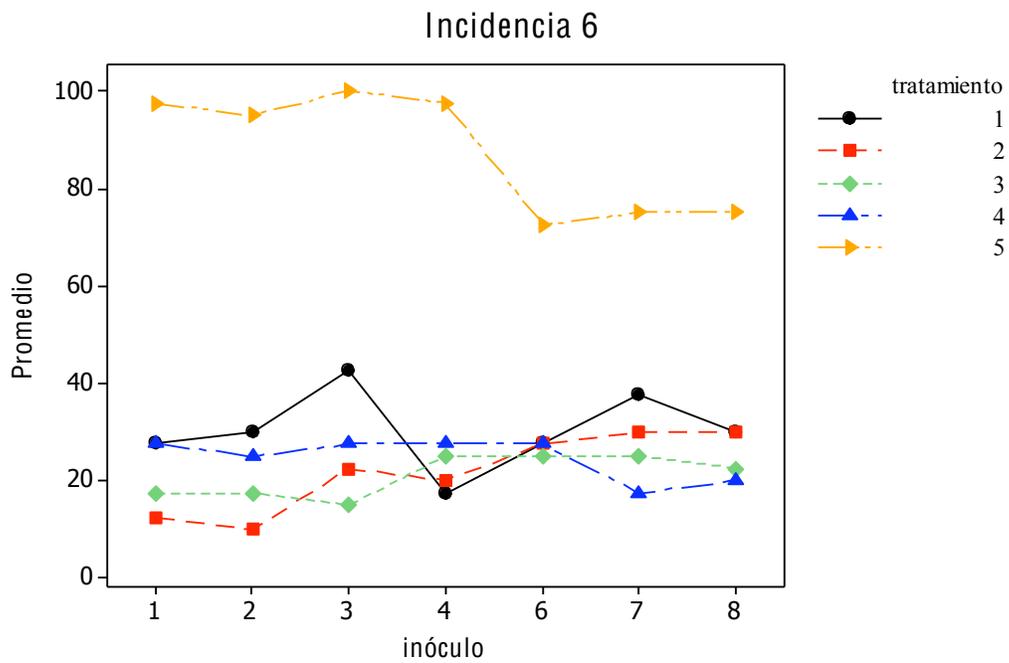


Figura 1. Evaluación de incidencia (%) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo de la fecha 6.

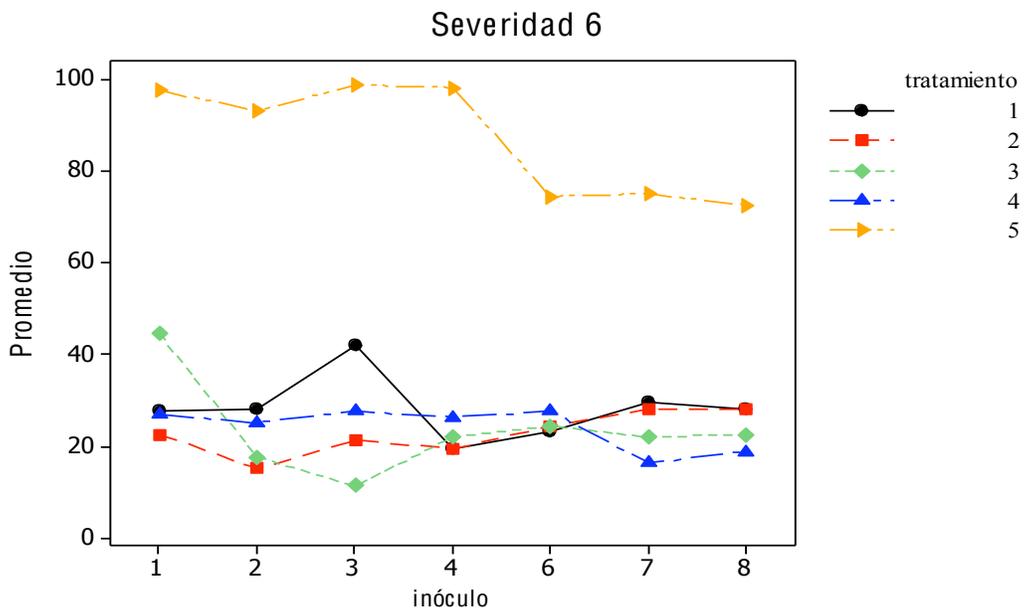


Figura 2. Evaluación de severidad (%) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo de la fecha 6.

