

## ETIOLOGÍA DE LA MARCHITEZ DEL ‘CHILE DE AGUA’ (*Capsicum annuum* L.) EN OAXACA, MÉXICO

## ETIOLOGY OF PEPPER WILT DISEASE OF ‘CHILE DE AGUA’ (*Capsicum annuum* L.) IN OAXACA, MÉXICO

Alfonso Vásquez López<sup>1\*</sup>, Bertha Tlapal Bolaños<sup>2</sup>, M. de Jesús Yáñez Morales<sup>3</sup>, Rafael Pérez Pacheco<sup>1</sup> y Manuel Quintos Escalante<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Calle Hornos 1003. 71230, Santa Cruz Xoxocotlán, Oax. Tel. 01 (951) 51 7 06 10 ext. 82736. <sup>2</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Textcoco. 56230, Chapingo, Edo. de México. <sup>3</sup>Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Textcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. <sup>4</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional. Sigma s/n, Fracc. 20 de Noviembre II. 34220, Durango, Dgo.

\* Autor para correspondencia (bremia43@gmail.com)

### RESUMEN

Se determinaron los agentes causales de la marchitez de plantas de ‘Chile de agua’ (*Capsicum annuum* L.) en Cuilapam de Guerrero, San Jerónimo Tlacoahuaya y San Sebastián Abasolo, Oaxaca, México. Se colectaron 120 plantas con síntomas de marchitez y se obtuvieron 95 aislamientos fúngicos pertenecientes a los géneros: *Alternaria*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, y *Stemphylium*, los cuales se aislaron de 15, 19, 6, 38 y 17 muestras, respectivamente. Además se obtuvieron ocho y siete aislamientos de los oomicetes *Phytophthora* y *Pythium*, respectivamente. Los postulados de Koch se cumplieron *in vitro* e invernadero. En plántulas de 5 d de edad *in vitro*, *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum*, *Macrophomina* sp., *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. (binucleada) y *R. solani* causaron estrangulamiento y necrosis del cuello de la raíz (ahogamiento) y muerte de plántulas. En plantas de 45 d de edad inoculadas en invernadero los aislamientos patogénicos fueron *P. capsici* y *R. solani*. *P. capsici* causó marchitez, necrosis de cuello de raíz y tallo sin desprendimiento de epidermis y muerte de planta a 6 d después de la inoculación (ddi). *R. solani* causó marchitez con recuperación temporal de turgencia, necrosis de cuello de raíz y tallo con desprendimiento de epidermis y estrangulamiento de raíces secundarias a 34 ddi.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia* spp, incidencia, intensidad de enfermedad.

### SUMMARY

The causal agents of wilting disease in ‘Chile de agua’ plants (*Capsicum annuum* L.) were determined in Cuilapam de Guerrero, San Jerónimo Tlacoahuaya and San Sebastián Abasolo, Oaxaca, México. One hundred and twenty symptomatic plants were collected in the field from which 95 fungal isolates belonging to the genera: *Alternaria*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, and *Stemphylium*, were obtained from 15, 19, 6, 38 and 17 samples, respectively. Also eight isolates of *Phytophthora* and seven of *Pythium* were obtained.

Koch postulates were completed *in vitro* and under greenhouse conditions. In 5 days old seedlings inoculated *in vitro*, *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum*, *Macrophomina* sp., *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. (binucleate), and *R. solani* caused girdling and neck necrosis of roots (damping off) and death. In 45 days old plants inoculated under greenhouse conditions, the pathogenic isolates were *P. capsici* and *R. solani*. *P. capsici* caused wilting, neck necrosis of roots and stems without peeling of epidermis, and plant death 6 days after inoculation (dai). *R. solani* caused wilting with temporary recovery of turgescence, neck necrosis of roots and stems whit peeling of epidermis and girdling of secondary roots 30 dai.

**Index words:** *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia* spp, incidence, disease intensity.

### INTRODUCCIÓN

En la región “Valles Centrales” del Estado de Oaxaca, México, el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) conocido regionalmente como ‘Chile de agua’, dinamiza la economía local ya que 90 % de la población tiene a esta hortaliza como cultivo primario, porque genera ingresos importantes durante los meses de marzo a agosto; además, durante el proceso de producción se emplean aproximadamente 150 jornales/ha y la relación beneficio-coste del cultivo llega a ser de 3:1 (Velasco *et al.*, 1998).

La producción se destina principalmente a los mercados de la capital oaxaqueña donde se comercializa en fresco como ingrediente importante en la gastronomía regional. En el ciclo agrícola 2002 se sembraron 456 ha con chile de agua en más de 20 localidades de la región, y se

produjeron 2638 t (INEGI, 2001). En la zona productora los problemas fitosanitarios y agronómicos reducen de manera importante la productividad y calidad del chile. En los ciclos agrícolas 2000 y 2001 la enfermedad conocida como marchitez del chile se presentó con una incidencia que fluctuó entre 60 y 70 % y causó pérdidas económicas significativas a los productores. La enfermedad se observó en plantas de 50 a 60 d de edad y se caracterizó por la marchitez de follaje, caída de flores y frutos, necrosis del tejido externo e interno del cuello de la raíz y muerte de plantas.

