



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
Y FORESTALES



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS FENOTÍPICO Y GENÓMICO DE AISLADOS
DE *Phytophthora capsici* DEL CENTRO DE MÉXICO, Y SU
INTERACCIÓN CON CULTIVARES DE CHILE (*Capsicum
annuum*)**

TESIS

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Opción: Ciencias Agropecuarias, Forestales y Ambientales

PRESENTA

M. C. ALFREDO REYES TENA

ASESORA

DRA. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVÍA

COASESOR

DR. GERARDO RODRÍGUEZ ALVARADO

Morelia, Michoacán, Febrero 2020

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía y la coasesoría del Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) beca No. 429123 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Agradecimientos

A mis asesores de tesis, la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía y al Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, por darme la oportunidad y la confianza de ser parte de su equipo de trabajo, por sus consejos, sugerencias y experiencias compartidas.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Dr. John Larsen

Dra. Martha Elena Pedraza Santos

Por el aporte de ideas y sugerencias para la realización del presente trabajo, sus consejos y el tiempo dedicado en las evaluaciones tutorales y la revisión de tesis.

Al Dr. Kurt Lamour, por el apoyo incondicional en la secuenciación de genomas, sus opiniones y revisiones en los artículos publicados.

Al personal académico del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Florida:

Dra. Erica M. Goss

Dr. José C. Huguet Tapia

Dra. Fernanda Iruegas Bocado

Gracias por recibirme en la estancia internacional de investigación, por el apoyo técnico y moral que me brindaron en todo momento.

A todos mis compañeros de trabajo con los que tuve la oportunidad de coincidir, por su amistad y compartir momentos de alegría y experiencias de vida.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, por brindarme el espacio y financiamiento para la realización de mi trabajo de tesis.

A mi familia, a mi madre Victoria por ser mi motivación en momentos complicados, a mis hermanos, Gerardo, Salud, Luz María y Rafael por siempre creer en mí y apoyarme moralmente.

A Dios, “el primer trago del vaso de las ciencias naturales te hará ateo, pero en el fondo del vaso Dios te está esperando”. Werner Karl Heisenberg.

Índice

Resumen general	7
General abstract	9
Introducción general	11
<i>Phytophthora</i> , el destructor de plantas	11
<i>Phytophthora capsici</i> , patógeno con un amplio rango de hospedantes	11
Fenotipos de virulencia de <i>Phytophthora capsici</i> en <i>Capsicum annuum</i>	12
Búsqueda de material vegetal resistente a <i>Phytophthora capsici</i>	13
Efectores RXLR y CRN	14
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Capítulo I. Caracterización morfológica de aislados de <i>Phytophthora capsici</i> provenientes del centro de México	18
Resumen	18
Introducción.....	19
Materiales y métodos	20
Muestreo de suelo y tejido vegetal enfermo	21
Detección preliminar de <i>Phytophthora</i> mediante inmuno-tiras	23
Aislamiento de <i>Phytophthora</i> a partir de suelo	23
Aislamiento de <i>Phytophthora</i> a partir de tejido vegetal.....	23
Morfología comparativa de aislados de <i>Phytophthora capsici</i>	24
Resultados	25
Morfología comparativa de aislados de <i>Phytophthora</i>	26
Discusión	31
Agradecimientos.....	33
Literatura citada	33
Capítulo II. Artículo publicado en la revista de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas: Hortscience.....	38
Virulence phenotypes on chili pepper for <i>Phytophthora capsici</i> isolates from Michoacán, Mexico	38
Abstract	40
Introduction	40
Materials and Methods	43

Differential hosts	43
Collection of isolates of <i>Phytophthora capsici</i> and determination of mating type	43
Molecular characterization of <i>Phytophthora capsici</i> isolates	45
Differential host's inoculation.....	46
Disease scoring.....	47
Virulence phenotype determination and data analysis	47
Results and Discussion	48
Literature Cited.....	54
Capítulo III. Tolerancia a fenotipos de virulencia de <i>Phytophthora capsici</i> en cultivares de chile pasilla (<i>Capsicum annuum</i>).....	60
Resumen	60
Introducción.....	61
Materiales y Métodos	63
Aislados de <i>Phytophthora capsici</i>	63
Material vegetal.....	64
Variables registradas	64
Diseño experimental.....	65
Análisis estadístico.....	65
Resultados	65
Discusión	69
Agradecimientos.....	72
Literatura Citada	72
Capítulo IV. Artículo publicado en la revista Molecular Plant-Microbe Interactions	78
Genome sequence data of six isolates of <i>Phytophthora capsici</i> from Mexico	78
Abstract.....	79
Genome Announcement.....	79
Data availability.....	82
Acknowledgments	82
Literature Cited.....	82
Discusión general.....	86
Conclusiones generales	88
Literatura citada complementaria.....	89
Anexos	97
Anexo I. Preparación de medios de cultivo.....	97
Esterilización	97
Medio de cultivo Agar – agua.....	97

Medio de cultivo Agar – Harina de maíz	97
Medio papa dextrosa agar (PDA).	97
Ingredientes para 1 L de medio	97
- 39 g de PDA.	97
Medio papa dextrosa agar (PDA) + ácido tartárico.	97
Ingredientes para 1 L de medio	97
- 39 g de PDA.	98
- 14 mL de ácido tartárico al 10%	98
El PDA y el ácido tartárico se preparan y esterilizan por separado, se mezclan antes de vaciar el medio en las cajas Petri.	98
Medio de cultivo Agar - V8.	98
Medio V8 selectivo (PARNH)	98
Caldo Luria Bertani (LB).	99
Anexo II. Artículo publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología	100
Fusarium wilt caused by <i>Fusarium solani</i> in chili chilaca (<i>Capsicum annuum</i>) in Michoacán	100
Marchitez causada por <i>Fusarium solani</i> en chile chilaca (<i>Capsicum annuum</i>) en Michoacán	100
Resumen	100
Abstract	101
Introducción	101
Materiales y métodos	102
Resultados y discusión	103
Agradecimientos	106
Literatura citada	106
Anexo III. Productos obtenidos durante la formación doctoral	108
Artículos científicos	108
Artículos de divulgación científica	108
Asesoría a productores	108
Congresos y conferencias	109

Cuadros

Capítulo I. Caracterización morfológica de aislados de *Phytophthora capsici* provenientes del centro de México

Cuadro 1. Aislados de <i>Phytophthora</i> obtenidos de solanaceas y cucurbitaceas de Ciudad de México, Jalisco, Michoacán y Morelos.....	26
Cuadro 2. Morfología comparativa de aislados de <i>Phytophthora capsici</i>	28

Capítulo II. Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico

Table 1. Municipality, host and collection date of isolates of <i>Phytophthora capsici</i> from Michoacán.	45
Table 2. Phenotypic response of the 26 NMRILs when tested for resistance against the isolates of <i>Phytophthora capsici</i>	48
Table 3. Virulence phenotype designation based on virulence phenotype of 10 isolates of <i>Phytophthora capsici</i> on NMRILs differential hosts.	50

Capítulo III. Tolerancia a fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici* en cultivares de chile pasilla (*Capsicum annuum*)

Tabla 1. Severidad de la enfermedad causada por cinco fenotipos de virulencia de <i>Phytophthora capsici</i> en tres cultivares de chile pasilla.....	66
Tabla 2. Porcentaje de supervivencia a <i>Phytophthora capsici</i> y número de plantas asintomáticas en cultivares de chile pasilla.....	67

Capítulo IV. Genome sequence data of six isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico

Table 1. General metrics of the genome assemblies of <i>P. capsici</i>	80
---	----

Anexo I. Preparación de medios de cultivo

Cuadro 1. Modo de preparación de los antibióticos y fungicidas para medio selectivo.....	99
---	----

Figuras

Capítulo I. Caracterización morfológica de aislados de *Phytophthora capsici* provenientes del centro de México

Figura 1. Sitios de colecta de solanaceas y cucurbitaceas enfermas por marchitez. 22

Figura 2. Cultivos de solanaceas y cucurbitaceas con síntomas de marchitez del chile en los municipios de: a) Morelia, (Cucurbita pepo); b) Tarímbaro, (chile serrano); c) Queréndaro, (chile chilaca); d) Copándaro, (chile poblano) ubicados en Michoacán; e) La Barca, Jalisco, (chile poblano); y f) Yurécuaro, Michoacán (chile poblano). 22

Figura 3. Estructuras sexuales y asexuales de *Phytophthora capsici*: a) esporangióforo simple simpódico, b) esporangio ovoide papilado, c) esporangio con formas irregulares, d) oosporas pleróticas con anteridio anfígino, e) clamidosporas globosas, terminales, y f) esporangio caduco. Las barras en las imágenes equivalen a 20 μm 27

