



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Evaluación de la presencia de *Phytophthora capsici*
en la pudrición de la raíz del chile habanero
(*Capsicum chinense* Jacq.) cultivado en la Península
de Yucatán**

Tesis que presenta

Carlos Alberto Sánchez Borges

En opción al título de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado de Carlos Alberto Sánchez Borges titulado Evaluación de la presencia de *Phytophthora capsici* en la pudrición de la raíz del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivado en la Península de Yucatán, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 24 de Octubre de 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Carlos Alberto Sánchez Borges

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán y forma parte del proyecto titulado **“Fortalecimiento de la Cadena de Valor del Chile Habanero de la Península de Yucatán Mediante el Establecimiento de su Sistema Alimentario”**, bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por el apoyo y la oportunidad de realizar el trabajo de investigación de la presente tesis.

Al Posgrado de Ciencias Biológicas por brindarme las herramientas necesarias para la formación como Maestro en Ciencias.

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por brindarme sus instalaciones y equipos necesarios para la tesis.

A CONACYT por la beca No.546921.

A al proyecto FORDECYT 173407, Fortalecimiento de la Cadena de Valor del Chile Habanero de la Península de Yucatán Mediante el Establecimiento de su Sistema Alimentario

Al Dr José Juan Zúñiga Aguilar por darme la oportunidad de trabajar en su grupo.

Al M. en C. Ramón Souza por la paciencia enseñanzas en la estancia de la tesis.

Al Dr Jairo Cristóbal Alejo y a M. en C. Felicia Amalia Moo Koh por el apoyo y proporción de material.

Al Dr Ignacio Islas Flores y a M. en C. Ligia Brito Argáez por las enseñanzas, apoyo y proporción de equipos.

Al Dr Crecencio de la Cruz Aguilar Castillo por proporción de datos y puntos de colectas.

A mis amigos de posgrado y del laboratorio 26 por su amistad y apoyo incondicional.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mi madre Leydi Graciela, por brindarme su amor, cariño y comprensión, sin pedir nada a cambio, me lo ha dado todo y me ha formado lo que soy hoy en día.

A mi Padre Rafael Cesar, por su trabajo duro para darnos sustento, por ser el ejemplo de constancia y perseverancia que lo caracterizan, por su apoyo incondicional siempre en los peores momentos.

A mis Hermanos, por estar siempre conmigo ayudándome desde siempre, estando ahí en todo momento de mi vida.

A mis Abuelos por estar presentes en todo momento y enseñarme lo que es alegría en la vida.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| CAPITULO I. | 1 |
| ANTECEDENTES GENERALES..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 El chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)..... | 2 |
| 1.1.1 Origen y distribución del chile habanero. | 2 |
| 1.1.2 Importancia económica 2 | 2 |
| 1.1.3 Características y clasificación taxonómica del Chile Habanero | 4 |
| 1.1.4 Principales enfermedades del chile habanero..... | 5 |
| 1.1.4.1 Enfermedades de origen viral | 5 |
| 1.1.4.2 Enfermedades de origen fúngico..... | 5 |
| 1.1.4.3 Otras enfermedades..... | 6 |
| 1.1.5 Los oomicetos | 6 |
| 1.1.5.1 Generalidades de los oomicetos..... | 6 |
| 1.1.5.2 Clasificación Taxonómica de <i>Phytophthora capsici</i> | 9 |
| 1.1.6 Enfoques moleculares para la detección de oomicetos en plantas..... | 10 |
| 1.3 JUSTIFICACIÓN | 12 |
| 1.4 HIPÓTESIS | 13 |
| 1.5 OBJETIVO GENERAL | 14 |
| 1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. | 14 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| 1.7 | ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 15 |
| CAPITULO II | | 17 |
| 2.1 | INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| 2.2 | MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 2.2.1 | Extracción de ADN genómico..... | 19 |
| 2.2.2 | Amplificación Ypt1 por PCR punto final | 19 |
| 2.2.3 | Purificación de micelio de <i>P. capsici</i> a partir de tejido vegetal enfermo. | 20 |
| 2.2.4 | Caracterización patológica de los aislados. | 21 |
| 2.3 | RESULTADOS..... | 23 |
| 2.4 | DISCUSIÓN..... | 31 |
| CAPITULO III | | 33 |
| 3.1 | INTRODUCCIÓN..... | 33 |
| 3.2 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 34 |
| 3.2.1 | Extracción de ADN genómico..... | 34 |
| 3.2.2 | Diseño de cebadores para <i>Alternaria</i> sp..... | 34 |
| 3.2.3 | TEF1 como Marcador Molecular para el género <i>Fusarium</i> | 34 |
| 3.2.4 | Procesamiento de muestras y PCR de punto final..... | 35 |
| 3.3 | RESULTADOS..... | 36 |
| 3.4 | DISCUSIÓN..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO IV | 41 |
| 4.1 INTRODUCCIÓN | 41 |
| 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS | 42 |
| 4.2.1 Determinación de lugares de colecta en la Península de Yucatán. | 42 |
| 4.2.2 Análisis estadístico. Muestreo aleatorio simple y selección de tamaño muestra | 43 |
| 4.3 RESULTADOS | 45 |
| 4.3.1 Evaluación de los cebadores diseñados para amplificar ADN de <i>P. capsici</i>, de <i>Fusarium spp</i> y de <i>Alternaria spp</i>. | 45 |
| 4.3.2 Procesamiento de muestras y PCR de punto final | 47 |
| 4.3.3 Distribución de <i>Phytophthora capsici</i>, y del consorcio causante de la pudrición de la raíz del chile habanero en la Península de Yucatán. | 47 |
| 4.4 DISCUSIÓN | 49 |
| CAPITULO V | 51 |
| 5.1 CONCLUSIÓN | 51 |
| 5.2 PERSPECTIVAS | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA | 53 |
| ANEXOS | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1.1 | Ciclo biológico de <i>Phytophthora</i> spp..... | 8 |
| Figura 1.2 | Estrategia experimental..... | 15 |
| Figura 2.1 | Método de superposición para aislamiento de <i>P. capsici</i> | 21 |
| Figura 2.2 | Evaluación de los cebadores para la amplificación de marcadores moleculares de <i>Phytophthora capsici</i> | 23 |
| Figura 2.3 | Postulados de Koch. Primera parte..... | 25 |
| Figura 2.4 | Postulados de Koch. Segunda parte parte | 26 |
| Figura 2.5 | Identificación molecular de <i>P. capsici</i> | 27 |
| Figura 2.6 | Secuencia nucleotídica del amplicón de <i>P. capsici</i> (ITS)..... | 28 |
| Figura 2.7 | Búsqueda tipo BLAST en la base de datos NCBI. | 28 |
| Figura 2.8 | Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de ITS con las 10 secuencias con las que tiene mayor similitud. | 29 |
| Figura 2.9 | Árbol filogenético de <i>P. capsici</i> | 30 |
| Figura 3.1 | Cebadores para amplificación específica de ADN genómico del género <i>Alternaria</i> | 36 |
| Figura 3.2 | Cebadores para la amplificación específica de ADN genómico por PCR directo en <i>Alternaria alternata</i> | 37 |
| Figura 3.3 | Cebadores para la amplificación específica de ADN genómico de <i>Fusarium solani</i> | 37 |
| Figura 3.4 | Evaluación de los cebadores para la amplificación por PCR directo en plantas colectadas en uno de los estados de la península de Yucatán. ... | 38 |
| Figura 4.1 | Lugares de colecta en la Península de Yucatán..... | 42 |
| Figura 4.2 | Evaluación de los cebadores para la amplificación por PCR directo en <i>P. capsici</i> | 45 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 4.3 | Evaluación de los cebadores para la amplificación por PCR directo de ADN genómico de <i>Fusarium solani</i>. | 46 |
| Figura 4.4 | Evaluación de los cebadores para la amplificación de ADN de <i>Alternaria</i> a partir de micelio y de tejido directamente. | 46 |
| Figura 4.5 | Distribución geográfica de microorganismos presentes en el consorcio causante de la Pudrición de la Raíz en la Península de Yucatán. | 47 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Cuadro 1.1 | Estadísticas de Producción de Chile Habanero a nivel nacional en el año 2014..... | 2 |
| Cuadro 1.2 | Estadísticas de Producción de Chile Habanero en la Región Sureste del País en el año 2014..... | 3 |
| Cuadro 3.1 | Componentes de la reacción de PCR Directo..... | 35 |
| Cuadro 3.2 | Protocolo de PCR directo recomendado. | 15 |
| Cuadro 4.1 | Resultados de la detección molecular de fitopatógenos asociados a la Pudrición de la Raíz del Chile Habanero en la Península de Yucatán..... | 21 |

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ITS: Internal Transcribed Spacer (Espaciador transcrito interno, por sus siglas en inglés)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés)

RPB2: RNA polymerase II subunit B150 (Subunidad B150 de la ARN Polimerasa II, por sus siglas en inglés)

SRR: Simple Sequence Repeat (Repetición de Secuencia Simple, por sus siglas en inglés)

TEF1: Translation elongation factor-1 alpha (Factor-1 alfa de elongación de la traducción, por sus siglas en inglés)

Ypt1: Yeast Protein Two-1 (Proteína Dos de Levadura-1, por sus siglas en inglés)

RESUMEN

Con relación al cultivo comercial del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), solo en algunas partes de México se han hecho pruebas moleculares para determinar la incidencia de los patógenos causantes del “Marchitamiento por Phytophthora” o la “Pudrición de la Raíz”. La mayoría de los estudios se restringen al aislamiento e identificación fisiológica y bioquímica de cepas a partir de tejido enfermo. Reportes basados en este último tipo de estudios sugieren que el “Marchitamiento por Phytophthora” o la “Pudrición de la Raíz” causadas por el oomiceto *Phytophthora capsici* no se encuentran presentes en la Península de Yucatán. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se emplearon técnicas moleculares para conseguir una detección más precisa de la incidencia de *P. capsici* en las plantas con sintomatología del “Marchitamiento por Phytophthora” o la “Pudrición de la Raíz”, que se presentan en la Península. Para ello, se amplificó mediante PCR un fragmento del gen Ypt1, el cual es un marcador molecular específico para identificar a la especie *P. capsici*. El estudio comprendió la colecta de tejidos infectados en los cultivos de chile habanero de sitios representativos de los Estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Los tejidos fueron colectados durante la temporada de lluvia cuando se presenta la mayor incidencia de enfermedades de este tipo. También se evaluó molecularmente la incidencia de los géneros *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp., amplificando un fragmento del gen TEF1, el cual es un marcador molecular para la identificación de estos dos géneros. Como resultado se encontró que a pesar de la percepción generalizada, basada en las condiciones agroclimáticas adversas para su proliferación, *P. capsici* sí se encuentra presente en tejidos enfermos en plantas cultivadas en dos estados de la Península, ya sea de manera aislada o formando consorcios con *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. Los resultados sugieren que la presencia del patógeno *P. capsici* puede ser el resultado de actividades humanas, pues se encontró en invernaderos que producen plántulas para el trasplante. La composición de los consorcios causantes de la “Pudrición de la Raíz” fue variable, pues además de las combinaciones de dos o más patógenos, en algunas solo se encontró ya sea a *Fusarium* spp. o a *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp. no se encontró de manera única en ninguna planta colectada del campo, lo que se puede predecir que este hongo se encuentra de manera oportunista en los consorcios de la “Pudrición de la Raíz”, aunque esto deberá ser validado experimentalmente.

ABSTRACT

Regarding the commercial production of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), molecular tests intended to determine the incidence of the Phytophthora blight's causing agents have been applied only in some places of Mexico. Most of the studies are restricted to the isolation and the physiological and biochemical identification of strains present diseased tissues. Several reports based in those studies suggest that one of the most devastating diseases of peppers, "Pepper Root Rot" or "Phytophthora Wilt", caused by the oomycete *Phytophthora capsici*, is not present in the Yucatan Peninsula. Based on the above antecedents, in the present we applied molecular techniques to get a more accurate detection of *P. capsici* in plants cultivated in the Yucatan Peninsula with "Phytophthora Wilt" or "Pepper Root Rot" symptoms. To doing so, a gene fragment of Ypt1, a molecular marker to identify the *P. capsici* species, was amplified by PCR. The study comprised infected tissues from Habanero pepper cultures collected from representative localities of the states of Campeche, Yucatan and Quintana Roo. Collection of tissues was performed in the rain season, when the highest incidence of such diseases is normally found. Because the presence of other fungal pathogens, like *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. has been already demonstrated in this disease, we also evaluated their incidence by the amplification of a TEF1 gene fragment, which is a molecular marker for the simultaneous identification of both genera. Despite the general perception based upon the adverse agroclimatical conditions of the Yucatan peninsula, *P. capsici* was successfully identified in diseased tissues of plants cultivated in two states of the study, either alone or within consortiums with *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. Results suggest that presence of *P. capsici* could be the result of human activities, because it was found in greenhouses that produce seedling for transplantation. Composition of consortiums causing "Pepper Root Rot" was variable, as apart from combinations of two or three pathogens, *Fusarium* spp. and *P. capsici* were exclusively found in some plants. Interestingly, *Alternaria* spp. was not present alone in any plant, which may suggests that this pathogen displays an opportunistic behavior only in the "Pepper Root Rot" consortiums in association with *Fusarium* spp. and *P. capsici*, yet this must be validated experimentally.

CAPITULO I

ANTECEDENTES GENERALES

1. INTRODUCCIÓN

La producción de chile en México es seriamente afectada por patógenos que causan deficiencias en la calidad y en la producción; (SIAP, 2010).

Entre las enfermedades ocasionadas por los microorganismos fitopatógenos, la *Marchitez del Chile* ocasionada por *P. capsici* reduce el rendimiento en este cultivo, especialmente en el centro de México, aunque su detección no ha sido posible en la península de Yucatán.

P. capsici es un habitante del suelo y se propaga por propágulos que permanecen en el suelo, pueden a llegar a durar periodos largos, ocasionando que las infecciones comiencen por las raíces, luego avanzan a la base del tallo y las hojas inferiores, causando la pudrición de estos órganos (Hausbeck y Lamour, 2004). Los propágulos producidos por *P. capsici* contribuyen al desarrollo de la enfermedad, mientras que el micelio produce esporangios y en estos zoosporas para la reproducción asexual. Tanto los esporangios como las zoosporas, pueden tener un papel importante en la diseminación del patógeno y el inicio de la infección, y el crecimiento del micelio es esencial en todos los procesos infecciosos del patógeno (Ristaino y Johnston, 1999, Hausbeck y Lamour 2004).

En la región central del país, que incluye sólo regiones templadas idóneas para el desarrollo de *P. capsici*, se ha utilizado la PCR para la detección molecular de este patógeno, mediante la detección de genes como la cutinasa y las regiones ITS del genoma (Rico *et al.*, 2003). No obstante, en la región de la Península de Yucatán, que es una zona cálida tropical, no se han realizado estudios de la presencia de este patógeno empleando estas técnicas moleculares.

1.1 El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

1.1.1 Origen y distribución del chile habanero.

Los chiles son plantas originarias de las regiones de Mesoamérica, Centroamérica y Sudamérica, pertenecen al género *Capsicum*, el cual está comprendido dentro de la familia de las Solanáceas (Moguel *et al.*, 2006). La especie *C. chinense* se considera originaria de la cuenca amazónica (Andrews, 1999).