A nivel mundial se considera que la marchitez del chile es causada principalmente por *Phytophthora capsici* Leo. (Galindo, 1962; Bosland y Votava, 2000), pero también hay otros patógenos involucrados: los hongos *Rhizoctonia solani* (Romero, 1994; Pomar *et al.*, 2001), *Fusarium oxysporum* Schlechtend. (Black *et al.*, 1993), *Verticillium* spp. (Nuez *et al.*, 1996; Agrios, 2001), y la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* comb. nov. (Nuez *et al.*, 1996; Bosland y Votava, 2000). Antes de este estudio, en la región "Valles Centrales" de Oaxaca no se había estudiado con precisión la etiología de esta enfermedad en el cultivo del chile de agua.

En un estudio preliminar realizado por Alfonso Vásquez López en el año 2000 (datos no publicados) se encontró que *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., y *Rhizoctonia* sp., son habitantes naturales de la rizosfera de las plantas de chile de agua en las zonas de estudio, pero no se habían completado los postulados de Koch (Agrios, 2001) para verificar su capacidad patogénica. En este trabajo se postula que *Phytophthora* sp. es el único oomicete que induce marchitez y muerte de estas plantas. El objetivo de este estudio fue determinar la etiología de la marchitez del chile de agua en tres localidades de la región "Valles Centrales" de Oaxaca, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo de campo

En mayo de 2001 y abril de 2002 se colectó un total de 120 plantas de chile de agua con síntomas de marchitez en tres localidades: Cuilapam de Guerrero, San Jerónimo Tlacoahuaya y San Sebastián Abasolo, todas del Estado de Oaxaca. Por localidad y fecha de muestreo se colectaron 20 plantas sintomáticas, donde el patrón de muestreo que se usó fue en "W" (Zadoks y Schein, 1979) en un área de 400 m<sup>2</sup> ubicada en el centro de las parcelas muestreadas.

### Aislamiento y purificación de hongos y estraminipilas

De cada planta recolectada en mayo de 2001 se cortaron 10 puntas de raíz de 1.0 cm de longitud y 10 trozos de tallos de 0.5 cm<sup>3</sup>; en total se obtuvieron 600 puntas de raíz y 600 trozos de tallo. Estos tejidos se lavaron con agua durante 30 min, se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 1 % por 3 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y secaron en toallas de papel estériles. Las 300 puntas de raíz y los 300 trozos de tallos se sembraron en medio de cultivo PDA (200 g de papa + 12 g de dextrosa + 18 g de agar-agar/1.0 L de agua destilada) y se incubaron a 25 °C con luz blanca por 5 d. La misma cantidad de tejido se sembró en medio de cultivo 3P (20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimaricina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L<sup>-1</sup> de ampicilina, en agua destilada) y se incubó a 28 °C en oscuridad. Las colonias de hongos y estraminipilas formadas se transfirieron a PDA y se incubaron a 25 °C con luz blanca por 10 d. Los aislamientos se purificaron mediante cultivos monoconidiales o por punta de hifa. Las colonias se preservaron en tubos con PDA cubiertos con aceite mineral estéril. La misma metodología se siguió para procesar las plantas recolectadas en abril de 2002.

### Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Cada aislamiento obtenido en campo se consideró como un tratamiento, cada uno con 25 repeticiones y la unidad experimental fue una plántula de chile de 5 d de edad. Los aislamientos se cultivaron por 5 d en cajas de Petri con PDA; posteriormente, las colonias se cubrieron con una capa de suelo estéril (70 % de arena y 30 % de suelo agrícola) de 0.5 cm de espesor, y por tratamiento se sembraron 25 plántulas sanas de chile. Las plántulas testigo se sembraron en cajas de Petri con PDA y suelo estéril. Las plántulas sanas se produjeron a partir de semilla desinfectada con hipoclorito de sodio a 1 % por 3 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se incubaron en agua-agar (18 g L<sup>-1</sup> de agar-agar en agua destilada) a 28 °C en oscuridad. Las plántulas inoculadas y testigos se mantuvieron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 6 d. La incidencia (%) de plántulas enfermas por tratamiento se evaluó cada 12 h durante 6 d y se estimó con la ecuación:  $I_i = \frac{\sum(n_i/N_i)}{100}$ ; donde:  $I_i$  = incidencia de plántulas enfermas en el momento  $i$ ;  $n_i$  = número de plántulas enfermas en el momento  $i$ ;  $N_i$  = población total de plántulas inoculadas. La intensidad de enfermedad para cada tratamiento se estimó como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) por el método de integración trapezoidal, mediante la ecuación:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \left\{ \frac{y_{i+1} + y_i}{2} (t_{i+1} - t_i) \right\}$$

donde:  $n$  = número de evaluaciones;  $t_{i+1}$  = tiempo de evaluación (h);  $t_i$  = tiempo de evaluación (h) inmediatamente anterior a  $t_{i+1}$ ;  $y_{i+1}$  = incidencia (%) en  $t_{i+1}$ ;  $y_i$  = incidencia (%) en  $t_i$ . Los datos se estandarizaron mediante la estimación del ABCPE-absoluta (ABCPEa) (Campbell y Madden, 1990). Para el ABCPEa se realizó un análisis de varianza mediante el procedimiento GLM (SAS Institute, 1999) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). De los tejidos infectados se reaislaron los hongos y estraminipilas en cultivo puro; las colonias y sus estructuras reproductivas se compararon morfológicamente con las colonias originalmente inoculadas. Este estudio de laboratorio permitió elegir por localidad de estudio, al menos un aislamiento de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phytophthora* y *Pythium* con los que posteriormente se realizaron las pruebas de patogenicidad en plantas de chile de 45 d de edad en invernadero; en total se eligieron 15 aislamientos y fueron los que causaron mayor incidencia e intensidad de la enfermedad en plántulas de chile.