Capítulo II. Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico

Figure 1. Plants with symptoms caused by *Phytophthora capsici* in the field: a) Wilted pepper plants in a field in Queréndaro, b) Pepper plants with root rot and stem necrosis in Queréndaro, c) Wilted zucchini plant in Morelia. 44

Figure 2. Map of the sites where the *Phytophthora capsici* isolates were collected. 44

Figure 3. Disease symptoms exhibited in NMRILs inoculated with *Phytophthora capsici*. Controls: a) = CPV-279: CW (first three pots) and CM334 (second three pots), b) = CPV-277: CW (first three pots) and CM334 (second three pots), c) = CPV-259: CW (first t three pots) and CM334 (second three pots). Phenotypic response in NMRIL-AA: d) = CPV-279: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AA (second three pots), e) = CPV-277: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AA, f) CPV-259: CW (first three pots) and the resistant NMRIL-AA. Phenotypic response in NMRIL-AC: g) = CPV-279: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AC (second three pots), h) = CPV-277: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AC, i) CPV-272: CW (first three pots) and the resistant NMRIL-AC. 52

Capítulo III. Tolerancia a fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici* en cultivares de chile pasilla de Michoacán, México

Figura_ 1. Efecto de los factores: a) Fenotipo de virulencia, y b) Cultivar de chile pasilla; en el nivel de severidad de la enfermedad. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). 66

Figura_ 2. Interacciones cultivar x fenotipo de virulencia que registraron plantas tolerantes a *Phytophthora capsici*. a) PAS-1 x MX-10, b) PAS-1 x MX-7, c) PAS-1 x MX-1, d) PAS-2 x MX-7, e) PAS-2 x MX-8, f) PAS-3 x MX-7. CW = Control susceptible California Wonder. 68

Anexo II. Fusarium wilt caused by *Fusarium solani* in chili chilaca (*Capsicum annuum*) in Michoacán

Figura 1. A) Planta de chile chilaca (*Capsicum annuum*) de tres meses de edad con síntomas de marchitez y clorosis en campo. B) Raíz y corona mostrando necrosis. C) Derecha: Planta de chile de 45 días edad inoculada con 1.2×10^6 conidios de *Fusarium solani*; izquierda: planta control. D) Macro y microconidios. E) Clamidosporas terminales. F) Relaciones filogenéticas del aislado MXMIC-798 de *Fusarium solani* y especies cercanas; *Fusarium oxysporum* se usó como grupo externo.....105

Resumen general

Phytophthora proviene del latín *phytón* = planta y *phthorá* = destrucción, que significa “destructor de plantas”, debido a que es un género de Oomycetes muy destructivo en plantas de interés económico y representa una de las principales amenazas para la producción agrícola mundial. *Phytophthora capsici* es un patógeno capaz de infectar a un amplio rango de especies vegetales de importancia económica, principalmente dentro de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae, y representa la principal limitante del cultivo de chile (*Capsicum annuum*) a nivel mundial. El manejo de *P. capsici* es complejo, debido a la existencia de fenotipos de virulencia, los cuales tienen la capacidad de infectar a cultivares de la misma especie que poseen diferentes genes de resistencia. Además, este patógeno produce un arsenal de proteínas efectoras que pueden contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta a nivel fisiológico. Por lo tanto, los avances en el conocimiento a nivel poblacional, genómico y fenotípico; así como la búsqueda de material vegetal con resistencia, son claves para el desarrollo de mejores estrategias de manejo de este importante patógeno.

En el presente trabajo, se realizaron muestreos para la obtención y caracterización de aislados de *P. capsici* de diferentes hospedantes en el centro de México, la cual es una región donde el patógeno ha mostrado una elevada variabilidad genética. Posteriormente, se determinó el fenotipo de virulencia en 13 aislados en *C. annuum* mediante el uso de las Líneas Endogámicas Recombinantes de Nuevo México (NMRILs). Cinco de estos fenotipos se evaluaron bajo condiciones de invernadero frente a cuatro cultivares de chile tipo pasilla para la búsqueda de material vegetal local con resistencia específica. Se secuenció el genoma de seis aislados incluyendo tres fenotipos de virulencia; se realizó el ensamble de las secuencias mediante distintos programas bioinformáticos y se obtuvieron secuencias de genes de proteínas efectoras de tipo RXLR, CRN y fitotoxinas

NPP1, los cuales son los principales factores de virulencia de este patógeno. Se obtuvieron un total de 44 aislados de *P. capsici* provenientes de Solanaceas y Cucurbitaceas en nueve municipios de los estados de Ciudad de México, Jalisco, Michoacán y Morelos. Se encontraron aislados con distinto tipo de compatibilidad sexual en la misma parcela en los municipios de Copándaro, La Barca, Queréndaro, Tarímbaro y Yurécuaro. Se encontró un aislado homotálico, y dos con capacidad para formar clamidosporas. Trece de los aislados obtenidos se caracterizaron en 10 fenotipos de virulencia en *C. annuum*; este trabajo representa el primer reporte en México sobre caracterización de fenotipos de virulencia de aislados de *P. capsici*. En las evaluaciones fenotipo de virulencia x cultivar de chile pasilla, tres de los cultivares de chile pasilla mostraron tolerancia a algunos de los fenotipos de virulencia evaluados. Finalmente, se obtuvieron ensamblajes de genomas de buena calidad mediante el programa Platanus-Allee. Se encontraron un total de 2,057 proteínas de efectores RXLR, 1,115 de tipo CRN y 468 proteínas pertenecientes a la familia de toxinas NPP1 en los seis genomas. La información generada en el presente trabajo de tesis podría resultar útil para un mejor conocimiento en México acerca de la distribución de *P. capsici*, caracterización de fenotipos de virulencia, la identificación de nuevos genes y proteínas de factores de virulencia, así como la búsqueda de material vegetal con resistencia a fenotipos locales de *P. capsici*.

Palabras clave: fenotipo de virulencia, resistencia, genomas, factores de virulencia, oomycete.

General abstract

Phytophthora capsici comes from the latin words *phytón* = planta and *phthorá* = destruction, that means “plant destructor”, since is a very destructive Oomycete genus in plants of economic interest and represents one of the main threats for global agricultural production. *Phytophthora capsici* is a pathogen capable of infecting a wide range of vegetable species of economic importance, mainly in the Solanaceae and Cucurbitaceae families, and represents the main problem for the chili pepper crops (*Capsicum annuum*) worldwide. The management of *P. capsici* is complex due to the presence of virulence phenotypes that are capable of infecting cultivars from the same species that possesses different resistance genes. Moreover, it's known that this pathogen produces an arsenal of effector proteins that counteract the plant's defense mechanisms at a physiological level. Therefore, the advances in the knowledge at population, genomic and phenotypic levels; and the search for resistant material, are key for the development of better management strategies of this important pathogen.

In the present work, sampling to obtain and characterize *P. capsici* isolates was performed from different hosts in central Mexico which is a region where the pathogen shows high genetic variability. Afterwards, the virulence phenotype of 13 isolates was determine in *C. annuum*, using the New Mexico Recombinant Inbred Lines (NMRIL's). Five of these phenotypes were tested under greenhouse conditions against four pasilla chili cultivars to search local plant material with specific resistance.

The genomes of six isolates were sequenced, including three virulence phenotypes; the assembly of the sequences was made using different bioinformatics software, and protein effector sequences of RXLR, CRN, and NPP1 phytotoxins were obtained; these proteins are the main virulence factors of the pathogen. A total of 44 isolates of *P. capsici* were

obtained from Solanaceae and Cucurbitaceae in nine municipalities from Ciudad de Mexico, Jalisco, Michoacán and Morelos. Isolates with the same mating type were found in the same field in the municipalities of Copándaro, La Barca, Queréndaro, Tarímbaro and Yurécuaro. A homothallic isolate, and two capable to produce chlamydospores were found. Thirteen of the isolates obtained were characterized into 10 virulence phenotypes for *C. annuum*. This is the first report about characterization of *P. capsici* virulence phenotypes in Mexico. Three pasilla chili cultivars showed tolerance to some of the virulence phenotypes tested. Finally, good quality genome assemblies were generated using the Platanus-Allee software. A total of 2,057 RXLR, 1,115 CRN, and 468 NPP1 family phytotoxin proteins were obtained from the six genomes. The results of this thesis provide a better knowledge about the distribution of *P. capsici*, characterization of virulence phenotypes, identification of new genes from virulence factors proteins, as well as the search of resistant plant material to local phenotypes of *P. capsici*.

Key words: virulence phenotype, resistance, genomes, virulence factors, oomycete.