1.1.2 Importancia económica

De acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de 2014, la producción de chile habanero a nivel nacional presentó las estadísticas que se muestran en la Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Estadísticas de Producción de Chile Habanero a nivel nacional en el año 2014.

| Sup. sembrada (ha) | Sup. cosechada (ha) | Producción (ton) | Rendimiento (ton·ha ⁻¹) | PMR (\$/Ton) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|-----------------------|------------------------|---------------------|--|-----------------|--------------------------------------|
| 749.09 | 731.59 | 8,632.30 | 11.80 | 16,313.76 | 140,825.25 |

Cabe mencionar que en este último año el cultivo en invernadero y en casa-sombra está produciendo mejores rendimientos (48 Ton·ha⁻¹ en Q. Roo y 50 Ton·ha⁻¹ en Yucatán) (**Cuadro 1.2**). Esto contrasta con la productividad en cielo abierto donde se puede apreciar que las tecnologías de producción pueden afectar significativamente a los productores, pues en el estado de mayor producción en cielo abierto (Yucatán con 2,615.25 ton) se obtuvo en 2014 un rendimiento muy bajo: 11.3 Ton·ha⁻¹ (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Estadísticas de Producción de Chile Habanero en la Región Sureste del País en el año 2014 (Fuente: SIAP 2014).

| Modalidad | Sup. sembrada (ha) | Sup. cosechada (ha) | Producción (Ton)* | Rendimiento (Ton-ha ⁻¹)** | PMR (\$/Ton) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| CAMPECHE | | | | | | |
| Suelo | 65 | 62 | 708.95 | 11.44 | 23,623.39 | 16,747.80 |
| CHIAPAS | | | | | | |
| Suelo | 24.5 | 24.5 | 441.6 | 18.02 | 14,198.37 | 6,270.00 |
| QUINTANA ROO | | | | | | |
| Suelo | 53.17 | 52.17 | 549.45 | 10.53 | 16,545.27 | 9,090.80 |
| Invernadero | 16.31 | 16.31 | 774.27 | 47.47 | 21,490.98 | 16,639.82 |
| Total | 49.3 | 68.48 | 1,323.72 | 29.00 | 19,018.13 | 25,730.62 |
| TABASCO | | | | | | |
| Suelo | 288 | 276 | 2,006.80 | 7.27 | 14,185.84 | 28,468.15 |
| YUCATÁN | | | | | | |
| Suelo | 231.99 | 230.69 | 2,615.25 | 11.34 | 10,892.68 | 28,487.07 |
| Invernadero | 7.95 | 7.65 | 168.14 | 21.98 | 18,998.05 | 3,194.33 |
| Casa-sombra | 4.4 | 4.4 | 125.5 | 28.52 | 14,673.31 | 1,841.50 |
| Total | 240.98 | 242.74 | 2,908.89 | 20.61 | 14,854.68 | 33,522.90 |
| TOTAL | | | | | | |
| | 691.32 | 673.72 | 7,389.96 | 21.33 | 17,203.15 | 110,739.47 |

* El TOTAL de esta columna se refiere al valor promedio de rendimiento por hectárea (Ton-ha⁻¹)

** El TOTAL de esta columna se refiere al valor promedio del precio por hectárea (\$/ha)

Puede observarse que para el año 2014, Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán sumaron 749 ha sembradas de este cultivo, siendo Tabasco el de mayor extensión con 288 ha sembradas, aunque con el menor rendimiento (7.27 Ton-ha⁻¹) (SIAP, 2014).

El fruto de chile es ampliamente utilizado en la gastronomía y en menor medida en las industrias farmacéutica, cosmética, avícola y de pinturas. El uso más ampliamente generalizado de los chiles a nivel industrial es la producción de capsaicina, un capsaicinoide presente en altas concentraciones en los frutos, que constituye el componente principal de los atomizadores para la autodefensa (Moguel *et al.*, 2006).

De las especies de chile que son cultivadas en las diferentes regiones de México, el chile

habanero es altamente apreciado debido a sus características organolépticas; es decir, a su aroma y sabor agradables, y a su alto nivel de pungencia (Moguel *et al.*, 2006).

1.1.3 Características y clasificación taxonómica del Chile Habanero

Las plantas germinan entre 8 y 14 días después de sembrada la semilla, crecen 60 cm en promedio y dan fruto a los 85 días, en cultivos trazados como pequeños surcos con densidad de hasta 500 plantas m²⁻¹. En la planta, los frutos maduros toman color dependiendo de los pigmentos; es sensible a temperaturas bajas, prefiere entre 21 y 24 °C y suelos areno-arcillosos, además de un valor neutral de pH (SIAP, 2010).

Reino: *Plantae*

División: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Capsicum* L., 1753

Especie: *Capsicum chinense* Jacq., 1776

(The Integrated Taxonomic Information System, 2011)

1.1.4 Principales enfermedades del chile habanero

1.1.4.1 Enfermedades de origen viral

Hay una diversidad muy amplia de virus que atacan al chile habanero con síntomas parecidos a zonas cloróticas amarillas y hojas arrugadas, aunque el patrón puede variar dependiendo el virus, para mencionar algunos: Virus mosaico del pepino (CMV) y el Virus mosaico del tabaco (TMV), Pepper Huasteco Virus (PHV) (Garzón-Tiznado et al.1993), pepper Virus-Tamaulipas (TPV-T), Tobacco Etch Virus (TEV) y Virus del mosaico clorótico del chile dulce (VMCCD) (Bayer, 2011).

1.1.4.2 Enfermedades de origen fúngico

El problema fitosanitario más frecuentemente causado por hongos en chiles es la marchitez (Pineda *et al.*, 2003), enfermedad que puede presentarse en cualquier edad del cultivo y causar pérdidas en la cosecha de hasta un 100% (Pérez *et al.*, 2002). Los hongos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp, así como el oomiceto *Phytophthora capsici* L. han sido asociados con la marchitez en chiles en otros países (Johnston, 1999; Pérez *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2003).

Rhizoctonia solani es parte del complejo de hongos que provocan el “Damping off”, como consecuencia del estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel de cuello, en plantas recién emergidas. En plantas adultas los síntomas característicos son manchas secas bien delimitadas en raíces y lesiones hundidas de color pardo en el cuello (Mohammad *et al.*, 2012).

Las especies de *Fusarium* son económicamente importantes como patógenas en cultivos agrícolas, hortícolas y forestales cultivados en el mundo. Las plantas infectadas por *Fusarium* sp. presentan marchitez, clorosis y necrosis foliar, producto de la invasión del sistema vascular por el patógeno . Los síntomas son más visibles en las hojas basales y se presentan como una amarillez unilateral, la que posteriormente se extiende por toda la planta.

1.1.4.3 Otras enfermedades

Entre los nematodos que pueden causar problemas de amarillamiento y afectar el desarrollo vegetativo en chile habanero se ha señalado a *Meloidogyne incognita* como uno de los más importantes (Resende, 1997)

1.1.5 Los oomicetos

1.1.5.1 Generalidades de los oomicetos

Los oomicetos tienen un micelio alargado que carece de septas y producen oosporas (esporas de reposo) y zoosporangios o zoosporas (esporas asexuales). Pertenecen al orden Peronosporales, dentro del cual el género *Aphanomyces*, tiene también gran importancia como organismo fitopatógeno, ya que causa la pudrición de la raíz de muchas plantas anuales, en particular del chícharo y la remolacha (Agrios, 2005). El orden de los Peronosporales incluye a la familia *Pythiaceae*, que agrupa algunos de los oomicetos fitopatógenos más importantes que se conocen; dentro de este orden se encuentran los siguientes géneros:

- *Pythium*, causa la pudrición de las semillas, el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de la raíz de la mayoría de las plantas.
- *Phytophthora*, causa el tizón tardío de la papa y pudriciones de la raíz de muchas otras plantas.
- *Peronospora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora* y *Sclerospora*, ocasionan enfermedades muy destructivas conocidas como mildius. El género *Albugo* ocasiona la roya blanca de las crucíferas (Agrios, 2005).

Las especies del género *Phytophthora* causan varias enfermedades en muchos tipos distintos de plantas, desde plantas anuales (hortalizas y de ornato) hasta árboles forestales y frutales completamente desarrollados. La mayoría de estas especies ocasionan pudriciones de la raíz, estrangulamiento de plántulas, pudriciones de

tubérculos, cormos, base del tallo y otros órganos, enfermedades que son bastante semejantes a las que produce *Pythium* spp.

Otras especies de este género ocasionan pudriciones de yemas o de frutos y algunas de ellas producen tizones que atacan al follaje, ramas inmaduras y frutos. Algunas especies son específicas de un hospedante, es decir, sólo atacan a una o dos especies de plantas, pero otras tienen una amplia gama de hospedantes y pueden causar síntomas similares o distintos en muchos tipos de plantas hospedantes.

Una de las especies más importantes, por las enfermedades que produce, es *P. cactorum*, que causa la pudrición del tronco o collar del manzano, la pudrición del pie y tallo del lirio, el tizón de la peonía, la muerte descendente de la azalea, la pudrición del tallo y el marchitamiento del antirrino o boca de dragón, la pudrición de la raíz del trébol dulce y el tizón de la inflorescencia del tulipán.

P. capsici genera la pudrición de la raíz del chile, la zanahoria y la calabaza y la pudrición del fruto del chile, del jitomate, de la berenjena y también de las cucurbitáceas, entre otras plantas. *P. cambivora* produce la pudrición de la raíz y corona de los árboles de la familia Fagaceae. *P. cinnamomi* induce la pudrición de la raíz del aguacate, la azalea, el castaño, el canelo, el roble, el pino y la piña, así como también la "muerte descendente jarrah" de los bosques naturales de Australia.

1.1.5.2 Clasificación Taxonómica de *Phytophthora capsici*

La especie *Phytophthora capsici* Leo. fue identificada por primera vez en Nuevo México, E.E.U.U por L. Leonian, atacando cultivos de chile (*Capsicum annuum*) (Leonian, 1922). Después de 1992, fue reportado en otros hospedantes, como la calabaza (*Cucurbita* spp.), el pepino (*Cucumis sativus*), el jitomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*), etc. (Lamour y Kamoun, 2009).

Reino: *Stramenopila*

División: *Oomycota*

Subdivisión: *Mastigomicotina*

Clase: *Phycomycetes*

Subclase: *Oomycetes*

Orden: *Peronosporales*

Familia: *Pythiaceae*

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora capsici* Leo.

(Lamour, 2012)

Anteriormente, los oomicetos fueron clasificados como hongos debido a su crecimiento filamentoso y por alimentarse de materia en descomposición; sin embargo, a diferencia de los hongos su pared celular no está compuesta de quitina, sino que está formada de una mezcla de compuestos celulósicos y de glucanos. Los núcleos dentro de los filamentos son diploides, con dos juegos de cromosomas, mientras que en los hongos son haploides (Waggoner, 1995).

1.1.6 Enfoques moleculares para la detección de oomicetos en plantas.

Las técnicas moleculares ofrecen mejores posibilidades para identificar patógenos de plantas. Existen muy pocos reportes sobre el empleo de marcadores moleculares para rastrear la presencia de oomicetos en sus hospedantes o en el suelo (Aegerter *et al.*, 2002; Belbahri *et al.*, 2005; Hukkanen *et al.*, 2006); En México sólo hay un reporte aplicando técnicas moleculares (Rico *et al.*, 2003). Esto es notable, teniendo en cuenta que existen muchas especies de oomicetos biotróficos en una diversidad amplia de plantas hospederas silvestres.

La detección de patógenos en los tejidos del hospedante asintomático es particularmente importante en la propagación de plantas a través de esquejes e injertos. Por ejemplo, Aegerter *et al.* (2002) utilizaron con éxito técnicas de PCR para la detección de *Peronospora sparsa* en la corteza y en tejidos asintomáticos de la corona de plantas de rosa, elegidos para servir como fuente de propagación. En el cultivo de plantas, pruebas sensibles para la detección de infecciones asintomáticas podrían ser útiles para evitar falsas evaluaciones de plantas aparentemente resistentes. Para la cuantificación de la infección, la técnica de PCR en tiempo real, empleando cebadores específicos para *P. sparsa* ha demostrado ser útil (Hukkanen *et al.*, 2006)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado ampliamente por sus ventajas en la velocidad, la sensibilidad, la especificidad y la flexibilidad para la detección de patógenos en las plantas. Cebadores específicos de *P. capsici* se han utilizado para su identificación rápida basada en el espaciador interno transcrito (Internal Transcribed Spacer, ITS, por sus siglas en inglés) en los tejidos vegetales infectados, en el suelo y en el agua (Zhang *et al.*, 2006), así como marcadores basados en las repeticiones de secuencias simples (SSR) en suelos con riego en el sur de Georgia, E.E.U.U (Wang *et al.*, 2009). Regiones ITS altamente conservadas en diferentes especies de hongos, son un buen candidato para el diseño de cebadores de PCR específicos para *P. capsici*. Estudios filogenéticos han sugerido que sus regiones evolucionan rápidamente y pueden variar entre las especies dentro de un género (Silvar *et al.*, 2005; Pavón *et al.*, 2008). También, los marcadores SSR son altamente polimórficos, multialélicos y codominantes, se cree que proporcionan un sistema de marcador más eficiente que los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción y ADN polimórfico amplificado al azar. Sin embargo, estudios

más recientes también consideran al gen Ypt1 (Ras-related protein) para la detección molecular del género *Phytophthora* (Meng y Wang 2010; Schena *et al.*, 2008). Aunque los genes codificantes de la β -tubulina, la elicina y la región espaciadora entre los genes mitocondriales *cox1* y *cox2* (Martin *et al.*, 2012) también han sido utilizados, la secuencia del gen Ypt1 se ha probado exitosamente para la detección de diferentes especies del género *Phytophthora* (Lan *et al.*, 2012).

1.3 JUSTIFICACIÓN

En México, la incidencia de *P. capsici* se ha explorado sobre todo en la parte central de la República, sin embargo, no existen reportes oficiales dentro de la Península de Yucatán sobre presencia del patógeno, aunque se cree que posiblemente no se encuentre en la región. Esta presunción se basa en dos premisas complementarias: por un lado, las condiciones agroclimáticas no permiten la dispersión de microorganismos patógenos que utilizan los cuerpos de aguas y las zonas inundadas para su difusión; por el otro lado, el monitoreo de los microorganismos asociados a las enfermedades fúngicas no ha arrojado ninguna especie del género *Phytophthora*. Debido a que los síntomas pueden confundirse fácilmente con otros patógenos que atacan al chile habanero, en el presente trabajo se investigó la incidencia de *P. capsici*, empleando la tecnología de PCR con cebadores reportados con anterioridad. Los resultados permitieron descartar su presencia o detectar a tiempo y contrarrestar el avance de la enfermedad.

1.4 HIPÓTESIS

Con base en las condiciones agroclimáticas de la Península de Yucatán y a los requerimientos agroclimáticos para su diseminación, es probable que el oomiceto *Phytophthora capsici* no se encuentre presente en Pudriciones de la Raíz de chiles cultivados en esta región.

1.5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el oomiceto *Phytophthora capsici* se encuentra presente en la pudrición de raíz del chile habanero cultivado en la Península de Yucatán.