### Pruebas de patogenicidad en invernadero

En julio de 2002, en plantas de chile de 45 d de edad crecidas en condiciones de invernadero, se verificó la patogenicidad de los 15 aislamientos fúngicos seleccionados en el laboratorio. Cada aislamiento se consideró un tratamiento, cada uno con 10 repeticiones y la unidad experimental fue una planta de chile. Las plantas se sembraron individualmente en macetas con 2.0 kg de suelo pasteurizado.

**a) Preparación de inóculo.** Los inóculos de *Macrophomina*, *Pythium* y *Rhizoctonia* se incrementaron en una mezcla pasteurizada de arena (70 %), suelo agrícola (29 %) y harina de maíz (1 %). Para cada aislamiento se utilizó un frasco de cristal envuelto en papel aluminio con tapa metálica, donde se depositó 1.0 kg de la mezcla pasteurizada y se agregaron 10 discos miceliales de 0.5 cm de diámetro del aislamiento correspondiente; los frascos se incubaron a  $22 \pm 2$  °C en oscuridad, por 30 d. El inóculo de *Fusarium* se preparó al cultivar el hongo en PDA a 25 °C con luz blanca por 5 d. De la colonia se obtuvieron cinco discos miceliales de 1.0 cm de diámetro, los cuales se transfirieron a 500 mL de caldo de papa (100 g de papa y 6 g de dextrosa) y se incubaron en agitación constante a 25 °C por 5 d para incrementar la concentración de conidios. Con un hematocitómetro se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>. El inóculo

de *Phytophthora* se preparó al cultivar el estraminipila en medio de cultivo V8 (300 mL de jugo de verduras V8 Campbell's®, 4 g de CaCO<sub>3</sub> y 18 g de agar-agar) a 28 °C por 5 d, en oscuridad. De la colonia se obtuvieron 10 discos miceliales de 0.5 cm de diámetro los cuales se depositaron en una caja de Petri con agua destilada estéril y dos hojas de chile previamente hervidas por 5 min, y se incubaron a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) con luz blanca por 96 h; este procedimiento permitió la producción de esporangios los cuales se mantuvieron a 4 °C por 10 min para que liberaran las zoosporas. Con un hematocitómetro flameado se ajustó la solución a 2000 zoosporas mL<sup>-1</sup>.

**b) Métodos de inoculación.** Para inocular *Macrophomina*, *Pythium* y *Rhizoctonia* se usó una espátula estéril con la cual se removió la capa superficial de suelo que cubría las raíces secundarias de cada planta experimental y se mezcló con 100 g del inóculo correspondiente, esta mezcla sirvió para cubrir nuevamente las raíces (Johnson y Carl, 1972). *Fusarium* y *Phytophthora* se inocularon mediante el método de inyección conidial y zoospórica, respectivamente, a la rizosfera de las plantas experimentales. En sus tratamientos respectivos, cada planta se inoculó con 10 mL de solución conidial de *Fusarium* con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup> y con 10 mL de solución zoospórica a una concentración de 2000 zoosporas mL<sup>-1</sup> (Johnson y Carl, 1972). El inóculo de *Fusarium* y *Phytophthora* se aplicó a través de dos mangueras de 3.81 cm de diámetro enterradas a una profundidad de 2.0 cm, con inclinación de 45° para verter el inóculo en la zona radicular superior de la planta. La incidencia de la enfermedad (plantas marchitas o con muerte total) por tratamiento se evaluó cada 48 h durante 30 d. La incidencia e intensidad de la enfermedad se estimó con el procedimiento y ecuaciones descritas en la sección de pruebas de patogenicidad *in vitro*. De los tejidos infectados se reaislaron los hongos y estraminipilas en cultivo puro; las colonias y sus estructuras reproductivas se compararon morfológicamente con las colonias originalmente inoculadas.

### Identificación de fitopatógenos

Los hongos se identificaron mediante las claves taxonómicas para género de Barnett y Hunter (1998). Las especies de *Fusarium* se identificaron mediante las claves de Booth (1971) y Burgess *et al.* (1994); para ello se midieron 100 microconidios y 100 macroconidios, se observó tipo de fiálides, y presencia o ausencia de clamidosporas. La especie se corroboró por producción de color en tubos con PDA + pulpa de papa (Nelson *et al.*, 1983) incubados a 25 °C con luz blanca por 10 d. Las especies de *Rhizoctonia* se identificaron según las claves de

Sneh *et al.* (1991) y por la técnica de safranina "O" (Sneh *et al.*, 1991). Los estraminipilas se identificaron con las claves de Ainsworth *et al.* (1973) y Watanabe (2002). La especie de *Phytophthora* se identificó con las claves de Waterhouse (1963) y Erwin y Ribeiro (1996). Los esporangios se produjeron como se describió en la inoculación en invernadero. El tipo de compatibilidad se estudio al aparear en medio de cultivo V8 a aislamientos de *Phytophthora capsici* tipos A1 y A2 con los aislamientos en estudio. La incubación se hizo a 28 °C y oscuridad constante durante 10 d.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Hongos y estraminipilas aislados

De 120 plantas con marchitez se obtuvieron 95 aislamientos fungosos de los géneros: *Alternaria*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, y *Stemphylium*, los cuales se aislaron de 15, 19, 6, 38 y 17 muestras, respectivamente. Además se obtuvieron ocho y siete aislamientos de *Phytophthora* y *Pythium*, respectivamente. En el Cuadro 1 se indica el número de hongos y pseudohongos obtenidos por fecha de muestreo en cada localidad de estudio.