Introducción general

***Phytophthora*, el destructor de plantas**

El género *Phytophthora* es causante de algunas de las principales enfermedades de especies vegetales a nivel mundial (Erwin y Ribeiro, 1996). La palabra *Phytophthora* proviene del latín *phytón* = planta y *phthorá* = destrucción, que significa “destructor de plantas”. Entre las especies de mayor importancia se encuentran *P. infestans* agente causal del tizón tardío de la papa y el tomate (Akino *et al.*, 2014), *P. ramorum*, causante de la muerte repentina del roble (Fichtner *et al.*, 2007), *P. cinnamomi*, causante de la tristeza del aguacate (Reeksting *et al.*, 2014), *P. sojae*, causante de pudrición de raíces y damping off en soya (Tyler, 2007), *P. cactorum*, causante de pudrición de la raíz y tizón foliar en fresa, *P. palmivora*, causante de la mancha negra del cacao, y *P. capsici*, causante de la marchitez del chile (Lamour *et al.*, 2012). En la actualidad, no existen métodos de control eficaces de las enfermedades causadas por *Phytophthora* una vez que se observan síntomas en las plantas, y generalmente las estrategias de manejo se basan en medidas de prevención (Hwang *et al.*, 2014). Muchas de las especies de este patógeno pueden atacar diferentes partes de la planta, tanto la raíz, el tallo y el fruto (Candole *et al.*, 2010; Sy *et al.*, 2005). Esta característica hace que *Phytophthora* sea uno de los patógenos que causa mayor devastación en los cultivos agrícolas (Erwin y Ribeiro, 1996).

***Phytophthora capsici*, patógeno con un amplio rango de hospedantes**

Phytophthora capsici es un importante fitopatógeno debido a que presenta un amplio rango de hospedantes de interés comercial, principalmente solanaceas (*Capsicum Solanum, Cestrum*), y cucurbitáceas (*Cucurbita, Cucumis, Citrulus*) (Bautista-Calles *et al.*, 2010; Enzenbacher *et al.*, 2015; Granke *et al.*, 2012; Leonian, 1922; Mora-Dañino, 2014; Quesada-Ocampo y Hausbeck, 2010; Tian y Babadoost 2004). Es el agente causal

de la principal enfermedad del cultivo de chile conocida en México como “marchitez” o “secadera”. Esta enfermedad puede provocar pérdidas de hasta el 100% de la producción en campo (Espinosa-Victoria *et al.*, 2004; Granke *et al.*, 2012). La fase asexual de este fitopatógeno es devastadora, ya que se producen esporangios papilados que liberan una gran cantidad de zoosporas capaces de dispersarse a través del agua de riego o salpicaduras del agua de lluvia (Ristaino, 1990). En la fase sexual se producen oosporas, las cuales son resistentes a las condiciones ambientales adversas, lo cual permite su supervivencia entre diferentes estaciones. Además, en esta fase ocurre recombinación genética por medio de la cruce de los gametangios masculino y femenino. Si en un mismo campo de cultivo existen aislados de distinto tipo de compatibilidad sexual (A1 y A2), la recombinación homóloga producto de la cruce entre aislados diferentes puede favorecer el surgimiento de individuos más resistentes a fungicidas químicos y otros factores abióticos (Bi *et al.*, 2014).

Fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum*

Un fenotipo de virulencia es considerado como un aislado que presenta un patrón de virulencia particular en cultivares de la misma especie hospedante (Barchenger *et al.*, 2018b). De tal manera que ciertos fenotipos de virulencia podrían ser virulentos en algunos genotipos de chile y en otros no. Para la caracterización de fenotipos de virulencia es necesario la evaluación de los aislados del patógeno en hospedantes diferenciales que contengan genes de resistencia, y permitan diferenciar cada fenotipo en patrones diferenciales de resistencia/susceptibilidad (Oelke *et al.*, 2003). En el patosistema *C. annuum* - *P. capsici*, el grupo de trabajo del Dr. Bosland y colaboradores de la Universidad Estatal de Nuevo México desarrollaron un grupo de hospedantes diferenciales conocido como “New Mexico Recombinant Inbred Lines” (NMRILs), las cuales se han usado como referencia a nivel mundial para la caracterización de fenotipos

de virulencia de *P. capsici* (Barchenger *et al.*, 2018b; da Costa Ribeiro y Bosland, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Monroy-Barbosa y Bosland, 2010; Monroy-Barbosa y Bosland, 2011; Sy *et al.*, 2008). La presencia de fenotipos de virulencia en el patosistema *C. annuum* - *P. capsici* dificulta el manejo de la enfermedad, debido a que no existen cultivares que sean resistentes a todos los fenotipos de virulencia del patógeno que se encuentran en una zona o región determinada (Reyes-Tena *et al.*, 2019). La búsqueda de material vegetal resistente o tolerante a *P. capsici* depende en gran medida del conocimiento de los fenotipos de virulencia presentes en las zonas donde se evaluará el material. En este sentido, mediante el empleo de las NMRILs se han caracterizado 12 aislados de Nuevo México, 11 aislados de Brasil, y 24 aislados de Taiwán (Barchenger *et al.*, 2018b; da Costa Ribeiro y Bosland, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Sy *et al.*, 2008). Esta información es útil para el conocimiento de los fenotipos de virulencia que existen en regiones productoras de este cultivo; sin embargo, es necesario la caracterización en otras áreas importantes como son las de México, ya que como país posee una alta diversidad genotípica de este patógeno (Castro-Rocha *et al.*, 2016).

Búsqueda de material vegetal resistente a *Phytophthora capsici*

La búsqueda de material vegetal con resistencia a *P. capsici* es una tarea compleja debido a la variabilidad en la virulencia de este patógeno, nuevos fenotipos pueden surgir continuamente y romper la resistencia del hospedante (Barchenger *et al.*, 2018a). Por otro lado, la herencia de la resistencia a este patógeno es poligénica lo que dificulta el desarrollo de variedades con resistencia universal (García-Rodríguez *et al.*, 2010). Se conoce que el criollo de Morelos CM-334 es el único cultivar que presenta resistencia a numerosos aislados de *P. capsici* (Dunn and Smart, 2015). Sin embargo, una de las limitantes de este material para su uso productivo es que los frutos no poseen características agronómicas deseables para su comercialización. Recientemente se han

reportado cultivares de chile huacle y serrano de diferentes regiones de México, con resistencia a diversos aislados virulentos del patógeno, estos genotipos poseen genes dominantes de resistencia (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017; Palma-Martínez *et al.*, 2017). La evaluación de la resistencia a *P. capsici* en material vegetal criollo de uso comercial podría ser una estrategia prometedora para encontrar cultivares que puedan ser utilizados directamente en campo, o bien, en programas de fitomejoramiento de chile. Sin embargo, la búsqueda de resistencia deberá focalizarse en la evaluación frente a los fenotipos de virulencia presentes en las principales regiones de producción, con el objetivo de desarrollar variedades con resistencia específica a nivel local (Foster y Hausbeck, 2010).

Efectores RXLR y CRN

Los efectores son moléculas secretadas por fitopatógenos que se unen a proteínas de defensa de las plantas, suprimen su respuesta modulando su función para facilitar la infección y colonización (Bozkurt *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019; Lo Presti *et al.*, 2015). Estas moléculas son los principales factores de virulencia de microorganismos patógenos y en gran medida se desconoce su mecanismo de acción (Chen *et al.*, 2019). En oomycetes, existen dos grandes grupos de efectores clasificados de acuerdo a la vía de acceso a la planta: apoplásticos y citoplásmicos. Los efectores de tipo apoplástico se caracterizan por secretarse y movilizarse en el espacio extracelular, interactúan con receptores de la pared celular y son principalmente inhibidores de glucanasas, quitinasas y proteasas (Kamoun, 2006; Schornack *et al.*, 2009). Los efectores de tipo citoplásmico son translocados al interior de la célula por medio de estructuras especializadas como el haustorio y vesículas de infección (Kamoun, 2006). Dentro del género *Phytophthora*, los efectores citoplásmicos de tipo RXLR y CRN, se caracterizan por poseer motivos repetitivos conservados de aminoácidos localizados en el dominio N-terminal los cuales son necesarios para su translocación al citoplasma celular, mientras que el dominio C-

terminal posee motivos conservados que se encargan de modular la respuesta de defensa de la planta (Shen *et al.*, 2013). Los efectores de tipo RXLR poseen el motivo: Arginina-cualquier_aminoácido-Leucina-Arginina, este motivo conservado funciona como una señal para su translocación dentro de la célula (Rehmany *et al.*, 2005). Entre sus funciones se encuentra la interacción con proteínas de resistencia intracelulares, lo cual facilita la infección del hospedante y la promoción de la virulencia del patógeno (Morgan y Kamoun, 2007). Por otro lado, los genes de efectores RXLR se encuentran bajo selección positiva, lo cual podría favorecer sus mecanismos de adaptación al hospedante (Win *et al.*, 2007). Los efectores CRN fueron conocidos originalmente como causantes de arrugamiento y necrosis y su nombre se deriva de las palabras en inglés crinkling and necrosis, poseen el motivo conservado Leucina-cualquier_aminoácido-Leucina-Fenilalanina-Leucina-Alanina-Lisina (LXLFLAK) (Amaro *et al.*, 2017). Estos efectores están ampliamente distribuidos en el phylum oomycota y entre sus funciones se encuentra la supresión e inducción de la muerte celular programada y la inhibición de las respuestas de defensa de la planta regulando la expresión de proteínas promotoras (Song *et al.*, 2015). En la actualidad, la disponibilidad de nuevas secuencias de genomas podría facilitar la búsqueda y el descubrimiento de nuevos efectores y mecanismos de acción, lo cual podría representar un avance en el conocimiento sobre las interacciones entre *Phytophthora* y sus hospedantes.