1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Establecer un protocolo para la identificación molecular de los agentes que normalmente causan la pudrición de la raíz en chile habanero.
2. Colectar plantas de chile habanero cultivadas en diferentes regiones y temporadas de lluvia en la Península de Yucatán.
3. Determinar si el oomiceto *Phytophthora capsici* se encuentra presente en las plantas muestreadas.
4. Identificar los agentes causantes de la pudrición de la raíz, en la que *Phytophthora capsici* podría estar participando.

1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

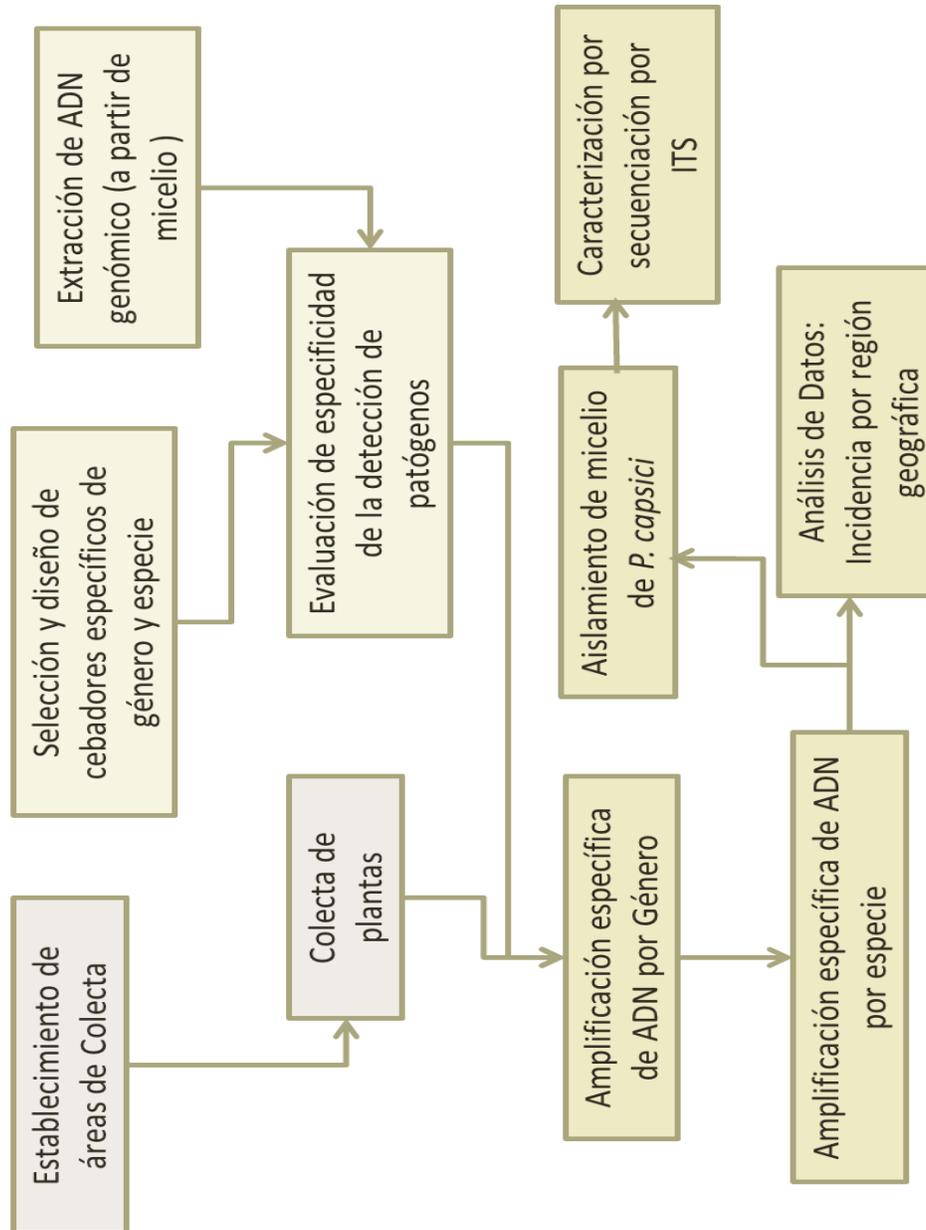


Figura 1.2 Estrategia experimental

CAPITULO II **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora capsici*.****2.1 INTRODUCCIÓN**

En plantas con pudrición de raíz, con frecuencia se aíslan los hongos fitopatógenos *Fusarium* spp. (67%) y *Rhizoctonia solani* Kühn (42%), mientras que *Phytophthora capsici* L. se ha aislado en porcentaje muy baja (2%) a pesar de que tradicionalmente se le ha señalado como el principal agente (Rico-Guerrero *et al.*, 2001; Rico-Guerrero, 2002). El aislamiento de *P. capsici* es complicado debido a que las tasas de extracción del tejido son muy bajas o nulas (Rico-Guerrero *et al.*, 2001; Rico-Guerrero, 2002). Otra de las problemáticas es la contaminación continua de bacterias durante el aislamiento de oomicetos, tal situación requiere el empleo de antibióticos, pero la problemática recae en que muchas veces los oomicetos también son susceptibles a los antibióticos (Solache *et al.*, 2010).

Durante el proceso de aislamiento de oomicetos a partir de tejidos vegetales enfermos, del suelo o del agua de riego, es común obtener cultivos contaminados por bacterias aún utilizando un medio selectivo con antibióticos (Erwin, 1996). La contaminación bacteriana afecta el estudio de los oomicetos de varias maneras; i) las bacterias contaminantes inhiben el desarrollo de micelio y la formación de estructuras reproductivas; ii) compiten por los nutrientes del medio de cultivo; iii) pueden producir antibióticos que afectan al oomiceto; iv) parasitan a los oomicetos directamente. La problemática anterior hace indispensable contar con procedimientos para purificar el micelio de la contaminación bacteriana (Pitt & Hocking, 2007).

Así, es factible suponer que las técnicas microbiológicas de aislamiento no sean eficientes para aislar a *P. capsici*, con lo que se estaría subestimando la presencia de este oomiceto en plantas de Chile con marchitez, por lo que es más apropiado emplear técnicas moleculares, que son más sensibles y más exactas, para su detección.

La secuencia del gen Ypt1 está muy conservada, incluso en la misma especie, pero

contiene una variación suficientemente amplia para permitir el desarrollo de marcadores moleculares para casi todas las especies de *Phytophthora* (Haubruck *et al.*, 1987), por lo que cebadores específicos diseñados para amplificar regiones conservadas del gen Ypt1 en el género *Phytophthora* deberán tener una total especificidad en relación con otras especies del género. De hecho, cebadores específicos basados en el gen Ypt1 ya han sido diseñados y probados para la detección de diversas especies de *Phytophthora* (Lan *et al.*, 2012; Schena *et al.*, 2008).

En este capítulo se evaluará la efectividad de cebadores diseñados para detectar a todas las especies de *Phytophthora*, pues a pesar de que hay otros marcadores moleculares como los que se mencionan en el Capítulo I, el gen Ypt1 es el que mejor ha dado resultados en cuestión de especificidad.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico de las plantas de Chile empleando el protocolo de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1987) que se describe a continuación.

Se maceró de 0.1 a 0.2 g de tejido con nitrógeno líquido. Al polvo se le agregaron 750 μ L de amortiguador CTAB y 20 μ L de β -Mercaptoetanol, se mezcló por inversión y se incubó a 65 °C por 1 h; luego se añadieron 750 μ L de una mezcla de cloroformo-álcool isomilico (25:1), seguidamente se mezcló por 2-3 min y se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se repitió el lavado con Cloroformo-isoamílico, luego la fase acuosa se le agregó 2/3 del volumen total de isopropanol, se incubó en hielo 15 min y se centrifugó a 13,000 x g durante 5 min. a TA. Después, se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla 2 veces con 1 ml con la solución de lavado y se centrifugó 10,000 x g durante 5 min. a TA; entonces se procedió a secar la pastilla, una vez seca, se resuspendió en 300 μ L de RNase, se puso a incubar 20 min, luego se le agregó 200 μ L NaCl y 2 volúmenes de etanol, se incubó en hielo 10 min y se centrifugó a 10,000 x g a TA. Finalmente, la pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 μ L de H₂O.

El ADN_g se utilizó como molde para amplificar el marcador molecular de *Phytophthora* por PCR de punto final.

2.2.2 Amplificación Ypt1 por PCR punto final

La amplificación del fragmento del gen Ypt1 de *Phytophthora* se realizó con los siguientes cebadores a nivel género: cebador Yph1F (5'-CGACCATKGGTGTGGACTTT-3') y cebador Yph2R (5'-ACGTTCTCMCAGGCGTATCT-3') (Meng y Wang 2010; Schena et al., 2008, Lan et al., 2012). Los cebadores específicos del gen Ypt1 de *P. capsici* (Pc1F: 5'-GTATAGCAGAGGTTTGTAGTAA-3' y Pc1R: 5'-ACTGAAGTTCTGCGTGCGTT-3'), fueron utilizados para amplificar mediante PCR-anidada un segmento específico de ADN a partir del amplicón general de *Phytophthora* obtenido con los cebadores de género (Lan et al. 2012).

Posteriormente una alícuota de los productos de PCR empleando diferentes cebadores y ADN genómico de *P. capsici* como molde fueron fragmentados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio

2.2.3 Purificación de micelio de *P. capsici* a partir de tejido vegetal enfermo.

Una vez estandarizado el marcador molecular para detectar a *P. capsici*, se procedió el aislamiento del micelio, esto realizó a partir de las muestras de campo que dieron positivas a la prueba para la detección molecular de *P. capsici*; Para ello se realizó lo siguiente: muestras de raíz y de tallo de las plantas enfermas fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 0.1% durante 60 segundos y posteriormente se les dio un lavado de agua estéril durante 30 segundos. Finalmente, se realizaron cortes de 1 cm aproximadamente, con bisturí estéril y se colocaron en medio PDA para cultivarse mediante una modificación al método de superposición de micelio descrito por Solache-Huacuz *et al.* (2010) (Figura 2.1). Después del crecimiento de micelio, un cubo del medio con micelio contaminado se colocó en una caja de Petri estéril vacía, orientando el crecimiento del micelio hacia arriba. Sobre este cubo de medio se colocó un disco de medio estéril semi-sólido de mayor tamaño que el cubo anterior, de tal manera que cubra toda la superficie evitando el contacto con el aire. Se cerró la caja Petri y se incubó a 37 °C durante 2 días. Al cabo de este tiempo, se cortó el micelio que emergió de la parte superficial del cubo de medio de cultivo y se pasó a una nueva caja de Petri estéril para su propagación.

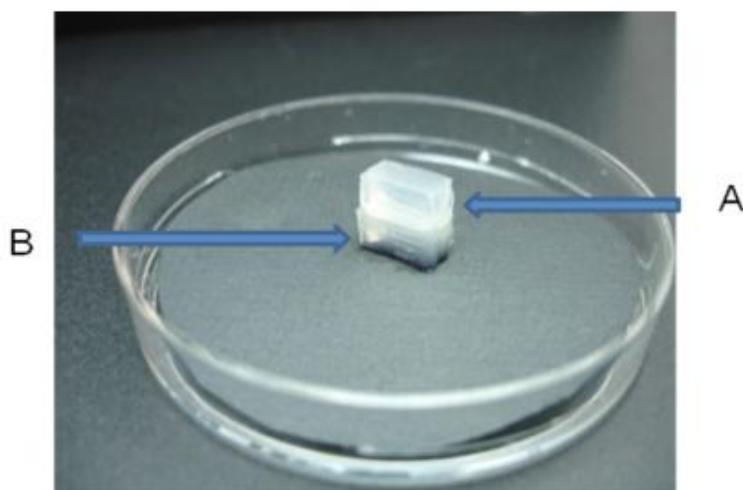


Figura 2.1 Método de superposición para aislamiento de *P. capsici*. El procedimiento se describe en el texto. En el presente trabajo se colocó un disco de medio en lugar de un cubo, con el objetivo de delimitar el acceso de oxígeno para el crecimiento bacteriano (Tomado de Solache-Huacuz *et al.* (2010).

El ADN genómico del micelio aislado de las muestras putativas de *P. capsici* fue extraído mediante el método descrito anteriormente.

A partir de las muestras de ADN se realizó una amplificación por PCR empleando los cebadores específicos para *P. capsici* y las muestras resultantes se enviaron a secuenciar a la Universidad de Tennessee en el Departamento de Entomología y Fitopatología, E.E.U.U.

2.2.4 Caracterización patológica de los aislados.

Para corroborar que el aislado de *Phytophthora capsici* era el agente causal de la sintomatología observada en las plantas enfermas, se aplicaron los postulados de Koch, de la siguiente manera:

1. Se evaluó si *P. capsici* estaba presente en las plantas enfermas pero no en las sanas. Para ello se realizaron pruebas moleculares y cultivos *in vitro* a partir de los aislados de plantas enfermas y de plantas sanas.

2. Se aisló el patógeno en un cultivo axénico a partir de tejidos de las plantas enfermas y se comparó con plantas sanas.
3. Se utilizó el cultivo axénico para evaluar los síntomas que producía en las plantas inoculadas.
4. Se aisló nuevamente al patógeno de las plantas inoculadas y se comparó morfológica y molecularmente con el primer aislado.

Las pruebas del tercero y el cuarto postulados de Koch se realizaron mediante la siembra de plántulas de chile habanero en macetas conteniendo Peat Moss estéril, en el cual se mezcló un inóculo del micelio del aislado en proporción 5 gr de medio con micelio de la caja Petri y las plantas fueron cultivadas en una cámara de fotoperiodo 16:8 luz/oscuridad, durante 4 días a temperatura ambiente (~25 °C) y una humedad relativa del 80%.

2.3 RESULTADOS

El uso de los cebadores Yph1F/Yph2R y Pc1F/Pc1R produjo amplicones específicos para “género” y para especie”. Los fragmentos de PCR generados tuvieron longitudes de 470 pb y 364 pb, respectivamente. Lo anterior está de acuerdo con los resultados de todas las especies del género *Phytophthora* y de la especie *P. capsici*, respectivamente.

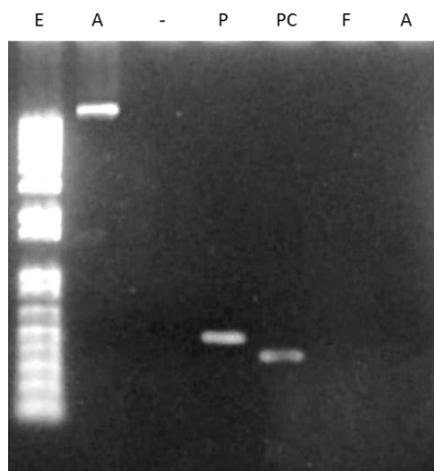


Figura 2.2 Evaluación de los cebadores para la amplificación de marcadores moleculares de *Phytophthora capsici*. E: Escalera de ADN de 1kb; A: ADN genómico; (-): testigo negativo sin ADNg; P: productos con los cebadores YPh1Fy YPh2R; PC: productos con los cebadores Pc1F y Pc1R; F: productos con los cebadores TEF-Fu3 específicos para *Fusarium* spp.