### Pruebas de patogenicidad *in vitro*

En condiciones de laboratorio, 32 aislamientos mostraron capacidad para causar enfermedad en plántulas de chile de agua; tres fueron de *Fusarium*, tres de *Macrophomina*, ocho de *Phytophthora*, siete de *Pythium* y once de *Rhizoctonia*. Las plántulas inoculadas con *Fusarium* y *Macrophomina* mostraron síntomas a las 60 y 120 h después de la inoculación (hdi) respectivamente, y consistieron de canchales en el cuello de raíz con estrangulamiento de 0.5 cm de longitud, y muerte de plántulas. *Phytophthora* causó necrosis y muerte de plántulas a las 36 hdi. *Pythium* y *Rhizoctonia* indujeron lesiones necróticas en cotiledones y tallo, estrangulamiento y necrosis en el cuello de la raíz con lesiones de 0.5 cm de longitud y muerte de plántulas a las 48 y 24 hdi, respectivamente. Las plántulas testigo no presentaron síntomas de la enfermedad.

Diversos autores reportan que el ahogamiento de plántulas puede ser causado por *Fusarium* (Black *et al.*, 1993; Mendoza, 1999), *Macrophomina* (Dhingra y Sinclair, 1978), *Rhizoctonia* (Kapoor y Thakur, 1987; Agrios, 2001), *Phytophthora* (Sarasola y Rocca, 1975; Mendoza, 1999) y *Pythium* (Iida *et al.*, 1983; Crop Protection Compendium, 2001). Los síntomas de *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia* coinciden con los reportados por Mendoza (1999). Los síntomas de

*Fusarium* spp. y *Macrophomina* spp. fueron similares a los reportados por Black *et al.* (1993) y Burgess *et al.* (1994). El análisis de varianza para la variable ABCPEa por localidad de estudio no mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los aislamientos que resultaron patogénicos en condiciones de laboratorio. Iida *et al.* (1983) y Mendoza (1999) mencionaron a *Pythium* como el principal agente causante del ahogamiento de plántulas de chile; sin embargo, en este estudio *Rhizoctonia* mostró mayor agresividad, quizá debido al rápido crecimiento de la colonia en el medio de cultivo (5 cm en 60 h). Esta característica permite inferir sobre la habilidad competitiva de *R. solani* en el suelo de los campos de cultivo donde existen plántulas hospedantes y restos vegetales que permiten su supervivencia y diseminación. La temperatura con que se realizaron los ensayos ( $25 \pm 2$  °C) y humedad del sustrato (capacidad de campo) fueron determinantes en la patogenicidad de *Rhizoctonia*, y estuvieron acordes con las condiciones de campo en los sitios muestreados (25 a 30 °C en los meses de abril y junio). Esta temperatura en el aire posiblemente permite que el suelo oscile entre 15 y 18 °C, y según Agrios (2001) estas temperaturas son óptimas para que el hongo cause infección y tenga mayor capacidad de propagación.

En la región muestreada los almácigos se cubren con restos vegetales, de modo que la humedad no es excesiva pero se mantiene constante. Agrios (2001) menciona que *R. solani* causa infecciones más severas en suelos moderadamente húmedos que en suelos secos o inundados. En este estudio *Macrophomina* no expresó su patogenicidad completamente, posiblemente porque no le favoreció la temperatura y la humedad del sustrato. *Macrophomina* sp. infecta plantas cuyo vigor ha sido reducido por condiciones ambientales desfavorables, como temperaturas de 30 a 35 °C y humedad aprovechable en el suelo menor a 20 % (o un déficit hídrico de -15 a -20 bar en la planta), que favorecen su agresividad (Dhingra y Sinclair, 1978). Sin embargo, no se descarta la capacidad patogénica de este hongo en campo donde se pueden presentar condiciones ambientales favorables. Los aislamientos de *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y *Pythium* por localidad de estudios que causaron mayor incidencia e intensidad de enfermedad en plántulas de chile de agua se indican en el Cuadro 2; con estos aislamientos se realizaron las pruebas de patogenicidad en plantas de chile de 45 d de edad en condiciones de invernadero.