Justificación

El conocimiento de las razas fisiológicas o fenotipos de virulencia de *P. capsici* presentes en zonas productoras de solanáceas y cucurbitáceas del centro de México, así como la evaluación de material vegetal tolerante al patógeno será de utilidad para el manejo de la enfermedad. Por otro lado, la disponibilidad de nuevos datos de secuenciación genómica

y la búsqueda de nuevas secuencias de genes de efectores de tipo RXLR y CRN podría contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas relacionadas con la virulencia del patógeno y sus mecanismos de acción dentro del hospedante.

Hipótesis

Existen distintos fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici* en zonas de producción de solanáceas y cucurbitáceas del centro de México.

Cultivares de chile pasilla de Michoacán son tolerantes a fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici*.

Genomas de *Phytophthora capsici* obtenidos de aislados de distintos hospedantes contienen secuencias de efectores RXLR y CRN.

Objetivo general

Determinar los fenotipos de virulencia, evaluar la resistencia en cultivares de chile pasilla y obtener datos de secuencias de efectores RXLR y CRN de aislados de *P. capsici* del centro de México.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a nivel morfológico aislados de *P. capsici* provenientes de solanáceas y cucurbitáceas del centro de México.
2. Determinar los fenotipos de virulencia en el patosistema *C. annuum* – *P. capsici* de aislados de distintos hospedantes.
3. Evaluar la resistencia de cultivares de chile pasilla a fenotipos de virulencia de *P. capsici*.
4. Ensamblar genomas de aislados de *P. capsici* de distintos hospedantes.

5. Obtener secuencias de efectores RXLR y CRN en genomas de *P. capsici*.

Capítulo I. Caracterización morfológica de aislados de *Phytophthora capsici* provenientes del centro de México

Alfredo Reyes-Tena, Gerardo Rodríguez-Alvarado, John Larsen, Gerardo Vázquez-Marrufo, Martha Elena Pedraza-Santos, Nuria Gómez-Dorantes, Sylvia Patricia Fernández-Pavía*.

Resumen

En México, *Phytophthora capsici* representa el principal problema para la producción de chile (*Capsicum annuum*), debido a que causa la enfermedad más importante de este cultivo conocida como la “marchitez del chile”. Además, es capaz de infectar a otras plantas de interés comercial de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae. La ausencia de información acerca de la presencia de este patógeno en importantes zonas de producción dificulta la prevención y manejo de la enfermedad. Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre la presencia y distribución de *P. capsici* en importantes zonas de producción de chile y otras solanáceas y cucurbitáceas del centro de México, se realizó el aislamiento y la caracterización morfológica de aislados provenientes de cultivos y viveros con marchitez. La morfología comparativa de los aislados se realizó mediante el empleo de una clave interactiva del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, considerando caracteres sexuales y asexuales. Se caracterizaron un total de 44 aislados, los cuales presentaron esporangióforos simples simpódicos con esporangios elipsoides, ovoides y con formas irregulares o distorsionadas; papilados, caducos con pedicelo largo y oosporas pleróticas con anteridio anfígino. La morfología observada concordó con las características descritas para *P. capsici*. Se registraron 23 aislados con el tipo de compatibilidad A1 y 20 con el tipo A2, únicamente se encontró un aislado homotálico. Los aislados CPV-279 y CPV-302 presentaron clamidosporas globosas, terminales. De acuerdo con los resultados obtenidos, *P. capsici* está presente en las zonas de producción muestreadas y afecta la productividad y rentabilidad de los cultivos de chile.

Palabras clave: *Capsicum*, *Cucurbita*, aislamiento, marchitez del chile, diagnóstico.

Introducción

Phytophthora capsici es una de las especies del género *Phytophthora* con mayor importancia fitosanitaria a nivel mundial, debido a que es capaz de infectar a más de 50 especies de plantas cultivables y provocar graves pérdidas económicas (Bautista-Calles *et al.*, 2010). Entre los principales hospedantes de importancia agrícola se encuentran: chile (*Capsicum annuum*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), calabaza (*Cucurbita pepo*), sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Citrullus melo*) y pepino (*Cucumis sativus*), (Tian y Babadoost 2004; Quesada-Ocampo y Hausbeck 2010; Granke *et al.*, 2012). Actualmente se conocen 94 hospedantes de 27 familias botánicas y año con año se registran nuevos hospedantes (Reis *et al.*, 2018). *Phytophthora capsici* es considerado uno de los patógenos de mayor interés científico, debido a su elevada tasa evolutiva, alta diversidad genética, rapidez de dispersión, adaptación hacia nuevos hospedantes y ambientes, y podría representar una amenaza para la seguridad alimentaria a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012; Kamoun *et al.*, 2015).

Por otro lado, México es uno de los principales productores y exportadores de chile a nivel mundial con una producción anual de 3.2 millones de toneladas. De acuerdo con datos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en el año 2016, México fue el principal exportador de chiles y pimientos con un total de 986,500 toneladas. Los estados que lideran la producción de chile son: Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí, Jalisco y Michoacán. La productividad del estado de Michoacán se concentra principalmente en los municipios de Queréndaro, Tanhuato, Yurécuaro y Vista Hermosa.

Sin embargo, los cultivos de chile son afectados por la enfermedad conocida como “marchitez del chile” causada por *P. capsici*, y representa la principal limitante para su producción (García-Rodríguez *et al.*, 2010; Castro-Rocha *et al.*, 2012). En México, se han desarrollado diversos estudios sobre la presencia, diversidad genética y control biológico de éste patógeno (Morán-Bañuelos *et al.*, 2010; Castro-Rocha *et al.*, 2016; Reyes-Tena *et al.*, 2017; Aguilar-Rincón *et al.*, 2017; Palma-Martínez *et al.*, 2017). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han desarrollado con aislados provenientes de zonas de producción de los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Guanajuato y Zacatecas. De tal manera que, en zonas importantes de producción de chile existe falta de información entre los productores sobre la presencia de éste patógeno, lo que frecuentemente ocasiona que se apliquen productos químicos contra otros patógenos menos frecuentes como *Fusarium* sp. o *Rhizoctonia* sp.

De acuerdo con datos del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2016), el valor de producción de chile verde en los estados de Michoacán y Jalisco fue de más de 2,300 millones de pesos mexicanos, con una producción conjunta de 253,689 toneladas. Sin embargo, la presencia de la marchitez del chile en estos estados es frecuente, y se han registrado pérdidas de hasta el 100% en algunos cultivos. En las principales zonas de producción, localizadas en los municipios de Copándaro, Queréndaro, Tarímbaro y Yurécuaro, Michoacán; y La Barca, Jalisco, no existen estudios sobre la presencia o distribución de este patógeno. Por este motivo, el presente estudio tuvo como objetivo obtener e identificar aislados de *Phytophthora* provenientes de dichas zonas de producción

Materiales y métodos

Muestreo de suelo y tejido vegetal enfermo. Durante los años 2016 y 2017 se realizaron muestreos en diferentes zonas productoras de solanaceas y cucurbitaceas de los municipios de Copándaro, Morelia, Queréndaro, Tarímbaro, Vista Hermosa y Yurécuaro, Michoacán; y La Barca, Jalisco (Figura 1). Se realizaron colectas de tejido vegetal enfermo y suelo en cultivos y viveros con plantas enfermas por marchitez, los cuales registraron una incidencia de la enfermedad en el rango de 20 a 80% (Figura 2). En estas zonas cada año se cultiva chile, con excepción de Queréndaro donde se realizan rotaciones de cultivos con gramíneas y el chile es cultivado cada 5 años. Las parcelas muestreadas presentaron suelos francos, con franco-arenosos en Queréndaro, franco-arcillo-arenosos en Copándaro, Morelia y Tarímbaro; y franco-arcillosos en Yurécuaro y La Barca. Además se obtuvieron plantas de chile ornamental (*Capsicum annuum*) con síntomas de marchitez provenientes de viveros de Cuautla, Morelos y Xochimilco, Ciudad de México, las cuales fueron obtenidas por el Dr. Alejandro Soto Plancarte. Finalmente se realizó la colecta de una planta de *C. chinense* con síntomas de marchitez en un vivero de Morelia, Mich.