Como puede observarse en la Figura 2.2, el protocolo de extracción de ADN fue exitoso (carril A) y el ADN extraído pudo ser utilizado para generar los amplicones específicos a nivel de género y de especie para *P. capsici*. Además pudo corroborarse que los cebadores no amplifican con ADN genómico del género *Fusarium* (carril F).

Con estos datos puede ahora intentarse la detección del género *Phytophthora*, así como de la especie *P. capsici* en muestras de chile habanero colectadas en la Península de Yucatán, con pudrición de la raíz.

En el presente trabajo se optó por adaptar el protocolo de Solache-Huacuz *et al.* (2010), modificando el tamaño del agar que se superpone sobre el micelio en crecimiento (Figura 2.3, paneles D y E). Como se observa en el panel F de la figura 4, las bacterias crecieron más rápido que el micelio, pero no pudieron crecer a través del disco de agar y solamente se esparcieron de manera horizontal sobre el medio de cultivo. Por el otro lado, el micelio sí pudo atravesar el agar estéril, por lo que se pudo tomar una pequeña parte de micelio y colocarlo en medio de cultivo PDA nuevo estéril (Figura 2.3, panel F). Con eso, se pudo obtener un cultivo axénico del patógeno aislado (Figura 2.3, panel G) y a partir de él se procedió a verificar la segunda parte de los postulados de Koch, los cuales implican que el patógeno aislado debe provocar los mismos síntomas de la enfermedad cuando se inocula a una planta sana de la misma especie y variedad de la que fue originalmente aislado.

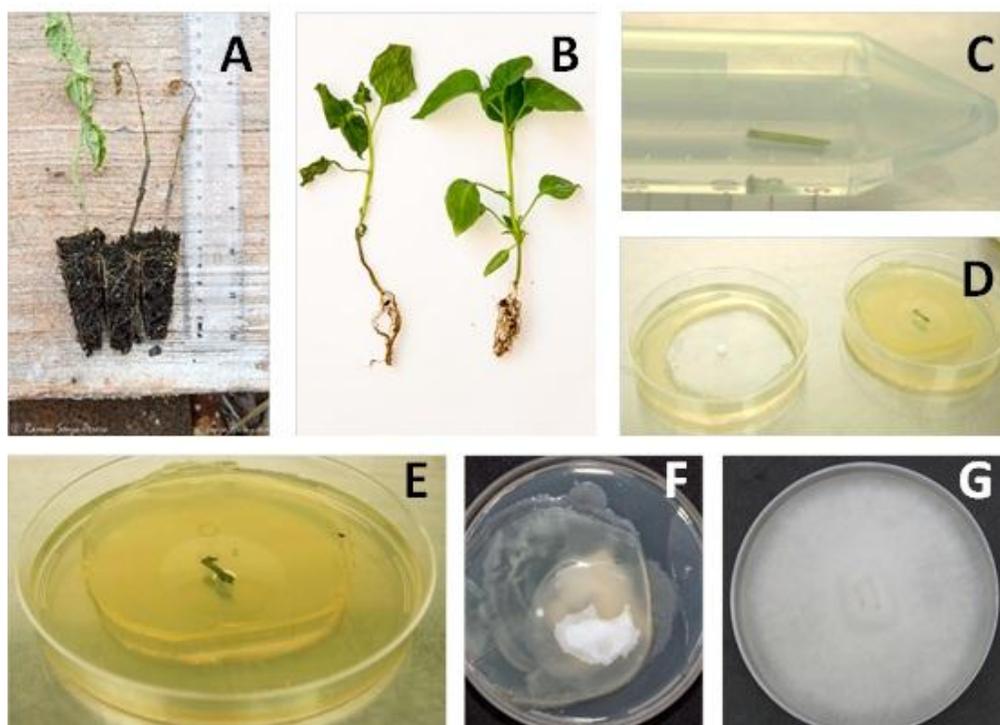


Figura 2.3 Postulados de Koch. Primera parte. Se muestra el aislamiento de *P. capsici* a partir de plántulas cultivadas para trasplantar a campo, que mostraron la sintomatología de la Pudrición de la Raíz. Panel A: Comparación de plantas sanas y plantas enfermas; panel B: Raíces de plantas sanas y de plantas enfermas; panel C: Aseptización de cortes de tejidos enfermos; panel D: Superposición de disco de medio de cultivo sobre el tejido infectado; panel E: Acercamiento del tejido infectado colocado sobre medio de cultivo y cubierto con un disco estéril de medio de cultivo; panel F: Crecimiento bacteriano sobre el medio de cultivo y de micelio a través del disco superpuesto; panel G: Crecimiento axénico de un inóculo aislado mediante el procedimiento mostrado en el panel F.

La inoculación de plántulas de chile habanero con el micelio aislado del microorganismo que creció en el cultivo axénico, produjo los mismos síntomas de la enfermedad que se observaron en campo. Como se puede observar en la Figura 2.4, las plántulas decaen para el segundo día y mueren para el cuarto, cuando el talluelo se rompe. Una imagen de la radícula muestra el necrosamiento causado por el patógeno. Estos síntomas son idénticos a los observados en plántulas generadas para trasplantar a campo en las localidades en donde se obtuvieron resultados positivos para la detección de *P. capsici* (ver Figura 2.4).



Figura 2.4 Postulados de Koch. Segunda Parte. Se muestra los síntomas de la enfermedad causada en plántulas sanas de chile habanero en diferentes días después de que fueron inoculadas con micelio del microorganismo aislado del cultivo axénico mostrado en la Figura 9. Se muestra un comparativo de raíces de plantas sanas y de plantas enfermas, así como un detalle de la planta enferma a los tres días después de la inoculación.

Una vez que se confirmaron los postulados de Koch, se procedió al aislamiento del ADN genómico de las presuntas cepas de *P. capsici* obtenidas del aislamiento original y de la cepa aislada de las plantas infectadas con el cultivo axénico, con el objetivo de corroborar la identidad del patógeno mediante técnicas moleculares. El ADN tuvo la pureza medida por espectrofotometría: $A_{260/280\text{nm}}$: 1.86; $A_{230/280\text{nm}}$: 1.9, lo que indicó que estaba libre de proteínas y carbohidratos contaminantes.

El ADN extraído fue utilizado como molde para amplificar por PCR fragmentos de ADN específicos del género *Phytophthora* o de la especie *P. capsici*. Como puede observarse

en la Figura 2.5, se aisló ADN íntegro que pudo ser empleado como molde para aislar los amplicones correspondientes a la identificación del género y de la especie. Los amplicones corresponden efectivamente a los tamaños esperados para la amplificación de un fragmento del gen Yph, específico para el género y del gen Ypt1, específico para la especie.

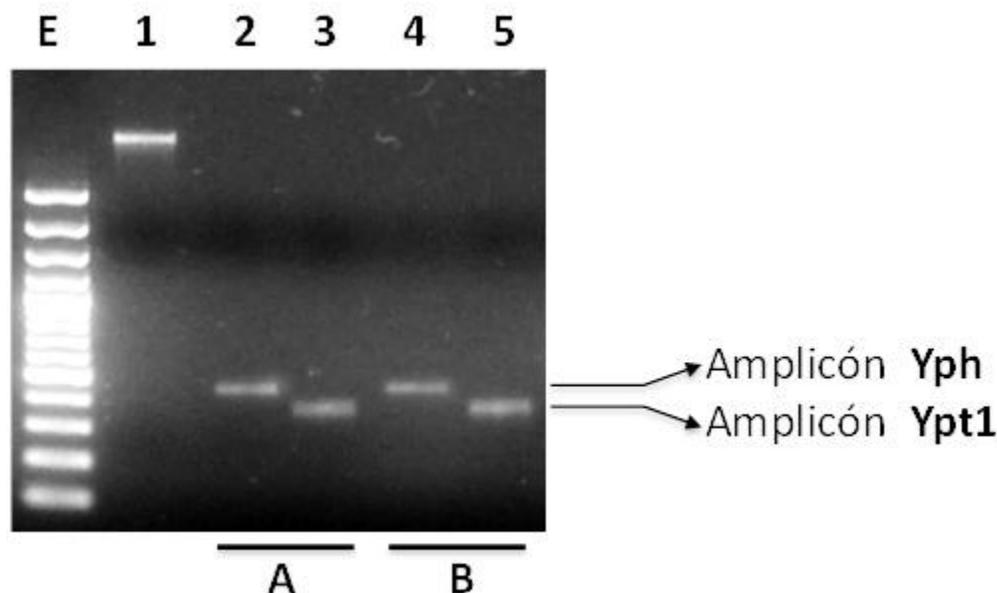


Figura 2.5 Identificación molecular de *P. capsici*. Amplificación específica de ADN genómico. Productos de PCR a partir del ADN genómico del micelio aislado originalmente (A) o del micelio aislado de plántulas inoculadas con micelio aislado del cultivo axénico (B). Carril E: Escalera de ADN de 1 kb; Carril 1: muestra de ADN genómico aislado del cultivo axénico; carriles 2 y 4: Producto obtenido con los cebadores Yph1F y Yph2R; carriles 3 y 5: Producto obtenido con los cebadores Pc1F y Pc1R.

Se mandó ADN genómico al laboratorio del Dr. Kurt Lamour en el Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad de Tennessee, en E.E.U.U., donde se secuenció un fragmento de un ITS (Figura 2.6), que tiene una longitud de 649 pb. La secuencia resultante fue comparada en bases de datos mediante una búsqueda tipo BLAST para su identificación (Figura 2.7). En el Anexo II se muestra el alineamiento individual de ITS con las 10 secuencias con las que tiene mayor similitud. En la Figura 2.8

se muestra el alineamiento múltiple de estas 10 secuencias.

```

1   TTGAGATGCGCACCGAAGTGCACACAAAATTCCAAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGA   60
61  AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC   120
121 GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA   180
181 AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCGAGCAGACAAACCGGTC   240
241 GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG   300
301 AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAAACACGCAAGAC   360
361 ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAGTTTGATGT   420
421 ACGGACACTGATACAGGCATACTCCCAGGACTAACCCGGAAGTGCAATATGCGTTCAAAA   480
481 TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTTCGATTACGTATCGCAGTTCGCAGCGTTCTTC   540
541 ATCGATGTGCGAGCCTAGACATCCACTGCTGAAAGTTGCTATCTAGTTAAAAGCAGAGAC   600
601 TTTCGTCCCCACAGTATAATCAGAATTGTGAAATGGGTTTAAAACAAA   649

```

Figura 2.6 Secuencia nucleotídica del amplicón de *P. capsici* (ITS).

| Sequences producing significant alignments: | | | | | | |
|---|------------------|--------------------|--------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Description | <u>Max score</u> | <u>Total score</u> | <u>Query cover</u> | <u>E value</u> | <u>Identity</u> | <u>Accession</u> |
| <i>Phytophthora capsici</i> partial 5.8S rRNA gene, isolate PCB | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | LN867889.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain UACH-GAQ111 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KM369965.1 |
| <i>Phytophthora</i> sp. PNS-2014 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KF803236.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain UACH-GAQ15 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KM288421.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain UACH-GAQ13 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KM279676.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain LJ0912190 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KJ696538.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> isolate 214-C2 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KJ855326.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain BBA PD 97/6360 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KJ755104.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> isolate RHN08 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KF611675.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain OCPC2 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KC677804.1 |
| <i>Phytophthora capsici</i> strain OCPC1 | 1199 | 1199 | 100% | 0.0 | 100% | KC677803.1 |

Figura 2.7 Búsqueda tipo BLAST en la base de datos NCBI. La secuencia nucleotídica del amplicón Ypt1 fue utilizada para realizar una búsqueda tipo BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se muestra los datos de las primeras 10 secuencias de la lista.

| | | | |
|-------------|-----|--|-----|
| ITS | 1 | TTGAGATGCGCACCGAAGTGCACACAAAATTCCTCCAAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGA | 60 |
| UACH-GAQ111 | 789 | TTGAGATGCGCACCGAAGTGCACACAAAATTCCTCCAAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGA | 730 |
| PNS-2014 | 719 | TTGAGATGCGCACCGAAGTGCACACAAAATTCCTCCAAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGA | 660 |
| UACH-GAQ15 | 720 | AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC | 661 |
| UACH-GAQ13 | 790 | TTGAGATGCGCACCGAAGTGCACACAAAATTCCTCCAAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGA | 731 |
| LJ0912190 | 785 | TTGAGATGCGCACCGAAGTGCACACAAAATTCCTCCAAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGA | 726 |
| ITS | 61 | AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC | 120 |
| UACH-GAQ111 | 729 | AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC | 670 |
| PNS-2014 | 659 | AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC | 600 |
| UACH-GAQ15 | 660 | GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA | 601 |
| UACH-GAQ13 | 730 | AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC | 671 |
| LJ0912190 | 725 | AGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAAACCGATTCAAAGCCAAGCCAAACACAGCTAC | 666 |
| ITS | 121 | GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA | 180 |
| UACH-GAQ111 | 669 | GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA | 610 |
| PNS-2014 | 599 | GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA | 540 |
| UACH-GAQ15 | 600 | AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCCGCAGCAGACAAAACCGGTC | 541 |
| UACH-GAQ13 | 670 | GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA | 611 |
| LJ0912190 | 665 | GGTTCACCAGCCCATCACGCCACAGCAGGAAAAGCATTCAATAAGCGCCTGTTTCAGCCGA | 606 |
| ITS | 181 | AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCCGCAGCAGACAAAACCGGTC | 240 |
| UACH-GAQ111 | 609 | AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCCGCAGCAGACAAAACCGGTC | 550 |
| PNS-2014 | 539 | AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCCGCAGCAGACAAAACCGGTC | 480 |
| UACH-GAQ15 | 540 | GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG | 481 |
| UACH-GAQ13 | 610 | AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCCGCAGCAGACAAAACCGGTC | 551 |
| LJ0912190 | 605 | AGCCAACCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCTTAAAACGCCCGCAGCAGACAAAACCGGTC | 546 |
| ITS | 241 | GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG | 300 |
| UACH-GAQ111 | 549 | GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG | 490 |
| PNS-2014 | 479 | GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG | 420 |
| UACH-GAQ15 | 480 | AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAACACGCAAGAC | 421 |
| UACH-GAQ13 | 550 | GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG | 491 |
| LJ0912190 | 545 | GCCGACTGGCCACGCAGGCAGCCTCCACAACCCAGCAACACCACGCTTTTCGAGCAAAGAG | 486 |
| ITS | 301 | AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAACACGCAAGAC | 360 |
| UACH-GAQ111 | 489 | AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAACACGCAAGAC | 430 |
| PNS-2014 | 419 | AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAACACGCAAGAC | 360 |
| UACH-GAQ15 | 420 | ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAAGTTTGATGT | 361 |
| UACH-GAQ13 | 490 | AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAACACGCAAGAC | 431 |
| LJ0912190 | 485 | AAGTACAGTTCAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGACCCGAAGGACAACACGCAAGAC | 426 |
| ITS | 361 | ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAAGTTTGATGT | 420 |
| UACH-GAQ111 | 429 | ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAAGTTTGATGT | 370 |
| PNS-2014 | 359 | ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAAGTTTGATGT | 300 |
| UACH-GAQ15 | 360 | ACGGACACTGATACAGGCATACTCCAGGACTAACCCGGAAGTGAATATGCGTTTCAAAA | 301 |
| UACH-GAQ13 | 430 | ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAAGTTTGATGT | 371 |
| LJ0912190 | 425 | ACTTCACATCTGGCACATCCTCCACCGACTACACGGAAGGAAGAAAGCCAAAGTTTGATGT | 366 |
| ITS | 421 | ACGGACACTGATACAGGCATACTCCAGGACTAACCCGGAAGTGAATATGCGTTTCAAAA | 480 |
| UACH-GAQ111 | 369 | ACGGACACTGATACAGGCATACTCCAGGACTAACCCGGAAGTGAATATGCGTTTCAAAA | 310 |
| PNS-2014 | 299 | ACGGACACTGATACAGGCATACTCCAGGACTAACCCGGAAGTGAATATGCGTTTCAAAA | 240 |
| UACH-GAQ15 | 300 | TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTGCGATTACGATATCGCAGTTCGACGCTTCTTC | 241 |
| UACH-GAQ13 | 370 | ACGGACACTGATACAGGCATACTCCAGGACTAACCCGGAAGTGAATATGCGTTTCAAAA | 311 |
| LJ0912190 | 365 | ACGGACACTGATACAGGCATACTCCAGGACTAACCCGGAAGTGAATATGCGTTTCAAAA | 306 |
| ITS | 481 | TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTGCGATTACGATATCGCAGTTCGACGCTTCTTC | 540 |
| UACH-GAQ111 | 309 | TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTGCGATTACGATATCGCAGTTCGACGCTTCTTC | 250 |
| PNS-2014 | 240 | ATCGATGTGCGAGCCTAGACATCCACTGCTGAAAGTTGCTATCTAGTTAAAAGCAGAGAC | 181 |
| UACH-GAQ15 | 180 | TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTGCGATTACGATATCGCAGTTCGACGCTTCTTC | 132 |
| UACH-GAQ13 | 310 | TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTGCGATTACGATATCGCAGTTCG | 240 |
| LJ0912190 | 305 | TTTCGATGACTCACTGAATCCTGCAATTGCGATTACGATATCGCAGTTCG | 235 |

Figura 2.8 Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de ITS con las 10 secuencias con las que tiene mayor similitud.