**Cuadro 1. Hongos y pseudohongos aislados de plantas de chile de agua con síntomas de marchitez muestreadas en tres localidades de los “Valles Centrales” del Estado de Oaxaca, México.**

Género	San Jerónimo Tlacochahuaya		San Sebastián Abasolo		Cuilapam de Guerrero		PP <sup>§</sup> (%)
	2001 <sup>†</sup>	2002	2001	2002	2001	2002	
<i>Alternaria</i> spp	4 <sup>††</sup>	2	3	4	2	-	13.5
<i>Fusarium</i> spp	3	3	5	2	4	2	17.3
<i>Macrophomina</i> sp	-	-	-	3	-	3	5.5
<i>Phytophthora</i> sp	1	-	1	3	2	1	7.3
<i>Pythium</i> sp	-	2	-	2	-	3	6.4
<i>Rhizoctonia</i> spp	10	7	7	4	8	2	34.6
<i>Stemphylium</i> sp	-	5	2	5	3	2	15.4
TAFM <sup>¶¶</sup>	18	19	18	23	19	13	

<sup>†</sup> Año del muestreo; <sup>††</sup> Número de aislamientos por género en cada fecha de muestreo; <sup>§</sup> Porcentaje de aislamientos por género de las tres localidades de estudio; <sup>¶¶</sup> Número total de aislamientos por año de muestreo.

**Cuadro 2. Aislamientos patogénicos, por localidad de estudio, que causaron mayor incidencia (%) e intensidad (ABCPEa) de enfermedad (ahogamiento y muerte) en plántulas de chile de agua de 5 d de edad en condiciones de laboratorio.**

Localidad	Aislamiento del hongo	SA <sup>†</sup> (hdi)	PIA <sup>††</sup>	TA <sup>‡</sup> (hdi)	PFA <sup>¶¶</sup>	ABCPEa <sup>§</sup>
Cuilapam de Guerrero	<i>Fusarium</i>	60	30	96	80	0.39 a
	<i>Macrophomina</i>	120	20	144	50	0.25 a
	<i>Phytophthora</i>	60	10	84	100	0.38 a
	<i>Pythium</i>	48	10	72	100	0.54 a
	<i>Rhizoctonia</i>	36	10	60	100	0.35 a
San Jerónimo Tlacochahuaya	<i>Fusarium</i>	60	20	72	100	0.42 a
	<i>Macrophomina</i>	130	15	144	50	0.33 a
	<i>Phytophthora</i>	48	30	72	100	0.53 a
	<i>Pythium</i>	60	10	84	100	0.49 a
	<i>Rhizoctonia</i>	24	40	36	100	0.47 a
San Sebastián Abasolo	<i>Fusarium</i>	72	20	96	80	0.39 a
	<i>Macrophomina</i>	120	10	144	60	0.25 a
	<i>Phytophthora</i>	36	10	60	100	0.34 a
	<i>Pythium</i>	48	10	84	100	0.35 a
	<i>Rhizoctonia</i>	60	30	72	100	0.39 a

<sup>†</sup> Inicio de síntomas de ahogamiento en plántulas (hdi = Horas después de la inoculación); <sup>††</sup> Incidencia (%) de plántulas con ahogamiento en el momento SA; <sup>‡</sup> Evaluación final de incidencia de ahogamiento o muerte total de plántulas (hdi); <sup>¶¶</sup> Incidencia (%) de plántulas con ahogamiento o muerte en el momento TA; <sup>§</sup> Área absoluta bajo la curva del progreso de la enfermedad de plántulas (ahogamiento y muerte). Medias con letras iguales en la columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

### Pruebas de patogenicidad en invernadero

De los 15 aislamientos patogénicos en plántulas de chile de agua inoculados en plantas de 45 d de edad, sólo seis indujeron enfermedad. Tres fueron de *Phytophthora* y tres de *Rhizoctonia*. *Phytophthora* causó síntomas de marchitez del follaje en 20 % de las plantas experimentales a los 6 ddi y se observaron lesiones necróticas de aproximadamente 1.0 cm de longitud en el tejido interno y externo del cuello de la raíz (Figuras 1A, 1B y 1C). En estas plantas algunas hojas se tornaron amarillas y cayeron a los 8 ddi. A los 12 ddi todas las plantas experimentales

presentaban marchitez o muerte, (Figura 1A) con lesiones necróticas en el cuello de la raíz de aproximadamente 3.5 cm de longitud y sin desprendimiento de epidermis (Figura 1B).

*Rhizoctonia* causó síntomas de marchitez en 20 % de las plantas experimentales a los 34 ddi (Figura 2A); también produjo lesiones necróticas en el cuello de la raíz y tallo, de aproximadamente 1.0 cm de longitud (Figuras 2B y 2C). La marchitez fue significativa en el día, pero durante la noche el follaje recuperó la turgencia. A los 44 ddi, 80 % de las plantas experimentales mostraron

marchitez con lesiones necróticas en cuello de raíz de aproximadamente 1.5 cm de longitud y con desprendimiento de epidermis (Figura 2C). También hubo estrangulamiento, pudrición y desprendimiento de epidermis en raíces secundarias cercanas al cuello de la raíz (Figura 2D), pero las plantas permanecieron vivas. Sólo 20 % de las plantas permanecieron asintomáticas. Las plantas testigo no presentaron síntomas de enfermedad. El análisis de varianza para ABCPEa mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos de *Phytophthora* y *Rhizoctonia*; la intensidad de la enfermedad causada por *Phytophthora* fue mayor (ABCPEa = 2.3), debido a que infectó a un número mayor de plantas en poco tiempo (12 ddi) respecto a *Rhizoctonia* que causó enfermedad a los 34 ddi (ABCPEa = 5.0) (Figura 3).