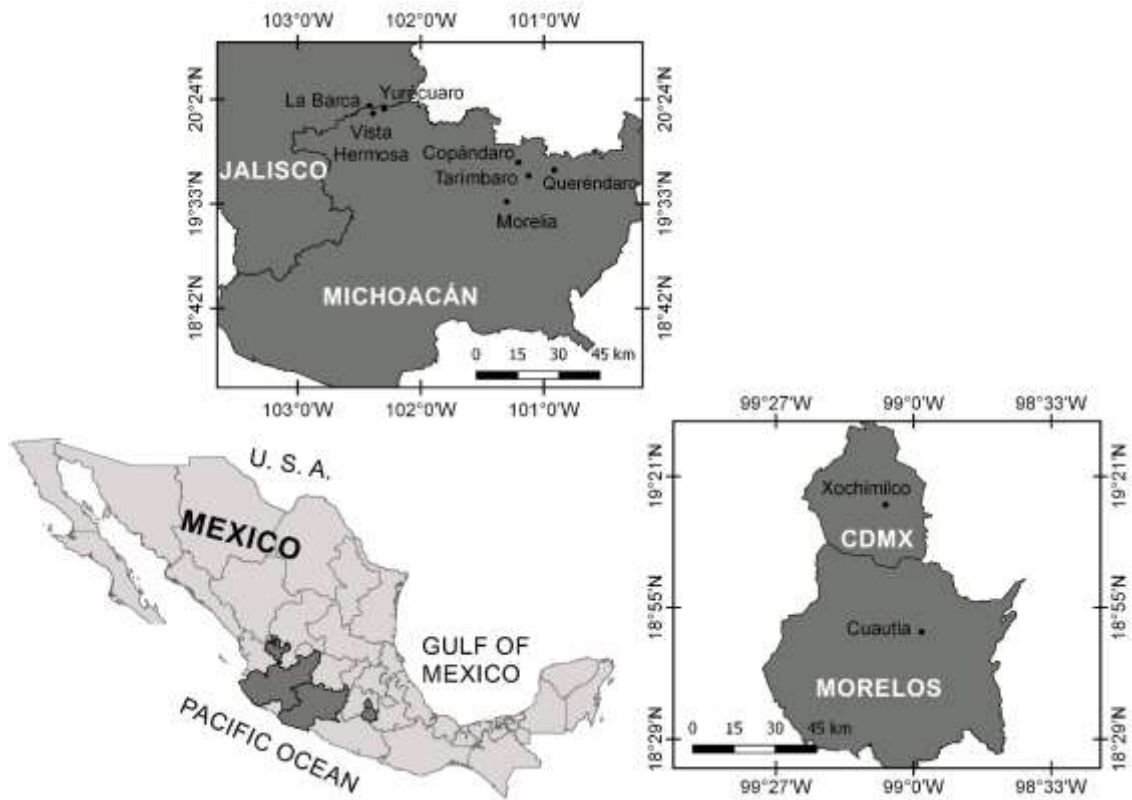


Figura 1. Sitios de colecta de solanaceas y cucurbitaceas enfermas por marchitez.



Figura 2. Cultivos de solanaceas y cucurbitaceas con síntomas de marchitez del chile en los municipios de: a) Morelia, (Cucurbita pepo); b) Tarímbaro, (chile serrano); c) Queréndaro, (chile chilaca); d) Copándaro, (chile poblano) ubicados en Michoacán; e) La Barca, Jalisco, (chile poblano); y f) Yurécuaro, Michoacán (chile poblano).

Detección preliminar de *Phytophthora* mediante inmuno-tiras. Las muestras de tejido vegetal enfermo se sometieron a una prueba serológica para la detección rápida de *Phytophthora* mediante el empleo de inmuno-tiras (ImmunoStrip, Agdia®). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se tomaron aproximadamente 25 g de tejido radicular con necrosis y se colocó en una solución salina, se aplicó una fricción ligera, y se insertó la inmuno-tira. Después de pocos minutos, las muestras positivas registraron dos bandas de coloración morada. Las muestras que resultaron positivas fueron procesadas para realizar el aislamiento del patógeno. Esta prueba es sensible para la detección de varias especies del género *Phytophthora*.

Aislamiento de *Phytophthora* a partir de suelo. Las muestras de suelo colectadas en el municipio de Copándaro se obtuvieron directamente de la rizósfera de plantas de chile poblano y jalapeño con síntomas de marchitez y fueron procesadas para el aislamiento de *Phytophthora*. Se realizó un bioensayo empleando hojas de *Rhododendron* como tejido trampa. El bioensayo consistió en colocar 10 g de suelo y 20 mL de agua destilada estéril en cajas Petri de 16 cm de diámetro. Las hojas de *Rhododendron* se desinfectaron con jabón, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron con el pecíolo sumergido en la suspensión de suelo para facilitar la infección por el patógeno (Erwin y Ribeiro, 1996). Las cajas se sellaron con parafina plástica Parafilm®, y se colocaron a 24°C durante 48-36 h o hasta la observación de necrosis en el pecíolo. Posteriormente, el pecíolo se transfirió a NARPH.

Aislamiento de *Phytophthora* a partir de tejido vegetal. Para favorecer el aislamiento de *Phytophthora*, se cortaron trozos de raíz y tallo en la zona de crecimiento activo del patógeno, es decir, trozos con la interfase entre necrosis y tejido sano. Los trozos de tejido se desinfectaron en una solución de cloro comercial al 10% (0.6% de hipoclorito de sodio de concentración final). Posteriormente, se enjuagaron en agua destilada estéril y se

colocaron en papel secante estéril de acuerdo al procedimiento descrito por Soto-Plancarte *et al.* (2017). Los trozos de tejido se sembraron en NARPH y después de 48 a 72 h se observó el crecimiento de micelio.

Los aislados obtenidos se transfirieron a medio agar-agua para su posterior purificación mediante la técnica de punta de hifa, y se transfirieron a Agar-harina de maíz. Para determinar si los aislados presentaban bacterias contaminantes se colocó un disco de agar con micelio por 24 h a 24°C en un tubo de ensaye con tapa con medio LB completamente estéril, si no se observaba turbidez, el aislado se consideró libre de bacterias. En caso de observar contaminación por bacterias, el cultivo se transfirió a agar-papa-dextrosa con ácido tartárico al 0.14% (Soto-Plancarte *et al.*, 2017). Posteriormente, se tomaron discos de medio con micelio de 5-7 días de edad para su conservación en agua destilada estéril dentro de micro-tubos a 15°C. Los aislados se depositaron en la colección de oomycetes del Laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo con el código CPV (Colección Patología Vegetal).

Morfología comparativa de aislados de *Phytophthora capsici*. Los aislados obtenidos se crecieron en medio Agar-V8 y se almacenaron a 24°C durante 5-7 días. Cuando el crecimiento cubrió las placas de medio de cultivo, se cortaron en trozos de aproximadamente 1x1 cm. Para inducir la formación de esporangios se adicionaron 15 a 18 mL de agua destilada estéril, el agua se cambió cada 24 h durante tres días. A los aislados que formaron pocos esporangios, se les adicionó extracto de suelo no estéril y se dejaron a 24°C durante 24 h. Se realizó la descripción de los caracteres asexuales cuando los aislados esporularon de manera abundante. La prueba de caducidad de los esporangios se realizó de la siguiente manera: se colocó una gota de agua en un portaobjetos, se tomó un trozo de agar con micelio, y se colocó sobre la gota de agua agitándolo ligeramente. Se realizaron observaciones bajo el microscopio óptico a una ampliación de 40X para

registrar la caducidad o persistencia del pedicelo en los esporangios. Se registró el tipo de esporangióforo, forma de los esporangios, longitud de la papila, longitud del pedicelo, y se observó la presencia o ausencia de clamidosporas.