Un análisis de filogenia de la secuencia del amplicón ITS de *P. capsici* con las secuencias reportadas en la base de datos, demuestra que ITS comparte una rama filogenética con los aislados Pcl-811 y RHN06 de *Phytophthora capsici*.

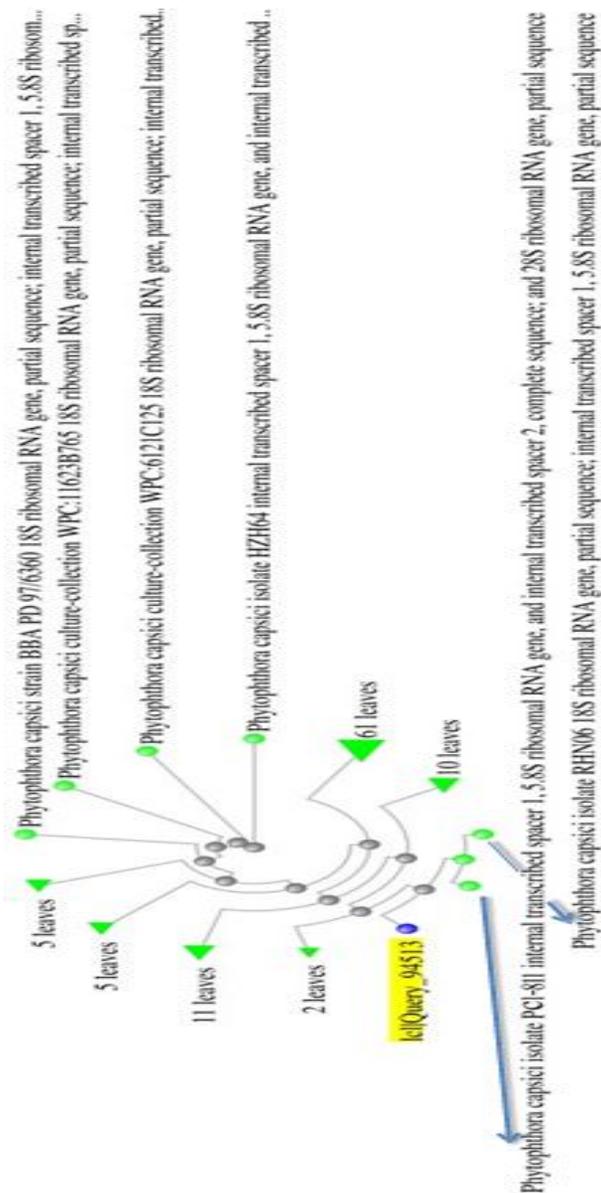


Figura 2.9 Árbol filogenético de *P. capsici*. El alineamiento se realizó con base en la comparación de secuencias nucleotídicas del amplicón ITS con las secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con las que tuvo similitud.

2.4 DISCUSIÓN

Tal como se menciona en los trabajos de Lan *et al.* (2012) y de Shenna *et al.* (2008), con el uso de los cebadores diseñados específicamente, se amplifican segmentos de ADN del género *Phytophthora* (cebadores Yph1F y Yph2R) y de la especie *P. capsici* (Pc1F y Pc1R), sin ninguna amplificación inespecífica. En este trabajo se utilizaron dichos cebadores y se pudo corroborar su especificidad. Con base en esto, en el siguiente capítulo se emplearon estos cebadores pero con otros patógenos del consorcio habitual en la pudrición de la raíz. De esa manera se evaluó la especificidad de estos cebadores en muestras de campo para realizar la detección de *P. capsici* en la península de Yucatán.

En diferentes trabajos para el aislamiento de microorganismos patógenos, se ha utilizado el cultivo en medios selectivos, inclusive en presencia de antibióticos. En este trabajo se optó por una manera mecánica para limpiar el micelio a partir del tejido, con base en el reporte de Solache-Huacuz *et al.* (2010), obteniendo un resultado positivo para el aislamiento del oomiceto, al eliminar las bacterias contaminantes de una manera eficiente y de bajo costo. La secuenciación y la comparación de secuencias confirmó que el microorganismo causante de la enfermedad es el oomiceto *P. capsici*.

Con estos resultados se puede afirmar que el oomiceto *P. capsici* se encuentra presente en la Península de Yucatán, causando la enfermedad conocida como Pudrición de la Raíz a plántulas de chile habanero, ya sea formando parte de consorcios de múltiple composición con otros patógenos y microorganismos oportunistas, o de manera individual.

CAPITULO III

ANÁLISIS DE PATÓGENOS FÚNGICOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN EN RAÍZ, EN LOS CULTIVOS DE *Capsicum chinense* EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.

3.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de que *P. capsici* está asociado con la pudrición de raíz en diversos cultivos, en el chile habanero también existen patógenos que ocasionan pudrición, en su mayoría hongos. Estos producen síntomas similares a los oomicetos y los agentes causales pueden confundirse. Por ello, es pertinente realizar análisis moleculares para conseguir una identificación definitiva. En la península de Yucatán no se ha reportado a la fecha ni la presencia de *P. capsici* ni la incidencia de otros patógenos, teniéndose conocimiento solo de manera empírica y no hay registro de análisis moleculares a nivel campo. Por esta razón es importante saber si alguna especie de hongos está asociada con la pudrición de raíz que se presenta en la Península de Yucatán.

En el Centro del país, los patógenos que mayoritariamente están asociados con la pudrición de raíz y tizones en chile pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Alternaria* respectivamente. Existen reportes sobre el uso de marcadores moleculares para su detección. Sae (2010) realizó trabajos con diferentes especies de *Fusarium* y con diferentes genes, como el “translation elongation factor-1 alpha” (TEF1) y la “RNA polymerase II subunit” (RPB2), obteniendo mejores resultados con TEF1. Mohammad (2012), trabajo con los mismos patosistemas, usando además un ITS como marcador molecular para la detección, aunque obtuvo también mejores resultados con el gen TEF1.

En el caso del género *Alternaria*, hasta donde sabemos, no se ha reportado trabajos para la identificación en el nivel de género y de especies en tejidos enfermos de chile habanero, utilizando al gen TEF1 como marcador molecular. Tomando en cuenta que ya está reportada la secuencia del gen TEF1 de una gama grande de especies y que su secuencia es altamente específica para géneros diferentes, en el presente trabajo se procederá a diseñar cebadores para amplificar específicamente segmentos de ADN genómico de este género y por lo tanto identificarlo mediante la generación de un marcador molecular .

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1 Extracción de ADN genómico

Se utilizó el mismo procedimiento reportado en el Capítulo II.

3.2.2 Diseño de cebadores para *Alternaria* sp.

Se realizó una alineación de la secuencia del gen TEF1 de diferentes especies del género *Alternaria*, que están reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con base en el alineamiento múltiple se buscó una región general que estuviera estrictamente conservada en las 26 especies reportadas del género en el NCBI. A partir de esta región se diseñó un par de cebadores (directo y reverso) denominados AI-TEF1-F y AI-TEF1-R, respectivamente, empleando para su diseño el software "Sigma-Aldrich Primer Tool".

Este par de cebadores bordean un segmento de 100pb, con una temperatura de alineamiento de 50 °C en el esquema de la PCR.

Debido a que las especies *Alternaria solani* y *Alternaria tomato* son las más probables que se encontrarían en el cultivo, se compararon las secuencias y se empalmaron *in silico*, obteniéndose el mismo resultado.

3.2.3 TEF1 como Marcador Molecular para el género *Fusarium*.

Los cebadores que fueron utilizados para la amplificación de secuencias de *Fusarium* sp., se diseñaron con base en el reporte de Mohammad *et al.* (2012). Estos investigadores trabajaron también con ITS, pero obtuvieron mejores resultados amplificando el gen TEF1, generando un fragmento de entre 420 y 460 pb. La temperatura de empalme de los cebadores TEF-Fu3f (GGTATCGACAAGCGAACCAT) y TEF-Fu3r (TAGTAGCGGGGAGTCTCGAA) es de 55 °C.

3.2.4 Procesamiento de muestras y PCR de punto final

Las muestras colectadas fueron etiquetadas y almacenadas en bolsas de plástico con cierre hermético y resguardadas en una nevera. Las etiquetas contenían el lugar de procedencia, incluyendo la localidad, el municipio y el estado, así como la fecha de colecta.

Las muestras para la amplificación del ADN de los patógenos en estudio fueron procesadas de acuerdo con las instrucciones del “Phire Plant Direct PCR Kit”. En breve, segmentos de muestra de cinco mm fueron triturados con la solución de resuspensión y el extracto se centrifugó por 15 seg a 10,000 x g. Se tomó una muestra de 5 µL del sobrenadante como sustrato para una reacción de 20 µL de PCR, como se indica en la tabla 3.1

Cuadro 3.1 Componentes de la reacción de PCR Directo

| Componentes | 20 µL x 1 reacción | Concentración final |
|---------------------------|--------------------|---------------------|
| H ₂ O | aforar a 20 µL | |
| 2X Phire Plant PCR Buffer | 10 µL | 1x |
| Cebador Directo | X | 0.5 µM |
| Cebador Reverso | X | 0.5 µM |
| Polimerasa | 0.4 µL | |
| Templado | 0.5 µL | |

En la Cuadro 3.2 se muestran los parámetros de la amplificación por PCR todos los cebadores a 58 °C con un tiempo de alineamiento de 30 segundos excepto los cebadores de *Alternaria* spp que se dejaba a 10 segundos.

Cuadro 3.2 Protocolo de PCR directo recomendado.

| Pasos | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|--------------------------|---------------|----------------------------|--------|
| Inicio desnaturalización | 98 °C | 5 min | 1 x |
| Desnaturalización | 98 °C | 5 s | 40x |
| Alineamiento | - | - | |
| Extensión | 72 °C | 20s ≤ 1kb 20 s/kb > 1kb | |
| Paso final | 72 °C 4 °C | 1 min - | 1x |

Los productos de PCR fueron fragmentados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con 1 µg·mL⁻¹ de bromuro de etidio

3.3 RESULTADOS

En la figura 3.1 se muestra el alineamiento de los cebadores con una región muy conservada del gen TEF1 en el género *Alternaria*.

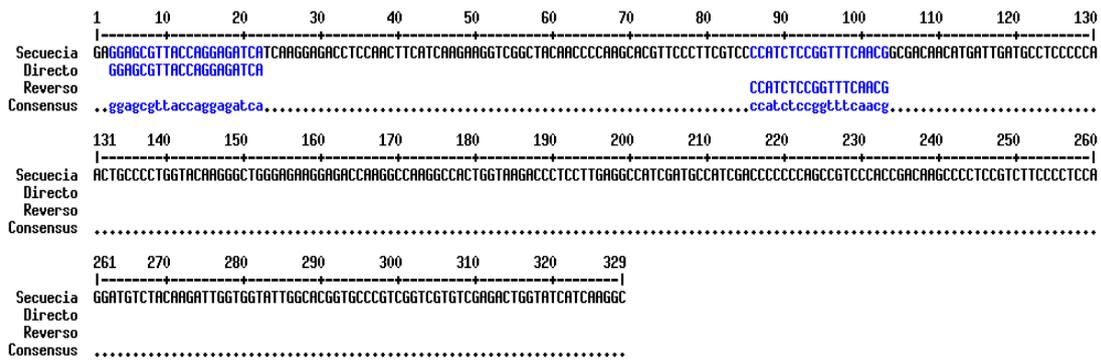


Figura 3.1 Cebadores para amplificación específica de ADN genómico del género *Alternaria*. Se muestra la región más conservada en diferentes especies del género *Alternaria*. Las secuencias en color azul representan el cebador directo (AI-TEF1-F) y el cebador reverso (AI-TEF1-R).

Como se muestra en las figuras 3.2 y 3.3, los cebadores específicos para amplificar ADN de *Alternaria* o *Fusarium* demostraron su sensibilidad y que no existe amplificación cruzada. Lo anterior es corroborado por el trabajo de Mohammad *et al.* (2012), quienes emplearon estos cebadores para detectar diferentes especies de *Fusarium*. Por otro lado, los datos corroboran experimentalmente que el diseño de cebadores empleando la región conservada en las 27 especies de *Alternaria* fue acertado, pues no amplifica ADN de otras especies de la región del consorcio de patógenos ni con el hospedante.

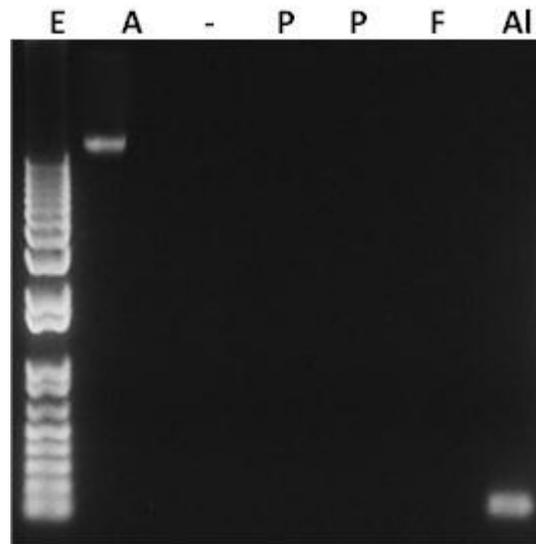


Figura 3.2 Cebadores para la amplificación específica de ADN genómico por PCR directo en *Alternaria alternata*. E: Escalera de ADN de 1kb; A: ADNg de *A. alternata*; (-) Control Negativo sin ADNg; P: Género *Phytophthora* con los cebadores YPh1; PC: Especie *Phytophthora capsici* con cebadores Pc1; F: Género *Fusarium* con cebadores TEF-Fu3; AI: Género *A. alternata* con cebadores AI-TEF1-F y AI-TEF1-R.