Se ha reportado que *Phytophthora capsici* (Galindo, 1962; Pernezny *et al.*, 2003) y *Rhizoctonia solani* (Romero, 1994; Pomar *et al.*, 2001) pueden causar marchitez en Chile. Los síntomas causados por *Phytophthora* concuerdan con los reportados por Alcazar *et al.* (1993), Ristaino y Johnston (1999) y Pernezny *et al.* (2003). Los síntomas causados por *Rhizoctonia* coinciden con los reportados por Velásquez *et al.* (2001) y Romero (1994). En este estudio, la capacidad patogénica de *Phytophthora* se expresó porque la temperatura prevalente en el suelo donde estuvieron sembradas las plantas de Chile fue de 20 a 22 °C, ya que la temperatura mínima para su desarrollo es de 10 °C y la óptima de 28 °C; además, la humedad del suelo estuvo a capacidad de campo durante esta fase experimental. Estas condiciones fueron favorables para el desarrollo del pseudohongo debido a su naturaleza acuática, ya que ecológicamente el agua libre del suelo y del follaje le favorecen (Erwin y Ribeiro, 1996). Estas condiciones fueron desfavorables para *Rhizoctonia* debido a que este hongo es activo cuando la temperatura del suelo fluctúa entre 15 y 18 °C (Romero, 1994; Tlapal, 2000), y aunque la humedad del suelo estuvo a capacidad de campo y con una temperatura de 20-22 °C, el hongo no pudo expresar su virulencia.

Los resultados de este estudio permitirán inferir sobre estrategias de manejo del cultivo, sobre todo en programación y modo de riego para evitar la diseminación del inóculo, particularmente de *P. capsici* (Ristaino y Johnston, 1999). Estos resultados también resaltan la importancia patogénica de *Rhizoctonia* en las localidades de estudio y que hasta el momento había pasado inadvertida.

### Identificación de fitopatógenos

En plántulas de Chile de 5 d de edad, los aislamientos que causaron enfermedad fueron los hongos: *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum*, *Macrophomina* sp., *Rhizoctonia* sp. (binucleada), *R. solani* y los estraminipilas: *Pythium* sp., y *Phytophthora capsici*. En plantas de 45 d de edad causaron enfermedad *R. solani* y *Phytophthora capsici*.

**a) *Fusarium lateritium*.** La colonia en cajas de Petri y tubos con PDA exhibió color rosa pálido y micelio algodonoso; microconidios ausentes; macroconidios fragmosporas hialinos, de tres a cinco septos, con forma de luna y ápices como ganchos de 26.88-33.6 x 3.36-4.48  $\mu\text{m}$ , desarrollados en polifíalides; clamidosporas intercalares.

**b) *F. oxysporum*.** La colonia en cajas de Petri y tubos con PDA exhibió color blanco con pigmentación violeta y micelio algodonoso. Microconidios amerosporas hialinos, elipsoides de 4.97-8.56 x 2.8-3.2  $\mu\text{m}$ , no en cadenas, formados en macrofíalides en cabezas falsas en fíalides laterales, simples y cortas. Macroconidios fragmosporas hialinos, de tres a cinco septos, con forma de luna, célula apical ligeramente aguda y célula basal en forma de pie de 30.88-39.56 x 3.87-4.08  $\mu\text{m}$ ; clamidosporas intercalares. Las características de estos dos aislamientos coincidieron con las reportadas por Booth (1971), Nelson *et al.* (1983) y Burgess *et al.* (1994).

**c) *Rhizoctonia solani*.** La colonia en PDA fue de color café, micelio fino; conidios ausentes; ramificación hifal a 90° con constricción hifal; células de 62.72-129.92 x 4.48-6.72  $\mu\text{m}$ ; de seis a ocho núcleos por célula (Figuras 2E-2G). Las características de estos dos aislamientos coincidieron con las reportadas por Sneh *et al.* (1991).

**d) *Rhizoctonia binucleada*.** La colonia en PDA fue de color blanco, micelio grueso; conidios ausentes; ramificación hifal a 90° con constricción hifal; células de 49.28-103.04 x 3.36-4.48  $\mu\text{m}$ ; dos núcleos por célula.

**e) *Phytophthora capsici*.** La colonia en PDA exhibió color blanco, micelio algodonoso formando estrellas; hifas cenocíticas y torulosas; esporangios piriformes con una o dos papilas, de 35.42-48.83 x 25.30-33.88  $\mu\text{m}$ ; oosporas café, diámetro de 29.16-33.77  $\mu\text{m}$ , y grosor de pared de 3.64-4.86  $\mu\text{m}$ ; anteridio anfígino. El aislamiento fue heterotálico del tipo A2 (Figuras 1D-1H). Estas características coincidieron con las reportadas por Waterhouse (1963) y Erwin y Ribeiro (1996).