En las Figuras 1 y 2 se observan graficados únicamente los datos obtenidos para la incidencia y severidad de la fecha 6 (en %), el Testigo inoculado (►) muestra la máxima incidencia y severidad para (1) *Phytophthora capsici* (P) cercana al 100%, y en menor porcentaje (75%) en las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* (FO), *F. solani* (FS) y la mezcla de (FSO).

El tratamiento más sobresaliente que mostró menor incidencia y severidad con P fue guano de murciélago (■ BG), seguido del tratamiento con un comportamiento similar destaca también el de Agrohhomeopatía (◆AGH). La micorriza *Glomus intrarradix* (● Glom) fue el tratamiento que mostró mayor incidencia y severidad con PSO y menor para FS y FSO, se observó un comportamiento similar con el tratamiento químico (▲ Q).

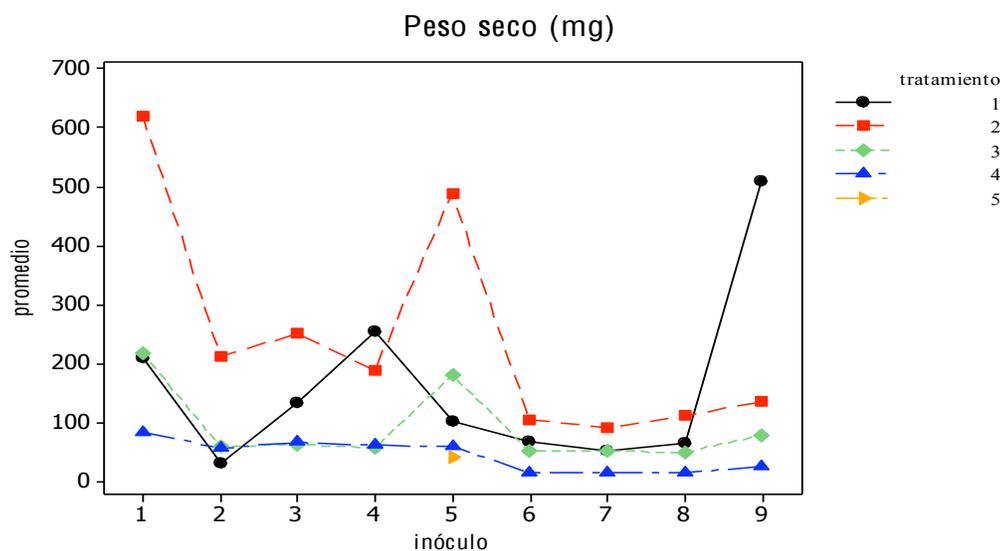


Figura 3. Evaluación del peso seco (mg) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo en la fecha 6.

Para la evaluación de peso seco (Fig. 3) BG (■) mostró mayor acumulación de materia seca en las plantas inoculadas con P (600 mg) y el tratamiento Glom (●) en el testigo sin inocular (9), los demás tratamientos muestran un comportamiento promedio de 100 a 200 mg de acumulación de materia seca.