Para determinar el tipo de compatibilidad sexual, todos los aislados se cruzaron con dos aislados de tipo de compatibilidad conocida (A1 y A2) en medio agar-V8. Después de 5-10 días se observó la formación de oosporas en las cruces donde se registró la formación y unión de gametangios. Se registró el tipo de oospora y el tipo de anteridio. Por otro lado, todos los aislados se sometieron a una prueba de crecimiento a 35°C en medio Agar-V8 durante 48 h. Los resultados se compararon con la clave tabular descrita por Abad (2018) y la clave lúcida para *Phytophthora* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA), la cual se encuentra disponible en <http://idtools.org/id/phytophthora/index.php>. Además, se empleó clave tabular diseñada por la Dra. Gloria Abad, la cual está basada en las características morfológicas de las cepas tipo, y se encuentra disponible en: <http://idtools.org/id/phytophthora/Phytophthora%20Tabular%20Key%20IDphy%20MA%20STER%20FINAL%20for%20IDphy%207-25.pdf>.

Resultados

Se obtuvieron un total de 44 aislados de *Phytophthora* en las zonas muestreadas (Cuadro 1). La gran mayoría de los aislados obtenidos fueron provenientes de los municipios de Yurécuaro, Copándaro, Morelia y Queréndaro, Michoacán; se obtuvo un aislado de Cuautla, Morelos y otro de Xochimilco a partir de plantas de chile ornamental. Los hospedantes a partir de los cuales se obtuvieron los aislados fueron distintos cultivares de *C. annuum*, *C. chinense*, *S. lycopersicum* y *C. pepo*. En total se obtuvieron dos aislados a

partir de muestras de suelo de cultivos de chile enfermos por marchitez en el municipio de Copándaro, Michoacán.

Cuadro 1. Aislados de *Phytophthora* obtenidos de solanaceas y cucurbitaceas de Ciudad de México, Jalisco, Michoacán y Morelos.

AISLADO	FUENTE	HOSPEDANTE	TIPO DE CHILE	MUNICIPIO	AÑO DE COLECTA
CPV-258	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Ornamental	Cuautila, Morelos	2016
CPV-259	Suelo	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Copándaro Mich.	2016
CPV-260	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Serrano	Copándaro Mich.	2016
CPV-261	Suelo	<i>Capsicum annuum</i>	Jalapeño	Copándaro Mich.	2016
CPV-262	Tejido	<i>Cucurbita pepo</i>		Morelia, Mich.	2016
CPV-263	Tejido	<i>Cucurbita pepo</i>		Morelia, Mich.	2016
CPV-264	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Copándaro Mich.	2016
CPV-265	Tejido	<i>Cucurbita pepo</i>		Morelia, Mich.	2016
CPV-266	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Jalapeño	Copándaro Mich.	2016
CPV-267	Tejido	<i>Cucurbita pepo</i>		Morelia, Mich.	2016
CPV-268	Tejido	<i>Cucurbita pepo</i>		Morelia, Mich.	2016
CPV-269	Tejido	<i>Cucurbita pepo</i>		Morelia, Mich.	2016
CPV-270	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Serrano	Tarímbaro, Mich.	2016
CPV-271	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Serrano	Tarímbaro, Mich.	2016
CPV-272	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Serrano	Tarímbaro, Mich.	2016
CPV-273	Tejido	<i>Lycopersicum esculentum</i>		Tarímbaro, Mich.	2016
CPV-274	Tejido	<i>Lycopersicum esculentum</i>		Tarímbaro, Mich.	2016
CPV-276	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Ornamental	Ciudad de México	2017
CPV-277	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Chilaca	Queréndaro, Mich.	2017
CPV-278	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Chilaca	Queréndaro, Mich.	2017
CPV-279	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Chilaca	Queréndaro, Mich.	2017
CPV-280	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Chilaca	Queréndaro, Mich.	2017
CPV-281	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Chilaca	Queréndaro, Mich.	2017
CPV-282	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Copándaro Mich.	2017
CPV-283	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-284	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-285	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-286	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	La Barca, Jal.	2017
CPV-287	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Güero	Copándaro Mich.	2017
CPV-288	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Güero	Copándaro Mich.	2017
CPV-289	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-290	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	La Barca, Jal.	2017
CPV-291	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-292	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	La Barca, Jal.	2017
CPV-293	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-294	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Copándaro Mich.	2017
CPV-295	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-296	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Copándaro Mich.	2017
CPV-297	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Vista Hermosa, Mich.	2017
CPV-298	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-299	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-300	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-301	Tejido	<i>Capsicum annuum</i>	Poblano	Yurécuaro, Mich.	2017
CPV-302	Tejido	<i>Capsicum chinense</i>	Habanero	Morelia, Mich.	2017

CPV = Código de la colección de oomycetes del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF-UMSNH

Morfología comparativa de aislados de *Phytophthora*. En el Cuadro 2 se presenta la descripción detallada de los diferentes caracteres sexuales y asexuales evaluados. Todos los aislados mostraron esporangios dispuestos en esporangióforos simples simpódicos, 43 aislados presentaron esporangios caducos, papilados y con pedicelo largo, sólo el aislado CPV-269 mostró esporangios semipapilados con pedicelo mediano. Con respecto

a la forma de los esporangios, 10 de los aislados mostraron formas irregulares o distorsionadas (Figura 3c); de manera general predominaron las formas elipsoide, ovoide y globosa. Se registró la presencia de clamidosporas globosas y terminales (Figura 3e) en los aislados CPV-279 y CPV-302 obtenidos de *C. chinense*. La mayoría de los aislados registraron crecimiento a 35°C, con excepción de los aislados CPV-280, CPV-285, CPV-294, CPV-295 y CPV-296. En los caracteres sexuales, todos los aislados presentaron oosporas pleróticas con anteridio anfígino (Figura 3d). Por otro lado, 43 aislados fueron heterotálicos y un aislado homotálico, de los cuales 23 aislados fueron de tipo de compatibilidad A1 y 20 registraron el tipo A2. Se encontraron ambos tipos de compatibilidad sexual en parcelas de cultivos de chile de los municipios de Copándaro, Tarímbaro, Queréndaro, Yurécuaro, Michoacán y La Barca, Jalisco.

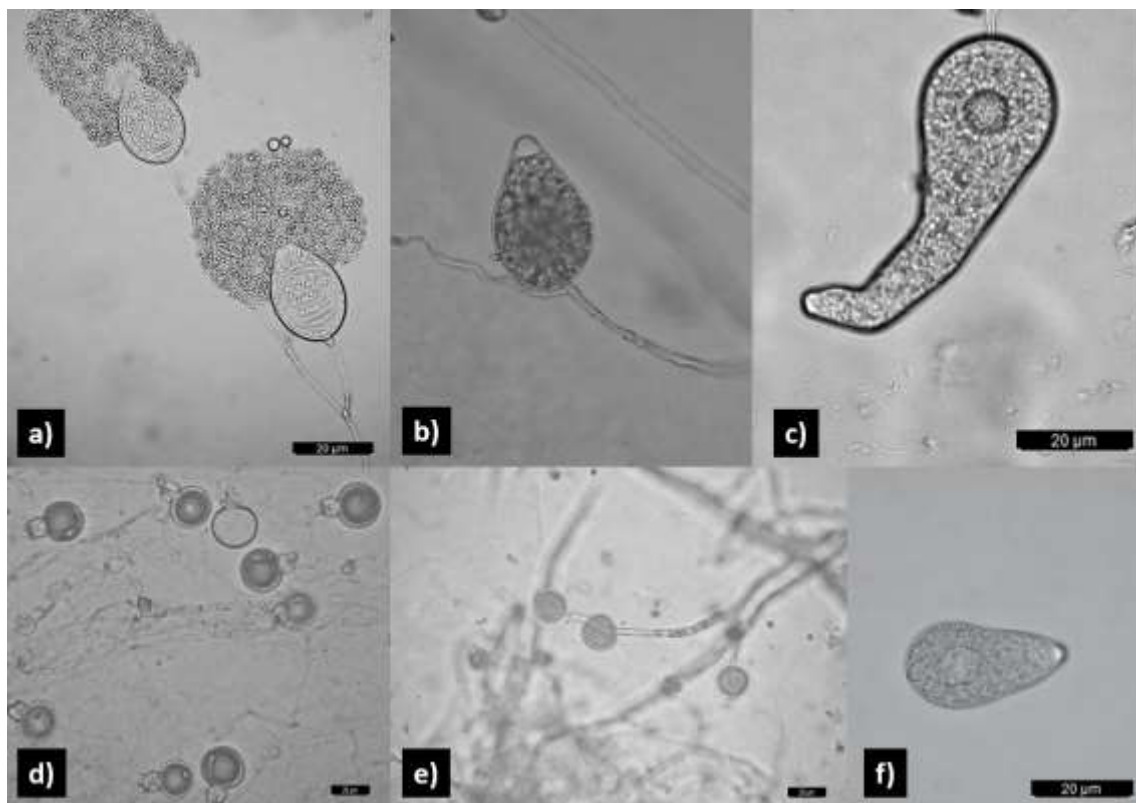


Figura 3. Estructuras sexuales y asexuales de *Phytophthora capsici*: a) esporangióforo simple simpódico, b) esporangio ovoide papilado, c) esporangio con formas irregulares, d) oosporas pleróticas con anteridio anfígino, e) clamidosporas globosas, terminales, y f) esporangio caduco. Las barras en las imágenes equivalen a 20 µm

Cuadro 2. Morfología comparativa de aislados de *Phytophthora capsici*.