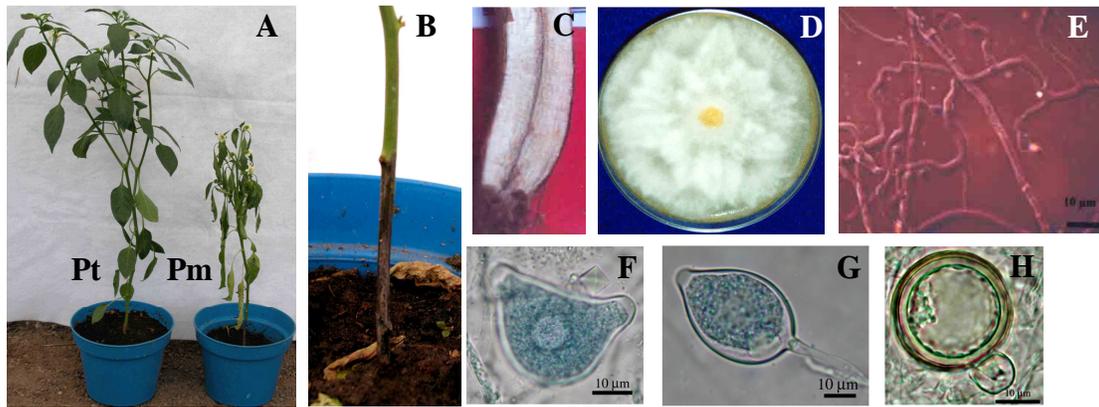


Figura. 1. A-C) Síntomas causados por *Phytophthora capsici* en plantas de chile de agua (*Capsicum annuum*) en invernadero. A) Planta testigo (Pt), planta con síntomas de marchitez a 12 d después de inoculada (Pm); B) Tallo con lesión necrótica sin desprendimiento de epidermis; C) Necrosis del tejido interno del tallo; D) Colonia blanca y algodonosa desarrollada por 8 d en papa-dextrosa-agar; E) Hifas cenocíticas (45X); F y G) Esporangios hialinos con dos y una papila (45X); H) Oospora café y anteridio anfígeno hialino (45X).

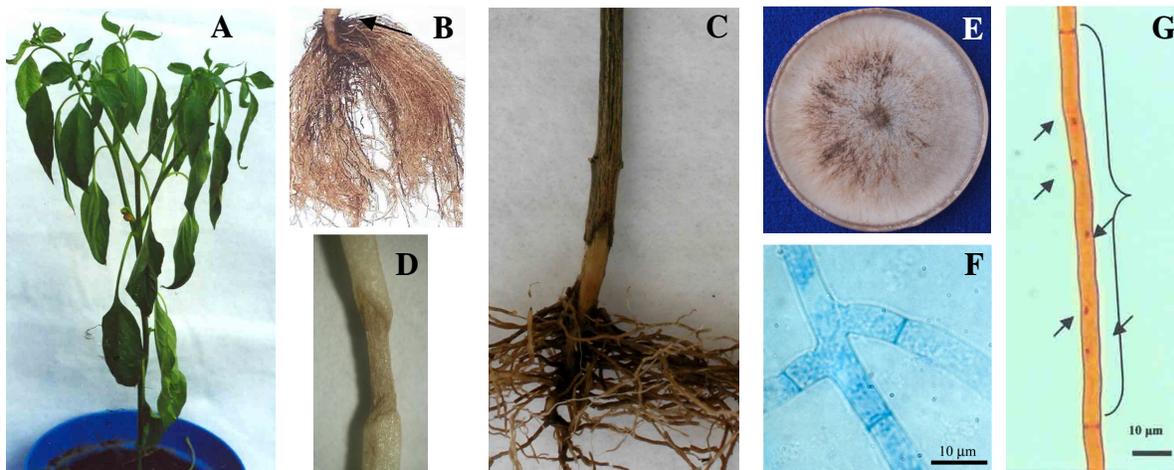


Figura. 2. A-D) Síntomas causados por *Rhizoctonia solani* (multinucleada) en plantas de chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en invernadero; A) Planta con síntomas de marchitez a 34 d después de inoculada; B) Necrosis de raíz; C) Tallo con lesión necrótica con desprendimiento de epidermis; D) Estrangulamiento y necrosis de raíces secundarias; E) Colonia café en papa-dextrosa-agar de 5 d de edad; F) Ramificación hifal (90°); y G) Célula con cinco núcleos (45X).

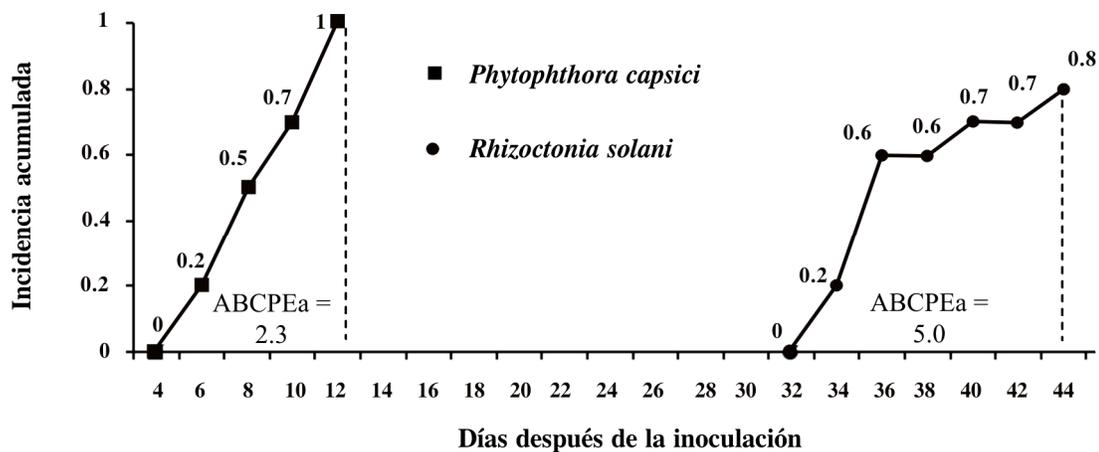


Figura. 3. Incidencia acumulada e intensidad de la marchitez (área bajo la curva del progreso de la enfermedad) de plantas de chile de agua (*Capsicum annuum* L.) de 45 d de edad inoculadas con *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* en condiciones de invernadero.