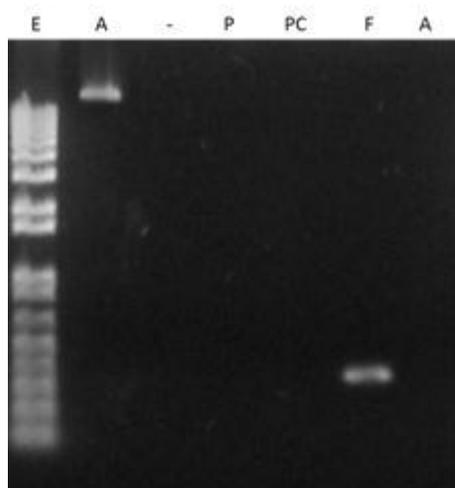


Figura 3.3 Cebadores para la amplificación específica de ADN genómico de *Fusarium solani*. E: Escalera de ADN de 1kb; A: ADNg de *A. alternata*; (-) Control Negativo sin ADNg; P: Género *Phytophthora* con los cebadores YPh1; PC: Especie *Phytophthora capsici* con cebadores Pc1; F: Género *Fusarium* con cebadores TEF-Fu3; AI: Género *A. alternata* con cebadores AI-TEF1-F y AI-TEF1-R.

Con base en lo anterior, se procedió a realizar pruebas en campo con plantas que presentaban sintomatologías de pudrición de la raíz, empleando el sistema que utiliza directamente tejido enfermo de la planta como fuente del ADN molde para la PCR. Para ello, se seleccionó uno de los tres estados de la península de Yucatán, cuya identidad se mantendrá en secreto debido a los convenios de confidencialidad que se establecieron con los productores.

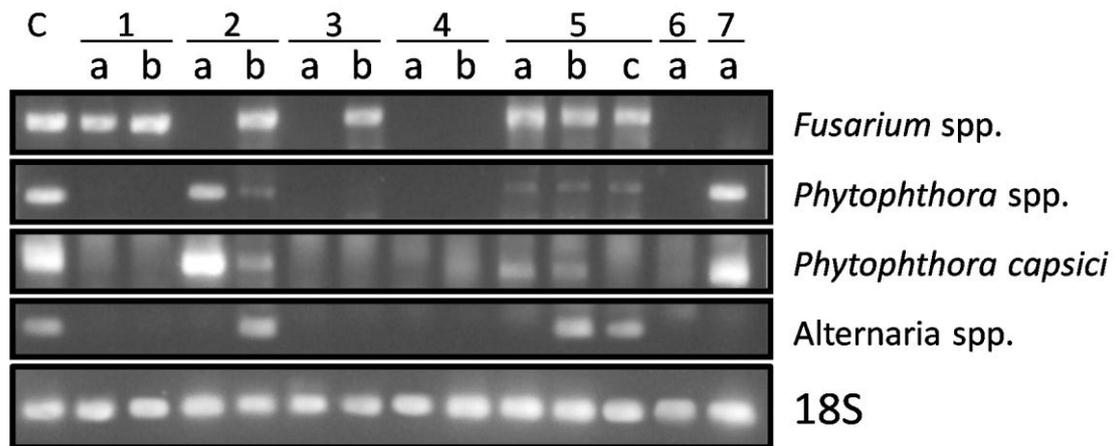


Figura 3.4 Evaluación de los cebadores para la amplificación por PCR directo en plantas colectadas en uno de los estados de la península de Yucatán. Una alícuota de 3 μ L del producto de PCR directo a partir de ADN extraído de diferentes plantas (a o b) cultivadas en diferentes localidades fue fraccionada por electroforesis en agarosa y teñida con 1 μ g \cdot L⁻¹ de bromuro de etidio. Carril C: Testigo positivo; carril 1: Localidad uno; carril 2: Localidad dos; carril 3: Localidad tres; carril 4: Localidad cuatro; carril 5: Localidad cinco; carril 6: Localidad seis; carril 7, localidad siete; 18S: amplificación del gen ribosomal 18S como testigo de igualdad en la cantidad de ADN empleado como molde.

Como se observa en la Figura 3.4, el uso de cebadores específicos para determinar el género de diferentes hongos fitopatógenos permitió conocer que existe una conformación del consorcio diferente en cada localidad y aún en cada planta enferma analizada. Es decir, en las diferentes localidades se encontró un consorcio diferente asociado con las plantas con síntomas de pudrición de la raíz. En tres plantas del total se encontró solamente al género *Fusarium* spp. (1a, 1b y 3b); en dos plantas se encontró únicamente al género y a la especie de *Phytophthora* estudiados (2a y 7a); en una planta se encontró a *Fusarium* spp. y a *P. capsici* (5a); en tres plantas se

encontró a los tres patógenos del estudio (2b, 5b y 5c); en cuatro de las plantas enfermas no se encontró a ninguno de los microorganismos analizados en este estudio (3a, 4a, 4b y 6a); es interesante observar que en ninguno de los casos se encontró solo al género *Alternaria*, por lo que podría pensarse que este patógeno actúa como oportunista en los consorcios en donde se le encontró.

3.4 DISCUSIÓN

El uso de cebadores específicos para género y especie, permitió analizar la conformación de los consorcios asociados con la enfermedad del chile habanero, conocida como pudrición de la raíz. Los resultados mostraron que los consorcios están conformados de manera diferencial. Aunque no se descarta la presencia de otros patógenos que no fueron considerados en este estudio, los resultados mostraron que el género *Alternaria* no se presenta de manera individual, lo cual coincide con los reportes donde usan marcadores tipo ITS en alimentos y que señalan que las especies de este género son patógenos oportunistas, (Pavón *et al.*, 2011). .

Por otro lado, estos resultados demuestran que la utilización de segmentos de tejido infectado como fuente directa de ADN (sin necesidad de extracción), sí permite la amplificación específica por PCR del ADN para cada patógeno. Este método tiene la ventaja de que la estructura del ADN se mantiene estable de acuerdo con las condiciones fisiológicas de la planta, y su composición no depende de las condiciones de cultivo. También, el uso de tejidos como fuente de ADN reduce el tiempo de obtención de resultados y disminuye el costo.

Un requisito fundamental para la detección exitosa de microorganismos patógenos de manera específica, mediante los ensayos de PCR, es elegir marcadores genéticos adecuados, durante el proceso de diseño de cebadores, que permiten un alto grado de especificidad (Scheu *et al.*, 1998). Lo anterior se vio confirmado con la prueba en plantas en campo realizada en este trabajo, con lo que se confirmó que el uso de cebadores permite una determinación altamente específica y con mayor rapidez.

De manera especial, se hace notar que en plantas de tres localidades se encontró al oomiceto *P. capsici*, lo que sugiere de manera presuntiva que este patógeno sí se encuentra presente en la península de Yucatán. Por lo anterior, se procedió a corroborar la identidad de este patógeno, mediante la evaluación de los postulados de

Koch y mediante la secuenciación del amplicón que se generó de los aislados primario y secundario, que se obtuvieron al evaluar esos postulados. La evaluación por tanto se hizo con las plantas en las que sólo se encontró a *P. capsici* asociado a la pudrición de la raíz; esto es, la planta de la localidad número siete y una de las dos plantas de la localidad número dos.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE *Phytophthora capsici* Y DEL CONSORCIO CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DE LA RAÍZ EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

4.1 INTRODUCCIÓN

Existen diferentes estudios para conocer la incidencia de *P. capsici* en la pudrición de raíz en México, así como para determinar su distribución en campo, tanto en el Centro como en el Norte del país, empleando metodologías basadas en la morfología, en su detección tisular y también con base en la prueba de PCR (Morales Valenzuela *et al.*, 2002; Rico-Guerrero *et al.*, 2004; Silva-Rojas *et al.*, 2009; Zapata-Vázquez *et al.*, 2012). No obstante, estos estudios no se han realizado en la Península de Yucatán, en donde tradicionalmente se ha asumido que por las características agroclimáticas este oomiceto no se encuentra presente.

Una vez que se determinó, mediante técnicas moleculares, que *P. capsici* sí se encuentra presente, se procedió a analizar su distribución en la Península de Yucatán, así como la distribución de los otros dos patógenos del consorcio, considerados en este trabajo. Para ello, se aplicaron las técnicas de purificación de los patógenos colectados en los tejidos dañados que ya se describieron en capítulos anteriores. Rodríguez-Moreno *et al.* (2004) mencionaron que en la región Centro-Norte de la República Mexicana los factores de humedad, salinidad y el pH, no tienen una influencia en la virulencia o en el desarrollo de la enfermedad;. Por esta razón, se decidió ampliar el estudio para muestrear de manera representativa las diferentes regiones de la Península de Yucatán en donde se siembra chile habanero ya que en la Península no se han hecho reportes.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1 Determinación de lugares de colecta en la Península de Yucatán.

La Península de Yucatán está dividida en tres estados, Campeche, Quintana Roo y Yucatán. En el caso de Yucatán, no hay cultivos de chile habanero en la zona norte por ser una región costera, por lo que no se tomará en cuenta para este estudio. En cambio, los muestreos serán realizados en las zonas Sur y Oriente, específicamente en las localidades de Muna (20°29'5.70"N, 89°42'47.03"O), Santa Elena, (20°19'54.74"N 89°39'26.77"O), Halachó (20°28'49.56"N, 90° 4'46.60"O)y Maxcanú, (20°35'13.54"N, 90° 0'16.79"O) donde se siembra el mayor volumen de chile habanero en este estado.

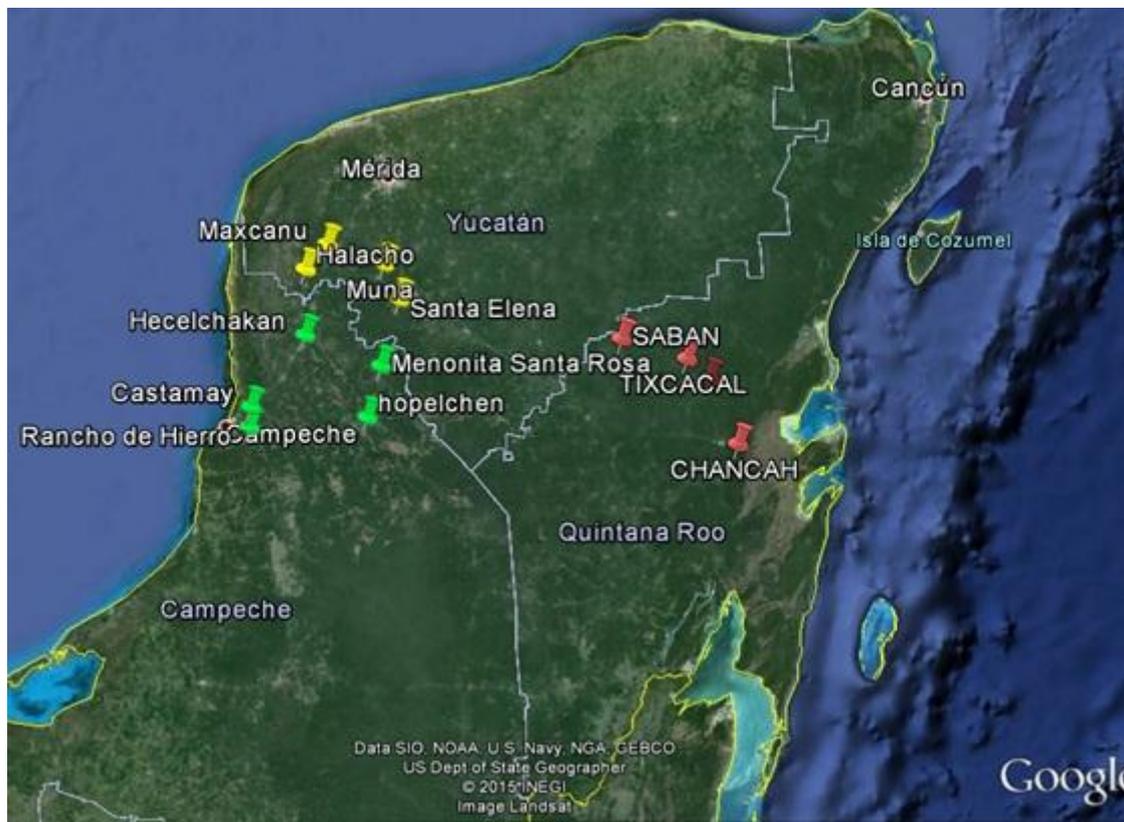


Figura 4.1 Lugares de colecta en la Península de Yucatán. Se muestra las zonas donde se realizó el muestreo (Modificado de una imagen de Google Earth, 2014).

Con relación al Estado de Quintana Roo, se seleccionaron las localidades de Sabán (20° 1'59.19"N, 88°32'57.82"O), Tixcacal, (19°51'5.26"N, 88° 9'48.75"O), Santa Rosa

(19°58'44.51"N, 88°15'32.06"O) y Chanchah, (19°29'31.74"N, 87°59'34.67"O), que son los principales productores de chile habanero. En esos municipios existen 25 localidades productoras, de las cuales en 14 actualmente tienen cultivo de chile habanero de las cuales cuatro se muestrearon al azar (ver Figura 4.1).

En el estado de Campeche hay reportadas 23 localidades que siembran chile habanero, distribuidas a lo largo del Estado (Castillo-Aguilar, comunicación personal). De estas localidades, se seleccionaron cuatro localidades aleatoriamente, pero que son representativas de diferentes sistemas agroclimáticos, Hopelchén (19°46'0.20"N, 89°52'12.00"O), Área Menonita (19°57'16.21"N, 89°57'47.36"O), Hecelchakán, (20°10'49.30"N 90° 8'43.81"O) y Rancho de Hierro (ver Figura 4.1).

Con respecto a las temporadas de colecta, se revisó el informe de precipitación pluvial de la CONAGUA, para determinar la mejor época del año para realizarlas, debido a que *P. capsici* es un patógeno del suelo, cuya diseminación es preferentemente a través de zoosporas móviles en encharcamientos y otros cuerpos de agua. De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), la mayor precipitación media pluvial tanto a nivel nacional como en la Península de Yucatán, ocurre entre los meses de junio y octubre.

4.2.2 Análisis estadístico. Muestreo aleatorio simple y selección de tamaño muestra.

Es la extracción de una muestra de una población finita, donde el proceso de extracción garantiza que cada una de las muestras posibles de determinado tamaño tiene la misma probabilidad de ser elegida. En tal caso, todos los elementos de la población tendrán la misma oportunidad de ser incluidos en la muestra resultante. Esta condición no garantiza la representatividad de la muestra, pero en el caso de que el tamaño de la muestra sea lo suficientemente grande, es altamente probable que si lo consiga, entendiendo la representatividad en el sentido de que si en la población un determinado porcentaje de individuos presenta la característica A, en la muestra resultante dicha condición estará presente en un porcentaje muy similar (tan similar como se desee aumentando suficientemente la muestra).