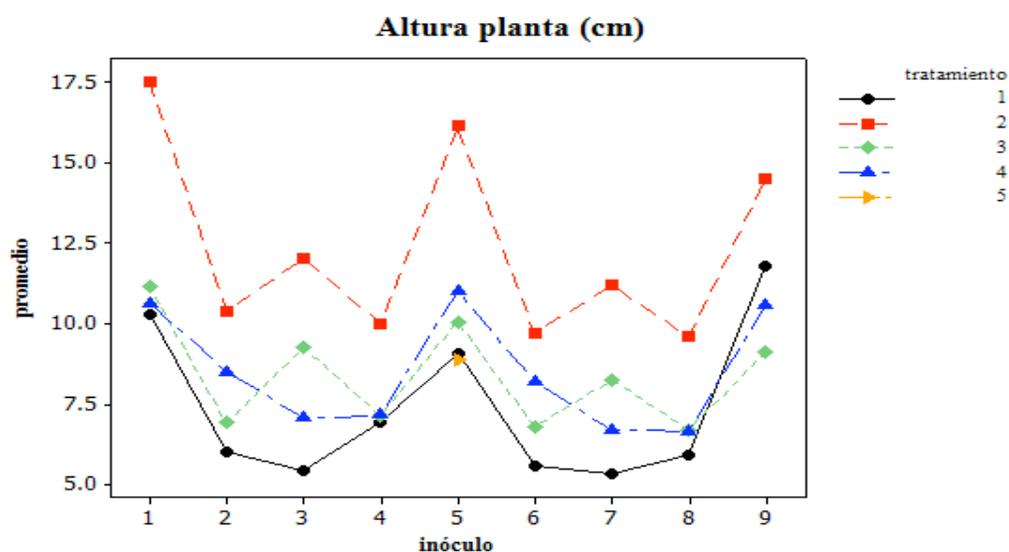


Figura 4. Evaluación de altura de planta (cm) de las plantas inoculadas a las que se aplicaron los tratamientos evaluados solo en la fecha 6.

Para altura de planta (Fig. 4) el tratamiento que mostró mayor altura de planta en todas las plantas inoculadas fue BG (■), la altura de planta más alta se registró para las plantas inoculadas con P, seguidas por las plantas a las que se les aplicó el tratamiento sin inocular (5 y 9). Para los demás tratamientos se observa un comportamiento similar, alturas de planta entre 5 y 12 cm.

Son conocidas las propiedades del guano de murciélago, entre otras características, por su acción fungicida y su alto valor nutricional para las plantas (El-Hage et al., 2003; Jácome y Amo, 1999), se sugiere además que los guanos son ricos en “microbios bio-remediadores” que cooperan en la desintoxicación del suelo, de ser así, el guano sería una enmienda excelente, sin embargo, no se ha encontrado información que sustente lo anterior (Kuepper, 2003); por lo que se deduce que este es el primer reporte que proporciona información sobre la capacidad fungicida del guano de murciélago, pues según los resultados obtenidos, reduce la severidad e incidencia de plantas de chile poblano inoculadas con *Phytophthora capsici*, principal agente causal de la marchitez del chile, además de la mayor acumulación de materia seca y máxima altura de planta observados en este trabajo.

Agrohhomeopatía obtuvo un porcentaje de severidad e incidencia promedio comparado con los demás tratamientos evaluados, incluido el tratamiento químico, mostró una respuesta favorable en contraste con el testigo inoculado, lo que concuerda con los resultados reportados en diferentes cultivos que validan la capacidad de agrohhomeopatía para modificar el crecimiento, comportamiento de la planta y el control de enfermedades conocidas (Khanna. y Chandra, 1976; Khanna, y Chandra, 1978, Rivas et al., 1996).

Se desconoce el mecanismo de defensa que la planta desarrolla a través de las aplicaciones periódicas del tratamiento, pero es posible que una vez que el patógeno inicia la infección en las plantas de chile poblano tratadas con agrohhomeopatía, esta podría activar en la planta mecanismos genéticos de resistencia o desarrollar cambios en su estructura anatómica, engrosando su cutícula o produciendo más ceras, que

detuvieran el crecimiento intercelular de las hifas, se sugiere realizar análisis fisiológicos para saber si la planta produce tales reacciones genéticas y anatómicas a partir de la aplicación de agrohomeopatía que reduzcan la patogenicidad de *P. capsici*, estudios morfológicos e histológicos en el tejido de plantas inoculadas para determinar si produce cambios estructurales en cutícula, epidermis u algún otro órgano vegetal

Una de las razones de la relativa marginación de la agrohomeopatía consiste en que se basa en experiencias prácticas, aunque se han realizado varios intentos, no existe aún una teoría generalmente aceptada, que pueda explicar su funcionamiento (Guajardo, 1996; Benveniste et al., 1992).