AISLADO	ESPORANGÍOFORO	ESPORANGIOS	PRESENCIA DE CLAMIDOSPORAS	PAPILA	PEDICELO	OOSPORA	ANTERIDIO	COMPATIBILIDAD SEXUAL	CREC. A 35 °C
CPV-258	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.6 μ m).	Largo (\bar{x} 49.5 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A1	+
CPV-259	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, formas irregulares. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.8 μ m).	Largo (\bar{x} 45.6 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A1	+
CPV-260	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.2 μ m).	Largo (\bar{x} 38.7 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-261	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.9 μ m).	Largo (\bar{x} 40.6 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A1	+
CPV-262	Simple simpódico.	Formas irregulares, globosos, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.9 μ m).	Largo (\bar{x} 43.2 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-263	Simple simpódico.	Globosos, formas irregulares, elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.1 μ m).	Largo (\bar{x} 37.1 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-264	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.2 μ m).	Largo (\bar{x} 38.9 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A1	+
CPV-265	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.8 μ m).	Largo (\bar{x} 42.3 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-266	Simple simpódico.	Globosos y ovoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.0 μ m).	Largo (\bar{x} 32.4 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A1	+
CPV-267	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.2 μ m).	Largo (\bar{x} 36.2 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-268	Simple simpódico.	Elipsoides y globosos. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.0 μ m).	Largo (\bar{x} 46.2 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-269	Simple simpódico.	Elipsoides y globosos. Caducos.	-	Esporangios semipapilados (\bar{x} 3.2 μ m).	Mediano (\bar{x} 18.6 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-270	Simple simpódico.	Elipsoides, ovoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.2 μ m).	Largo (\bar{x} 38.6 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+
CPV-271	Simple simpódico.	Ovoides, globosos, formas irregulares, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados ($<\bar{x}$ 4.3 μ m).	Largo (\bar{x} 43.8 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A1	+
CPV-272	Simple simpódico.	Ovoides, elipsoides, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados ($<\bar{x}$ 4.2 μ m).	Largo (\bar{x} 45.6 μ m).	Plerótica	Anfíginio	A2	+

CPV-273	Simple simpódico.	Elipsoides, ovoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.38 μ m).	Largo (\bar{x} 51.9 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-274	Simple simpódico.	Ovoides, elipsoides, bipapilados, formas irregulares. Caducos	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.85 μ m).	Largo (\bar{x} 45.7 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-275	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, limoniformes. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.5 μ m).	Largo (\bar{x} 41.9 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-276	Simple simpódico.	Ovoides, globosos. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.75 μ m).	Largo (\bar{x} 51.3 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-277	Simple simpódico.	Ovoides, formas irregulares, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.9 μ m).	Largo (\bar{x} 62.0 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-278	Simple simpódico.	Ovoides, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m).	Largo (\bar{x} 47.5 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-279	Simple simpódico.	Elipsoides y ovoides. Caducos.	+	Esporangios papilados (\bar{x} 4.1 μ m).	Largo (\bar{x} 56.4 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-280	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.8 μ m).	Largo (\bar{x} 36.8 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	-
CPV-281	Simple simpódico.	Globosos, obpiriformes, ovoides. Caducos.	-	Esporangios semipapilados (\bar{x} 2.83 μ m).	Largo (\bar{x} 57.5 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-282	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.1 μ m).	Largo (\bar{x} 65.0 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-283	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.6 μ m).	Largo (\bar{x} 38.8 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-284	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.7 μ m).	Largo (\bar{x} 42.8 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-285	Simple simpódico.	Elipsoides, ovoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.9 μ m).	Largo (\bar{x} 53.3 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A2	-
CPV-286	Simple simpódico.	Elipsoides, ovoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.1 μ m).	Largo (\bar{x} 30.7 μ m).	Plerótica	Anfíginos	Homotálico	+
CPV-287	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m).	Largo (\bar{x} 65.0 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-288	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.7 μ m).	Largo (\bar{x} 58.5 μ m).	Plerótica	Anfíginos	A1	+

CPV-289	Simple simpódico.	Elipsoides y globosos. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m)	Largo (\bar{x} 74.8 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-290	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, formas irregulares. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.4 μ m)	Largo (\bar{x} 34.5 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-291	Simple simpódico.	Ovoides, elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m)	Largo (\bar{x} 52.3 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-292	Simple simpódico.	Ovoides, elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.2 μ m)	Largo (\bar{x} 62.7 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-293	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.8 μ m)	Largo (\bar{x} 41.4 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-294	Simple simpódico.	Globosos, elipsoides, formas irregulares. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m)	Largo (\bar{x} 41.5 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A2	-
CPV-295	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m)	Largo (\bar{x} 29.8 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	-
CPV-296	Simple simpódico.	Elipsoides, globosos, formas irregulares. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.7 μ m)	Largo (\bar{x} 37.3 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	-
CPV-297	Simple simpódico.	Elipsoides, formas irregulares. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.9 μ m)	Largo (\bar{x} 48.4 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-298	Simple simpódico.	Globosos, ovoides, elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.9 μ m)	Largo (\bar{x} 43.2 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-299	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.3 μ m)	Largo (\bar{x} 31.3 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A1	+
CPV-300	Simple simpódico.	Ovoides, elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 4.2 μ m)	Largo (\bar{x} 41.1 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-301	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	-	Esporangios papilados (\bar{x} 3.9 μ m)	Largo (\bar{x} 33.5 μ m)	Plerótica	Anfíginos	A2	+
CPV-302	Simple simpódico.	Elipsoides. Caducos.	+	Esporangios papilados (\bar{x} 4.5 μ m)	Largo (\bar{x} 33.8 μ m)	Aplerótica	Anfíginos	A2	+

Discusión

Los esporangios que produce *P. capsici* pueden presentar formas variadas desde ovoides, ovo-ovoides, sub-globosos, globosos, elipsoides, fusiformes, piriformes y con formas irregulares; además, es frecuente la presencia de esporangios bipapilados (Li *et al.*, 2007; Soto-Plancarte *et al.*, 2017). Por otro lado, el aislado CPV-269 presentó esporangios semipapilados ($\bar{x} = 3.2 \mu\text{m}$) con pedicelo mediano ($\bar{x} = 18.6 \mu\text{m}$). De acuerdo con reportes previos y la clave tabular para la especie tipo, ésta característica coincide con la descripción para *P. capsici* debido a que puede presentar pedicelos cortos, medianos y largos en un rango de 3-138 μm (Granke *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012). Esporangios semipapilados han sido reportados previamente en aislados de *P. capsici* (French-Monar *et al.*, 2006).

La presencia de clamidosporas es una característica poco común en *P. capsici*. De acuerdo con las claves tabulares, esta especie no forma este tipo de estructuras e incluso es una característica que le distingue de otras especies morfológicamente y filogenéticamente relacionadas como *P. tropicalis*, la cual forma abundantes clamidosporas y ataca principalmente a especies perennes leñosas (Aragaki y Uchida, 2001; Bowers *et al.*, 2007; Donahoo y Lamour, 2008; Martin *et al.*, 2012). Sin embargo, en la literatura existen varios reportes de aislados de *P. capsici* que forman estas estructuras (Granke *et al.*, 2011). En nuestro estudio, los aislados CPV-279 y CPV-302 obtenidos de *C. annuum* y *C. chinense* respectivamente, presentaron clamidosporas apicales globosas. Resultados similares encontraron Islam *et al.* (2004) al reportar que 37.5% de los aislados de *P. capsici* obtenidos de campos de cultivo de *Cucurbita moschata* en Illinois formaron clamidosporas terminales. Por otra parte, Granke *et al.* (2011) encontraron que al crecer 25 aislados de *P. capsici* en medio líquido formaron clamidosporas. En aislados de *P.*

capsici de Malasia obtenidos de *Piper nigrum* y *Theobroma cacao*, se reportó la presencia de clamidosporas, incluso los autores lo consideraron una característica típica de esta especie (Farhana *et al.*, 2013). La alta variabilidad fenotípica que presenta este patógeno podría estar en función del lugar y el hospedante de donde fueron obtenidos, esto explicaría la presencia de clamidosporas en algunos aislados. Sin embargo, es necesario realizar más estudios enfocados a identificar los genes relacionados con la formación de estas estructuras. Por otro lado, cinco de los aislados no registraron crecimiento a 35°C después de 48 h. Esta característica puede presentarse en algunos aislados de *P. capsici*. De acuerdo con la clave tabular basada en las especies tipo, la temperatura máxima de crecimiento de este patógeno es de 33°C. Mchau y Coffey (1995) encontraron algunos aislados de *P. capsici* que crecieron pobremente a 35°C, y sugieren que no es un carácter confiable para separar especies de *Phytophthora*. Aislados de *P. capsici* que no crecen a 35°C también fueron reportados por Granke *et al.* (2011).