## CONCLUSIONES

Los hongos y estraminipilas que indujeron ahogamiento y muerte de plántulas de chile de agua en condiciones de laboratorio fueron *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum*, *Macrophomina* sp., *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. (binucleada) y *R. solani*.

*Rhizoctonia* sp. (binucleada) se reporta por primera vez en México como causante de ahogamiento de plántulas de chile.

En este estudio se determinó que *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* son los agentes causales de la marchitez y muerte de las plantas de chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en San Jerónimo Tlacoachahuaya, San Sebastián Abasco y Cuilapam de Guerrero, Oaxaca, México. Otros síntomas causados por estos patógenos fueron lesiones necróticas en el cuello de la raíz, estrangulamiento y necrosis de raíces secundarias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G N (2001) Fitopatología. Ed. Limusa. México, D.F. 759 p.
- Ainsworth C G, F K Sparrow, A S Sussman (1973) The Fungi. An Advanced Treatise. Vol. IVB. A Taxonomic Review with Keys: Basidiomycetes and Lower Fungi. Academic Press. Surrey, UK. 504 p.
- Alcazar M D, C Egea, A Espín, E Candela (1993) Peroxidasa isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 94:736-742.
- Barnett L H, B B Hunter (1998) Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Black L L, K S Green, L G Hartman, M J Poulos (1993) Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Publication No. 91-347. Shanhuia, Taiwan. 98 p.
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Bosland P W, J E Votava (2000) Peppers: Vegetable and Spices Capsicums. Crop Production Science in Horticulture No. 12. CAB International. Las Cruces, New Mexico, USA. 204 p.
- Burgess L W, A B Summerell, S Bullock, K P Gott, D Backhouse (1994) Laboratory Manual for *Fusarium* Research. 3rd ed. Sydney University. Sydney, Australia. 133 p.
- Campbell C L, V L Madden (1990) Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 532 p.
- Crop Protection Compendium (2001) Global module. Software. 3rd ed. CABI. Wallingford, UK.
- Dhingra D O, J B Sinclair (1978) Biology and Pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Mina Gerais- Brasil. 166 p.
- Erwin C D, O K Ribeiro (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 562 p.
- Galindo A J (1962) Marchitez de las plantas de chile causada por *Phytophthora capsici* Leonian. *Rev. Mex. Fitopatol.* 1:15-17.
- Iida W, K Hirano, Y Amemiya, Y Mita (1983) Influence of soil moisture on the incidence of damping-off of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and *Pythium aphanidermatum*. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.* 31:81-86.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática) (2001) Anuario Estadístico del Estado de Oaxaca. Oaxaca, México. 913 p.
- Johnson L F, E A Carl (1972) Methods for Research on the Ecology of Soil Borne Plant Pathogens. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, USA. 247 p.
- Kapoor K S, P C Thakur (1987) Control of seed bed losses of *Capsicum*. *Capsicum Newsletter.* 6:79-80.
- Mendoza Z C (1999) Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. In: Hortalizas: Plagas y Enfermedades. S Anaya R, J Romero N (eds). Ed. Trillas. México, D. F. pp:25-63.
- Nelson E P, T A Toussoun, W F O Marasas (1983) *Fusarium* Species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- Nuez V F, R O Gil, J G Costa (1996) El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 607 p.
- Perezny K, P D Roberts, J F Murphy, N P Goldberg (2003) Compendium of Pepper Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. 63 p.
- Pomar F, M A Bernal, J Collar, J Díaz, C Caramelo, C Gayoso, M Novo, C Prego, A Saavedra, C Silvar, F Merino (2001) A survey of "tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum Eggplant Newsletter.* 20:90-93.
- Ristaino J B, S A Johnston (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Dis.* 83:1080-1089.
- Romero C S (1994) Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 347 p.
- Sarasola A A, A M Rocca (1975) Fitopatología. Curso Moderno, Tomo II Micosis. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 374 p.
- SAS Institute (1999) SAS version 8.0. User's guide: Statistics. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Sneh B, L Burpee, A Ogoshi (1991) Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 358 p.
- Tlapal B B (2000) Características de las enfermedades fungosas en cultivos hortícolas. In: Temas Selectos en Fitosanidad y Producción de Hortalizas. N Bautista M, A D Suárez V, O Morales G (eds). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, México. pp:106-117.
- Velasco V V A, A Trinidad S, J L Tirado T, D Téliz O, A Martínez G, M Cadena H (1998) Efecto de algunos nutrimentos en plantas de chile de agua infectadas con virus. *Terra* 16:317-324.
- Velásquez V R, M M Medina A, J J Luna R (2001) Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19:175-181.
- Watanabe T (2002) Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 485 p.
- Waterhouse G M (1963) Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Papers No. 92. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 22 p.
- Zadoks J C, R D Schein (1979) Epidemiology and Plant Disease Management. Oxford University Press. New York, USA. 427 p.