La selección de tamaño de la población se reparte de la siguiente forma:

$$n = \frac{Z^2 \alpha/2 PQN}{\varepsilon^2 (N - 1) + Z^2 PQ}$$

n = tamaño necesario de la muestra

Z = margen de confiabilidad

P = probabilidad de que el evento ocurra

Q = probabilidad de que el evento no ocurra

E = error de estimación

N = tamaño de la población

Con base en lo anterior, el tamaño de la muestra en la población tuvo un nivel de confiabilidad de 93% y un 7% de error para la determinación del tamaño de la población que se colectó. Cada muestra fue analizada molecularmente por medio de la técnica de PCR de punto final, con los cebadores diseñados para cada tipo de patógeno. Los resultados se reportaron como prueba positiva o negativa.

4.3 RESULTADOS.

4.3.1 Evaluación de los cebadores diseñados para amplificar ADN de *P. capsici*, de *Fusarium spp* y de *Alternaria spp*.

Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, se diseñaron diferentes juegos de cebadores para la amplificación de ADN de los géneros *Phytophthora*, *Fusarium* y *Alternaria*, así como también para las especies *P. capsici*, *F. oxysporum* y *A. solani*. La efectividad de estos cebadores fue probada empleando como fuente de ADN ya sea el micelio del microorganismo o bien tejidos de chile infectados en el laboratorio con los patógenos indicados. La especificidad de los mismos fue evaluada de manera indirecta mediante la amplificación de ADN del género *Fusarium* empleando los mismos templados. Como puede observarse en las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 los cebadores específicos amplificaron de manera específica al género para el que fueron diseñados, por lo que se entonces se utilizaron para realizar los análisis en muestras de colectadas en campo, representativas de diferentes regiones donde se siembra el chile habanero en la Península de Yucatán.

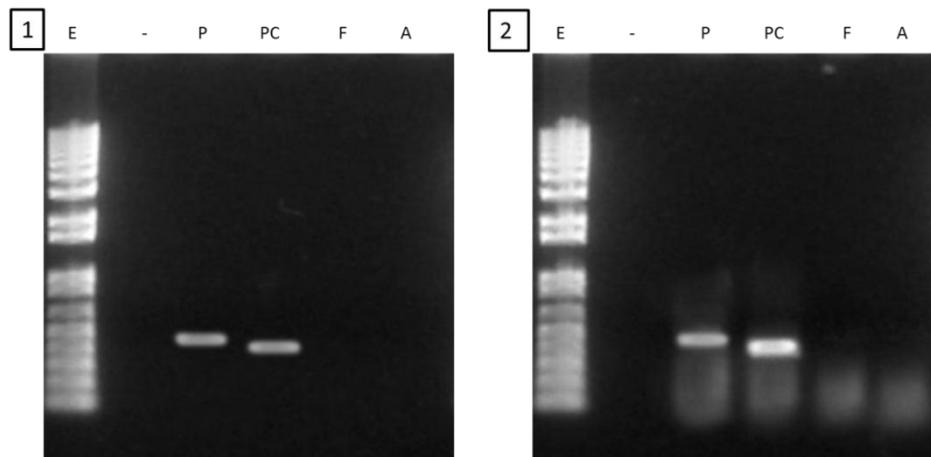


Figura 4.2 Evaluación de los cebadores para la amplificación por PCR directo en *P. capsici*. Carril E: Escalera de ADN de 1kb; carril (-): testigo negativo sin cebadores; carril P: cebadores YPh1 para el género *Phytophthora*; carril PC: cebadores Pc1 para la especie *P. capsici*; carril F: cebadores TEF-Fu3 para el género *Fusarium*.; Carril A: cebadores AI-TEF1 para el género *Alternaria*.

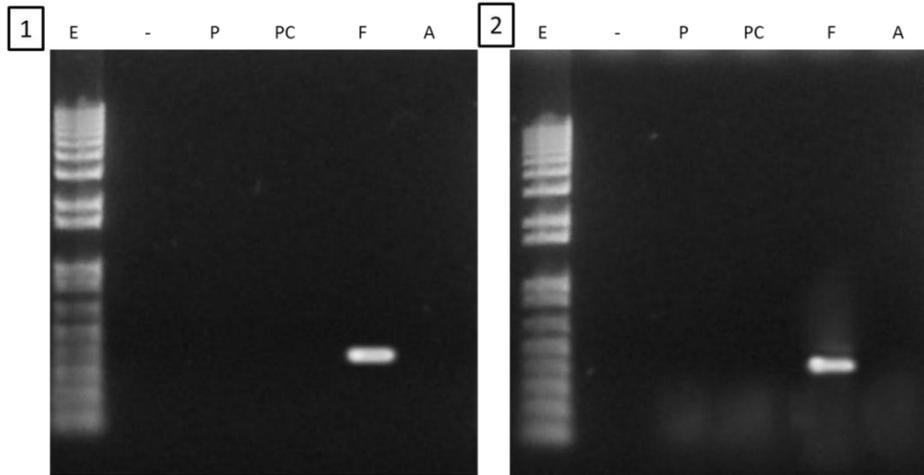


Figura 4.3 Evaluación de los cebadores para la amplificación por PCR directo de ADN genómico de *Fusarium solani*. Carril E: Escalera de ADN de 1kb; carril (-) Testigo negativo sin cebadores; carril P; cebadores YPh1 para el género *Phytophthora*; carril PC; Cebadores Pc1 para la especie *P. capsici*; carril F: Cebadores TEF-Fu3 para el género *Fusarium*; Carril A: cebadores AI-TEF1 para el género *Alternaria*.

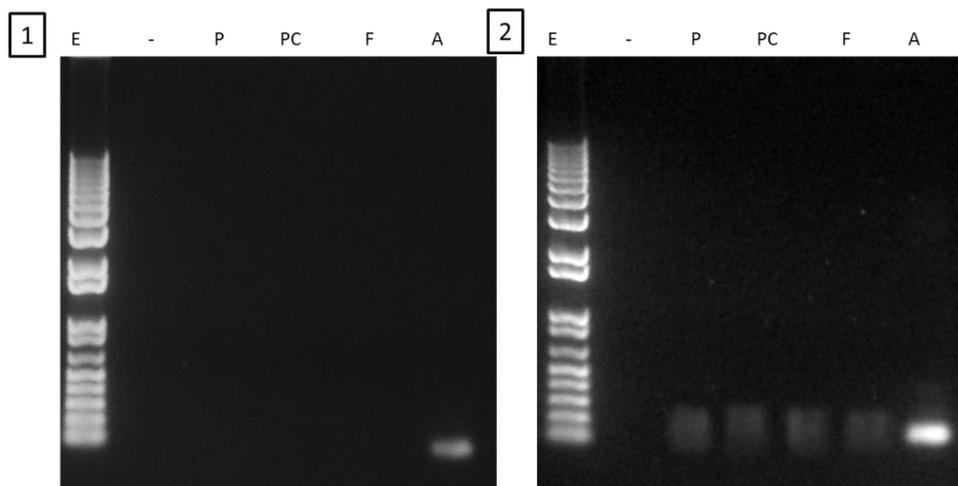


Figura 4.4 Evaluación de los cebadores para la amplificación de ADN de *Alternaria* a partir de micelio y de tejido directamente. Carril E: Escalera de ADN de 1kb; carril (-) Testigo negativo sin cebadores; carril P; cebadores YPh1 para el género *Phytophthora*; carril PC; Cebadores Pc1 para la especie *P.capsici*; carril F: Cebadores TEF-Fu3 para el género *Fusarium*; Carril A: cebadores AI-TEF1 para el género *Alternaria*.

Los experimentos en el laboratorio demostraron que sí se puede detectar ADN genómico mediante PCR directo, empleando cortes de hoja como fuente directa de ADN, sin necesidad de extraerlo. Por lo tanto, se procedió a realizar estos ensayos en campo en las diferentes localidades de la Península de Yucatán.

4.3.2 Procesamiento de muestras y PCR de punto final

Tal como se explica en el capítulo II.

4.3.3 Distribución de *Phytophthora capsici*, y del consorcio causante de la pudrición de la raíz del chile habanero en la Península de Yucatán.

Los datos de pruebas positivas después de la amplificación por PCR directo a partir de las muestras colectadas en las localidades mencionadas se muestran en la Figura 4.5 y en la Cuadro 4.1.

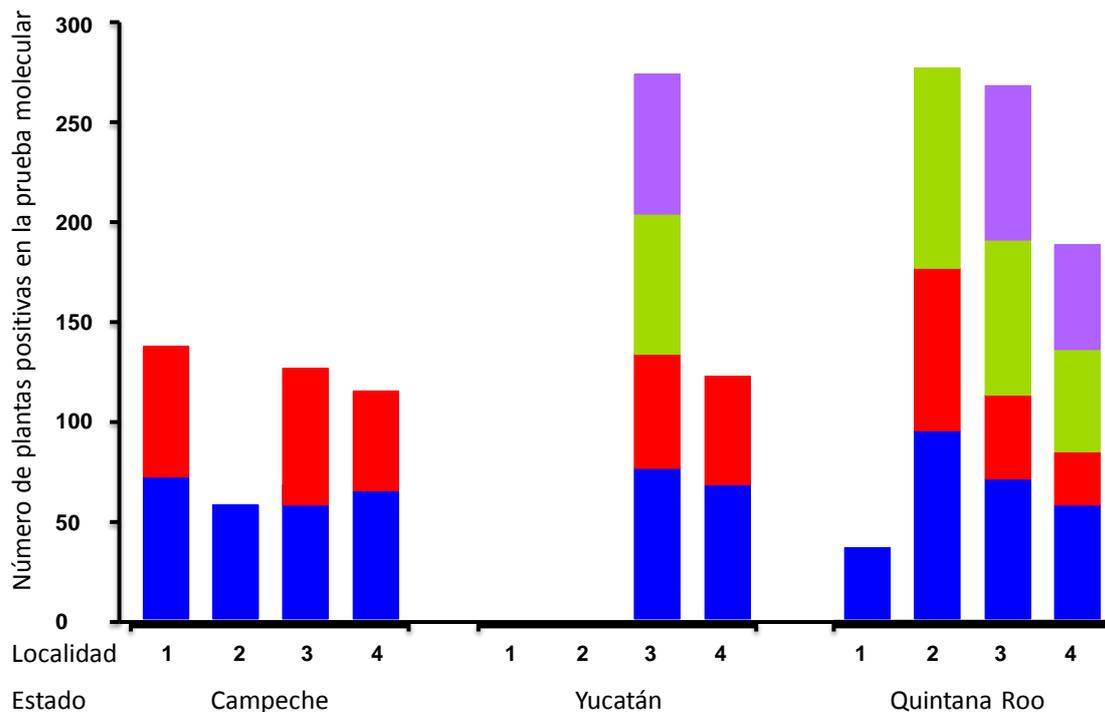


Figura 4.5 Distribución geográfica de microorganismos presentes en el consorcio causante de la Pudrición de la Raíz en la Península de Yucatán. Se muestra el número de plantas positivas a la presencia de patógenos en plantas colectadas en cada una de las cuatro localidades de los tres estados que conforman la Península de Yucatán. **Barra de color azul:** el género *Fusarium* spp.; **barra de color rojo:** el género *Alternaria* spp.; **barra de color verde:** el género *Phytophthora* spp.; **barra de color morado:** la especie *P. capsici*.

Cuadro 4.1. Resultados de la detección molecular de fitopatógenos asociados a la Pudrición de la Raíz del Chile Habanero en la Península de Yucatán.

| Estado | Localidad | Plantas sanas | Plantas enfermas | <i>Fusarium ssp</i> | <i>Alternaria ssp</i> | <i>Phytophthora ssp</i> | <i>P. capsici</i> | Edad ¹ | Tamaño ² | Precipitación ³ | Temperatura ⁴ | Varietal |
|--------------|-----------|---------------|------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------|--------------|
| Campeche | 1 | 164 | 91 | 73 | 65 | 0 | 0 | 2 | 30 | 112 | 30 | Chichen Itzá |
| | 2 | 150 | 91 | 59 | 0 | 0 | 0 | 4 | 50 | 54 | 33 | Criollo |
| | 3 | 166 | 97 | 69 | 58 | 0 | 0 | 1 | 15 | 143 | 34 | Orange |
| | 4 | 168 | 102 | 66 | 50 | 0 | 0 | 2 | 30 | 100 | 41 | Jaguar |
| Yucatán | 1 | 167 | 100 | 67 | 0 | 0 | 0 | 2 | 35 | 140 | 36 | Jaguar |
| | 2 | 167 | 114 | 53 | 0 | 0 | 0 | 5 | 120 | 124 | 31 | Orange |
| | 3 | 170 | 93 | 77 | 57 | 70 | 70 | 20 días | 10 | 170 | 37 | Jaguar |
| | 4 | 160 | 91 | 69 | 24 | 30 | 0 | 2 | 30 | 177 | 37 | Criollo |
| Quintana Roo | 1 | 162 | 124 | 38 | 38 | 0 | 0 | 6 | 200 | 46 | 38 | Génesis |
| | 2 | 165 | 65 | 100 | 96 | 81 | 100 | 8 | 150 | 389 | 34 | Génesis |
| | 3 | 167 | 90 | 77 | 72 | 42 | 77 | 5 | 45 | 326 | 35 | Criollo |
| | 4 | 157 | 98 | 59 | 59 | 26 | 52 | 4 | 50 | 142 | 34 | Chichen Itzá |
| Estado | Localidad | Tipo de Suelo | Tipo de Cultivo | | | | | | | | | |
| Campeche | 1 | Luvisol | Campo | | | | | | | | | |
| | 2 | Luvisol | Campo | | | | | | | | | |
| | 3 | Leptisol | Campo | | | | | | | | | |
| | 4 | Luvisol | Campo | | | | | | | | | |
| Yucatán | 1 | Campo | Campo | | | | | | | | | |
| | 2 | Campo | Campo | | | | | | | | | |
| | 3 | Sustrato | Invernadero | | | | | | | | | |
| | 4 | Campo | Campo | | | | | | | | | |
| Quintana Roo | 1 | Luvisol | Invernadero | | | | | | | | | |
| | 2 | Leptisol | Invernadero | | | | | | | | | |
| | 3 | Leptisol | Invernadero | | | | | | | | | |
| | 4 | Sustrato | Invernadero | | | | | | | | | |

1: Edad en meses
 2: Tamaño en centímetros
 3: Precipitación en milímetros
 4: Temperatura en grados Celsius

Como puede observarse, en Campeche no se encontraron plantas con la presencia de *P. capsici*, lo que sugiere que en ese estado otros microorganismos deben ser los causantes de la Pudrición de la Raíz. Otro dato interesante es que *P. capsici* fue encontrado en Yucatán y en Quintana Roo solamente en invernadero, lo cual sugiere que es un microorganismo introducido por las prácticas de cultivo. También, en Yucatán y en Quintana Roo se encontró al género *Phytophthora*, pero no a la especie *P. capsici*, lo que sugiere la presencia de otra especie de ese género que puede también estar infectando al chile habanero en esta región.