4.6 CONCLUSIONES

Los métodos alternativos de control de marchitez: Guano de murciélago, agrohomeopatía y *Glomus intrarradix* permiten la sobrevivencia de las plantas en igual porcentaje de severidad e incidencia aún en presencia de los patógenos que el tratamiento Químico, siempre y cuando estos se apliquen de forma periódica y según las indicaciones desarrolladas en este trabajo.

Los valores menores de incidencia y severidad se mostraron en las plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* a las que se aplicó el Guano de murciélago, y con este mismo tratamiento, la mayor acumulación de materia seca y altura de planta.

4.7 LITERATURA CITADA

- Benveniste, J., Aissa, J., and Litime, M. H. 1992. Transfer of the molecular signal by electronic amplification. *FASEB J.* 8:2304 (Abstract).
- El-Hage, S. N., and Hattam, N. 2003. *Agricultura Orgánica, Ambiente y Seguridad Alimentaria*. FAO. Roma. 253 pp.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 562 pp.
- García-Álvarez, M. 1971. *Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana*. Limusa-Wiley, S.A. México. 63 pp.
- Garbelotto, M., Harnik, T. Y., and Schmidt, D. J. 2009. Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* *in vitro* and *in planta*. *Plant Pathology* 58:111–119.
- Guigón-López, C. y González-González, P.A. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49–56.
- González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M. de J., Santiago-Santiago, V., y Montero-Pineda, A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, el Verde, Puebla. *Agrociencia* 38:653-661.

- Guajardo-Bernal, G. 1996. Modelos biocibernéticos para explicar la curación en homeopatía. *Boletín Mexicano de Homeopatía* 29:4-10.
- Jácome-González, A. y Amo-Rodríguez, S. 1999. Agricultura y Sociedad en México : Diversidad, Enfoques, Estudios de Caso. Plaza y Valdés eds. México. 333 pp.
- Khanna, K. K., and Chandra, S. 1976. Effect of some homeopathic drugs on the spore germination of four isolates of *Alternaria alternata*. *Indian Phytopatology* 29:95.
- Khanna, K. K., and Chandra, S. 1978. Homeopathic drugs controls fruit rot caused by *Pestalotia mangiferae* Henn. *Experientia (Basel)* 34:1167.
- Kuepper, G. 2003. Manures for Organic Crop Production Soil Systems Guide ATTRA-Nacional Sustainable Agricultura Information Service. In: Fayetteville AR. Agriculture Specialist. URL: <http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/manures.pdf>
(Cons: 10 11 06).
- Mendoza-Zamora, C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México. 96 pp.
- Punja, Z., and Parker, M. 2000. Development of Fusarium root and stem rot, new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22:349-363.
- Rivas, E., Ceceña, C., y Guajardo, G. 1996. Acción de 9 fármacos homeopáticos sobre la germinación de esporas de *Alternaria solani* y semillas de trigo y tomate. *Boletín Mexicano de Homeopatía* 29:44-46.

- Ruiz-Espinoza, F. J., Castro-Inzunza, S. y Curtis-Patiño, J. F. 2001. Posibilidades de uso del método homeopático en la agricultura. Revista Cuadernos de Centros Regionales No. 24. Chapingo, México. 33 pp.
- Ruiz-Espinoza, F. 2001. Agrohhomeopatía: una opción ecológica para el campo mexicano. LA Homeopatía de México 70:110-116.
- Sayeed, A., M., and Siddiqui, A. Z. 2008. Sustainable Agriculture and Forestry. Book series. 97 pp.
- SAGAR. 1999. Anuario estadístico. Anuario Agrícola Nacional. Centro de Estadística Agropecuaria. (Cons. 03/07). URL: <http://www.sagar.gob.mx>
- Simons, J. N., Simons, J. E., and Simons, J. L. 1990. Control of *Phytophthora* crown rot in bell pepper with directed sprays of metalaxyl. Proc. Fla. State Hort. Soc. 103: 120-121.
- Tichavsky, R. 2007. Manual de Agrohhomeopatía. 1ª ed. Instituto Comenius. Secretaría de Desarrollo Social. Monterrey, NL. México. 78 pp.
- Townsend, G. R., and Heuberger, J. W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Disease Reporter 27:340-343.