4.4 DISCUSIÓN

Según Vaillant Flores y Gómez Izaquirre (2009), la diseminación en campo de *P. infestans* disminuye de manera proporcional con el aumento de la temperatura. Lo anterior puede ayudar a explicar, por su parte, la baja incidencia de *P. capsici* en la península de Yucatán. Sin embargo, existen otros factores que también pueden afectar; por ejemplo, Rico-Guerrero (2002) habla sobre una tolerancia relativa a los participantes del complejo que causa la Pudrición de la Raíz, y que hay ciertas variedades de chiles en donde *P. capsici* está menos representado que especies de los géneros *Fusarium* y *Alternaria*. Sin embargo, conceden que sus estudios se basan en el aislamiento tradicional del oomiceto, por lo que ellos recomiendan realizar la identificación y caracterización molecular, que es más confiable.

Los resultados obtenidos con las plantas enfermas en donde no se encuentra *P. capsici*, pero sí otros patógenos, podrían explicarse por la presencia de microorganismos competidores; por ejemplo, se ha observado que la presencia de oomicetos del género *Pythium* inhibe el crecimiento de *P. capsici* por competencia de nutrientes.

Aunque existen factores que afectan la incidencia de *P. capsici* como agente causal de la Pudrición de la Raíz, como el volumen de lluvia, el tipo de suelo con relación a la retención de agua, y la edad del hospedante, éstos no parecen haber sido determinantes para la incidencia de *P. capsici* que se encontró en este estudio, pues se sabe bien que *P. capsici* es de clima templado y en los predios en donde se encontró *P. capsici* la temperatura es superior a los 30 °C. Aunque los estados con resultados positivos si son los que tuvieron los altos índices más altos de precipitación

pluvial.

Cabe mencionar que otro factor que influyó fue el tipo de cultivo, pues *P. capsici* se encontró solamente en invernaderos. Esto podría deberse a que el ambiente es más húmedo que el de los espacios a cielo abierto; sin embargo, es más probable que el factor determinante sea la falta de control estricto de los aspectos fitosanitarios. Por ello, se puede decir que a pesar de que hay varios factores que propician la enfermedad, el factor más importante es el manejo, como se mencionó antes, pues en muchos casos fue por falta de recursos y por desconocimiento de los productores que aparecieron las plagas en general.

La lluvia y los estancamientos de agua son un factor importante para desencadenar la patogénesis, y los cultivos en invernaderos (cuando existe mal manejo) pueden propiciar más la presencia de *Phytophthora*.

Otro punto a mencionar es que existe mayor presencia de otros patógenos que del mismo *P. capsici*. Como se observa en los anexos y en los experimentos desarrollados en este trabajo, la Pudrición de la Raíz está presente en toda la península.

Por otro lado, se ha visto que la incidencia de esta enfermedad es más común en plántulas que en plantas adultas. Eso es fácilmente explicable pues las plantas adultas han desarrollado barreras físicas que retardan o impiden la invasión del patógeno. Esto parece tener concordancia con los resultados obtenidos en uno de los predios, donde se encontró la mayor incidencia de la Península y las plántulas tenían apenas 20 días de edad. Las plántulas infectadas en otras localidades que fueron positivas tenían entre 4 y 5 semanas de edad, lo que corrobora el efecto de la edad sobre la susceptibilidad a la infección.

CAPITULO V

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIÓN

Con base en los datos obtenidos a través del análisis con el marcador molecular YTP1, se puede afirmar que el oomiceto *P. capsici* si se encuentra presente en la Península de Yucatán, como agente causal de la enfermedad del chile habanero conocida como Pudrición de la Raíz, entonces la hipótesis del presente trabajo es nula.

La presencia de *P. capsici* no está distribuida en los tres estados de la Península de Yucatán, por lo que su expansión no es generalizada. Se encontró en sistemas protegidos de producción de chile habanero, donde las condiciones de humedad son más elevadas al interior de las casas sombra o invernaderos. Entonces se puede afirmar que la incidencia del oomiceto puede deberse a dos factores, a las condiciones de las casas sombra o invernaderos y a malos cuidados fitosanitarios durante las primeras etapas del cultivo, más que a la presencia “natural” de este patógeno. Por lo anterior puede sugerirse que *P. capsici* es un microorganismo patógeno introducido en la Península de Yucatán.

Hubo otras incidencias en las plantas colectadas en los diferentes estados de otros patógenos, utilizando a TEF1 como marcador molecular se detectó tanto a *Fusarium* spp. como a *Alternaria* spp. Este último es al parecer un patógeno oportunista obligado ya que siempre se encontró acompañado con otro patógeno. Con lo anterior se puede afirmar que el marcador molecular TEF1 generado para *Alternaria* spp. fue eficiente y este hongo se encuentra presente en el consorcio causante de la Pudrición de la Raíz del chile habanero.

5.2 PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede ahora realizar otros estudios para identificar otros patógenos involucrados en las enfermedades que se vieron en el campo, ya que en este trabajo no se analizó la presencia de microorganismos de los géneros *Rhizoctonia* y *Colletotrichum*.

Puede también realizarse un estudio en diferentes épocas del año para ver la fluctuación de la patología a lo largo del tiempo.

Además, debido a que la presencia del oomiceto parece ser el resultado de actividades humanas, se hace obligatorio realizar talleres de concientización y sobre todo de capacitación en el manejo de los cultivos bajo normas fitosanitarias, además de generar proyectos en colaboración con los agricultores para mejorar la calidad del cultivo de chile habanero.

BIBLIOGRAFÍA

- Aegerter BJ, Nunez JJ, Davis RM (2002) Detection and management of downy mildew in rose rootstock. *Plant Dis* 86:1363–1368
- Agrios GN, (2005). *Plant pathology*, 5ta. Ed, Academic press, inc. University of Florida. Pp 409-421.
- Andrews J, (1999). *The paper trail, History and recipes from around the world*, Deaton, Texas, University of North Texas Press.
- Bayer CropScience 2011, *Informacion técnica, Enfermedades del chile y tomate en mexico*; Pp 5-7.
- Contreras NN, Gómez A, Carrasco Y, Camino J, 1999. Biovar de *Ralstonia solanacearum* afectando ají dulce. *Fitopatología Venezolana* 12: 35.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, pp. 562 .
- Fiori M, Schaffino A, 2004. Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annum* L) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp *caratovora*. *Journal of Phytopathology* 152: 28-33.
- Galindo AJ, 1971. Estudio preeliminar sobre el mosaico del chile serrano (*Capsicum annum* L.) en el Noroeste de México. *Soc. Amer. De Fitop. Div. Caribe*, p. 45-46
- Garzon TJ, Torres PI, Ascencio IJ, Herrera EL, and Rivera, BR, (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology*. 83:514-521
- Lamour K, and Kamoun S, (2009). *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*, Wiley-Blackwell, New Jersey P 174.
- Lamour K, Stam R, Jupe J, And Huitema E, (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*

-
- Lan C. Z., Liu P. Q. & Li B. J., Chen Q. H., Weng Q. Y. (2012) Development of a specific PCR assay for the rapid and sensitive detection of *Phytophthora capsici* Plant Pathol, Volume 42, Issue 3, pp 379-384
- Lan C. Z., Liu P. Q. & Li B. J., Chen Q. H., Weng Q. Y. (2012) Development of a specific PCR assay for the rapid and sensitive detection of *Phytophthora capsici* Plant Pathol.
- Leonian L.(1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology. 12:401-408
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y, Ivors K (2012) Identification and detection of Phytophthora: reviewing our progress, identifying our needs. Plant Dis 96:1080–1103
- Meng J, Wang Y (2010) Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and soil samples based on its Ypt1 gene. J Phytopathol 158:1–7
- Meng J, Wang Y, (2010) Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and soil samples based on its Ypt1 gene. J Phytopathol 158:1–7.
- Moguel F, Brito LE, and Islas I, (2006). Purificación parcial y clonación de una defensina de *Capsicum chinense* unidad de bioquímica y biología molecular de plantas. Centro de investigación científica de Yucatán, México, Mérida Yucatán. Pp 23-30
- Mohammad Arif, Shilpi Chawla, N. W. Zaidi, J. K. Rayar M. Variar and U. S. Singh, (2012), Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene, African Journal of Biotechnology Vol. 11(2), pp. 444-447
- Morales Valenzuela G, Redondo Juárez E, Covarrubias Prieto J, Cárdenas Soriano E (2002) Detección y Localización de *Phytophthora capsici* Leo. en Semilla de Chile. Revista Mexicana de Fitopatología 20:94-97.
- Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Querétaro, Querétaro, México. Resumen F-134.
-

NCBI (National Center for Biotechnology Information), [Citado 10 de agosto 2013].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Padley LD Jr, Kabelka EA, Roberts PD, French R (2008) Evaluation of *Cucurbita pepo* accessions for crown rot resistance to isolates of *Phytophthora capsici*. HortSci 43:1996–1999

Pavón C, Babadoost M, Lambert K (2008) Quantification of *Phytophthora capsici* oospores in soil by sieving-centrifugation and realtime polymerase chain reaction. Plant Dis 92:143–149

Pavón, Miguel Ángel; González, Isabel; Rojas, María; Pegels, Nicolette; Martín, Rosario; García, Teresa, (2011), Pcr Detection Of *Alternaria* Spp. In Processed Foods, Based On The Internal Transcribed Spacer Genetic Marker, Journal Of Food Protection®, Number 2, Pp. 176-345, Pp. 240-247

Pérez W, y Forbes G, (2010). Manual Técnico: El tizón tardío en la papa. Lima, CIP. Pp. 39 – 50.

Pérez, L, Duran L, y Sánchez J, (2002). Identification of fungi that cause "pepper wilt", in The Bajío Region. Proceeding of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas-México. P. 1.

Pineda J, Rodríguez N, Contreras J, Montilla y Renaud J, 2003. Enfermedades en hortalizas diagnosticadas en la región centro-occidental durante 2000-2001. IX Congreso de Hortalizas San Cristóbal-Venezuela. Resúmenes p. 144.

Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and food spoilage*. Springer. London, pp. 519.

Rico GL; Medina RS, Muñoz CI, Guevara L, Guevara GR, Guerrero BZ.; Torres P., I.; Rodríguez G., R; González C., M., (2003) Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR, Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 22, núm. 1, pp. 1-6

Rico-Guerrero L, Medina-Ramos S, Muñoz-Sánchez CI, Guevara-Olvera L, Guevara-González RG, Guerrero-Aguilar BZ, Torres-Pacheco I, Rodríguez-Guerra R y González-Chavira MM (2004) Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de Fitopatología 22:1-6.

-
- Rico-Guerrero, L. 2002. Búsqueda de Resistencia Natural en Plantas de Chile (*Capsicum* spp.) Contra Aislados del Complejo Fúngico que causa Pudrición de Raíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México. 91 p.
- Rico-Guerrero, L. 2002. Búsqueda de Resistencia Natural en Plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra Aislados del Complejo Fúngico que causan Pudrición de Raíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México. 91 p.
- Rico-Guerrero, L., Guerrero-Aguilar, B., López-Vázquez, A., Muñoz-Sánchez, C.I., Guevara-Olvera, L., Guevara González, R.G., Torres-Pacheco, I. y González-Chavira, M. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Memorias XXVIII Congreso
- Rico-Guerrero, L., Guerrero-Aguilar, B., López-Vázquez, A., Muñoz-Sánchez, C.I., Guevara-Olvera, L., Guevara González, R.G., Torres-Pacheco, I. y González-Chavira, M. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Memorias XXVIII Congreso.
- Ristaino JB, Johnston SA (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. Plant Dis 83:1080–1089
- Ristaino, JB, (2000). Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from paper and cucurbit fields in North Carolina. Phytopathol Vol. 80: Pp. 1253 – 1259.
- Rodríguez-Moreno VM, Luna-Ruiz JJ, Valle-García P, Tiscareño-López M, y Ruiz-Corral JA (2004) Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el Centro-Norte de México mediante un sistema de información geográfica. Revista Mexicana de Fitopatología 22:72-81.
- Romero, Y., J. Velásquez, B. Dooal, L. Palacios y D. Rodríguez. 2003. Pudrición basal del tallo de ají dulce (*Capsicum chinense*) y pimentón (*Capsicum annum*) causado por *Fusarium oxysporum* en el estado Falcón. Recomendaciones

para el manejo de la enfermedad. IX Congreso de Hortalizas San Cristóbal-Venezuela. p 137

Sae-Yeon Hong, Mi Ran Kang, Eun-Ji Cho, Hee-Kyoung Kim, and Sung-Hwan Yun, (2010), Specific PCR Detection of Four Quarantine *Fusarium* Species in Korea, Plant Pathol. J. 26(4) : pp 409-416

Schena L, Duncan J, Cooke D (2008) Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. Plant Pathol 57:64–75

Schena L, Duncan J, Cooke D, (2008) Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. Plant Pathol 57:64–75

Scheu P., Berghof M.K., Stahl U., (1998), Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction Food Microbiology, 15, pp. 13–31

SEMARNAT; Chile habanero de la Península de Yucatán [on line]

Disponible en:

http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=306:chile-habanero-de-la-peninsula-de-yucatan&catid=72:infogramas&Itemid=422.

[Acceso el 21 de Octubre de 2010]

Silvar C, Díaz J, Merino F (2005) Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. Phytopathology 95:1423–1429

Silva-Rojas HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC, y Ávila-Quezada GD (2009) Distribución espacio temporal de la Marchitez del Chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 27:134-147.

Solache-Huacuz E, Rodríguez-Alvarado G, Naranjo-Bravo AE, Díaz Celaya M y Fernández-Pavía SP (2010) Técnicas de purificación de aislamientos de *Phytophthora* contaminados por bacterias. *Biológicas* 12(1): 61-64.

The Integrated Taxonomic Information System, [Citado 1 Mayo de 2014].<
<http://www.itis.gov/>>

Vaillant Flores D y Gómez Izaquirre G (2009) Incidencia de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora infestans* en Cuba. *Agric. Téc. Méx* 35(2);219-223.

Waggoner B, (1995) Introduction to the Oomycota: Arkansas: University of Central Arkansas. [on line]

Disponible en: <http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/oomycota.html>

[Acceso 19 Mayo de 2013]

Wang Z, Langston DB, Csinos AS, Gitaitis RD, Walcott RR, Ji P (2009) Development of an improved isolation approach and simple sequence repeat markers to characterize *Phytophthora capsici* populations in irrigation ponds in southern Georgia. *Appl Environ Microbiol* 75:5467–5473

Zapata-Vázquez A, Sánchez Sánchez M, del-Río-Robledo A, Silos-Espino H, Perales-Segovia C, Flores-Benítez S, González-Chavira MM, and Valera-Montero LL (2012) *Phytophthora capsici* epidemic dispersion on commercial pepper fields in Aguascalientes, Mexico. *The Scientific World Journal* 2012: 5 pages.

Zhang Z, Li Y, Fan H, Wang Y, Zheng X (2006) Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. *Plant Pathol* 55:770–775

ANEXOS**ANEXO I. Imágenes de los sitios de colecta en la Península de Yucatán.****1 Quintana Roo. Ejemplos de plantas muestreadas en diferentes localidades.**

Se observaron aparte de la pudrición de la raíz, otras enfermedades, se encontró nematodos en su mayoría en esta región.



2 Campeche. Ejemplos de plantas muestreadas en diferentes localidades.
Principalmente los encharcamientos propiciaron enfermedades en esta región.



- 3 Yucatán. Ejemplos de plantas muestreadas en diferentes localidades.** La mayoría de los casos presentaron virosis, también era más notorio el estrangulamiento ocasionado por la pudrición de la raíz.