Las oosporas pleróticas con anteridio anfígino encontradas en el presente estudio son una característica típica de *P. capsici*. En nuestro estudio se encontró un solo aislado homotático. *Phytophthora capsici* es considerada una especie heterotática; sin embargo, aislados homotáticos han sido previamente reportados en ésta especie (Islam *et al.*, 2004). Por este motivo, el heterotalismo no necesariamente es una característica típica de *P. capsici*. Se encontraron ambos tipos de compatibilidad sexual en parcelas de los municipios de Copándaro, Queréndaro, Tarímbaro, Yurécuaro, Michoacán y La Barca, Jalisco. Lo anterior sugiere que la reproducción sexual está ocurriendo y esto podría favorecer la supervivencia y el surgimiento de una mayor variabilidad dentro de las poblaciones, dificultando el éxito de los programas de manejo (Lamour y Hausbeck, 2000). Por otro lado, en algunas de estas parcelas cada año se cultiva chile y otros hospedantes susceptibles como calabaza y jitomate, lo cual podría favorecer la

supervivencia de ambos tipos de compatibilidad sexual en los residuos de cosecha. En este sentido, la rotación de cultivos durante periodos de 3 a 5 años con especies no hospedantes podría ser una alternativa para reducir los niveles de inóculo del patógeno.

Los resultados del presente estudio proveen información acerca de la presencia y distribución de *P. capsici* en zonas de producción de solanaceas y cucurbitaceas en los estados de Michoacán y Jalisco principalmente. Debido a que no existen estudios previos en estas zonas de producción, la información de este trabajo podría ser útil para los productores locales, debido a que la gran mayoría desconocen cuál es agente causal de la marchitez en sus cultivos de chile y las estrategias de prevención y manejo que podrían implementar. Los estudios posteriores deberán estar enfocados en aspectos puntuales sobre su diversidad a nivel genético, genómico, y la descripción de los fenotipos de virulencia que podrían estar presentes en las poblaciones de este patógeno. En conjunto, este conocimiento podría ayudar a establecer programas más eficientes para el control de la marchitez, principalmente en los cultivos de chile.

Agradecimientos

Alfredo Reyes Tena agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para estudios de doctorado No. 429123. Agradecemos a Alejandro Soto Plancarte por asistencia técnica en la identificación de los aislados, y a Daniela Pineda Vaca por asistencia técnica en la edición de figuras.

Literatura citada

Abad Z. G. 2018. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. http://idtools.org/id/phytophthora/tabular_key.php

- Abad Z. G. y M. Coffey. 2008. Lucid key for the identification of Oomycetes: *Phytophthora*. 3rd. International *Phytophthora*, *Pythium* and related genera workshop: Integration of traditional and modern approaches for investigating the taxonomy and evolution of the Oomycetes, Turín Italy.
- Aragaki M., and J. Y. Uchida. 2001. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia* 93: 137-145.
- Bautista-Calles J., R. García-Espinosa, E. Zavaleta-Mejía, J. Pérez-Moreno, R. Montes-Belmont, R. Ferrera-Cerrato y M. Huerta-Lara. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annum* L.). *Interciencia* 35: 613-618.
- Bernhardt E. A., and R. G. Grogan. 1982. Effect of soil matric potential on the formation and indirect germination of sporangia of *Phytophthora parasitica*, *P. capsici*, and *P. cryptogea*. *Phytopathology* 72: 507-511.
- Bowers J. H., F. N. Martin, P. W. Tooley and E. D. M. N. Luz. 2007. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 97: 492-503.
- Castro-Rocha A., S. P. Fernández-Pavía, and P. Osuna-Ávila. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30: 49-65.
- Castro-Rocha A., S. Shrestha, B. Lyon, G. L. Grimaldo-Pantoja, J. P. Flores-Marges, J. Valero-Galván, M. Aguirre-Ramírez, P. Osuna-Ávila, N. Gómez-Dorantes, G. Ávila-Quezada, J. J. Luna-Ruiz, G. Rodríguez-Alvarado, S. P. Fernández-Pavía y

- K. Lamour. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycological Progress* 15:15.doi: 10.1007/s11557-016-1157-0.
- Donahoo R. S., and K. H. Lamour. 2008. Interspecific hybridization and apomixes between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycologia* 100: 911-920.
- Erwin D. C. and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 562 p.
- Farhana M. D. S. N., M. R. Bivi, A. Khairulmazmi, S. K. Wong, and M. Sariah. 2013. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora capsici*, the causal agent of foot rot disease of black pepper in Sarawak, Malaysia. *International Journal of Agriculture and Biology* 15: 1083-1090.
- French-Monar R. D., J. B. Jones, and P. D. Roberts. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Disease* 90: 345-350.
- García-Rodríguez M. R., E. Chiquito-Almanza, P. D. Loeza-Lara, H. Godoy-Hernández, E. Villordo-Pineda, J. L. Pons-Hernández,... J. L. Anaya-López. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44:701-709.
- Granke L. L., L. M. Quesada-Ocampo, and M. K. Hausbeck. 2011. Variation in phenotypic characteristics of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection. *Plant Disease* 95: 1080-1088.

- Granke L. L., L. Quesada-Ocampo, K. Lamour and M. K. Hausbeck. 2012. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease* 95: 1588-1600.
- Islam S. Z., M. Babadoost, N. K. Lambert, A. Ndeme, and H. M. Fouly. 2004. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. *Plant Disease* 89: 191-197.
- Lamour K. H., and M. K. Hausbeck. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90: 396-400.
- Li Z., W. Long, J. Zheng, and J. Lei. 2007. Isolation and identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong Province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation. *Frontiers of Agriculture in China* 1: 377-381.
- Mchau G. R. A., and M. D. Coffey. 1995. Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species. *Mycological Research* 99: 89-102.
- Quesada-Ocampo L. M., and M. K. Hausbeck. 2010. Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 100: 619-627
- Reis A., M. L. Paz-Lima, A. W. Moita, F. M. Aguiar, M. E. N. Fonseca, A. C. Café-Filho, and L. S. Boiteux. 2018. A reappraisal of the natural and experimental host range of neotropical *Phytophthora capsici* isolates from *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae* and *Fabaceae*. *Journal of Plant Pathology* 100: 215-223.
- Reyes-Tena A., G. Rincón-Enríquez, L. López-Pérez, and E. E. Quiñones-Aguilar. 2017. Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of

Capsicum annuum L. against *Phytophthora capsici*. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 54: 513-522.

Soto-Plancarte A., G. Rodríguez-Alvarado, Y. L. Fernández-Pavía, M. E. Pedraza-Santos, L. López-Pérez, M. Díaz-Celaya, y S. P. Fernández-Pavía. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8: 1867-1880.

Tian D. and M. Babadoost. 2004. Host range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of isolates. Plant Disease 88: 485-489.

Capítulo II. Artículo publicado en la revista de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas: Hortscience
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13964-19>

Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico

Alfredo Reyes-Tena¹, Arturo Castro-Rocha², Gerardo Rodríguez-Alvarado¹, Gerardo Vázquez-Marrufo³, Martha Elena Pedraza-Santos⁴, Kurt Lamour⁵, John Larsen⁶, Sylvia Patricia Fernández-Pavía^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, 58880 Tarímbaro, Michoacán, Mexico.

²Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, 64849 Nuevo León, Mexico.

³Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, 58880 Tarímbaro, Michoacán, Mexico.

⁴Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Gral. Lázaro Cárdenas y Berlín s/n, Viveros, 60170 Uruapan, Michoacán, Mexico.

⁵Department of Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, Knoxville, TN, 37996, USA.

⁶Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta, 58190 Morelia, Michoacán, Mexico.

*Corresponding author: fpavia@umich.mx

This paper is a portion of a thesis presented by Alfredo Reyes-Tena, for the fulfillment of a degree requirement

The first author thanks the National Council for Science and Technology of Mexico (CONACYT) for his doctoral studies scholarship. The authors thank Paul W. Bosland of New Mexico State University for donating the NMRIL seeds set; José de Jesús Luna Ruiz of the Universidad Autónoma de Aguascalientes for donating the Criollo de Morelos CM334 seeds; Daniela Pineda-Vaca and Erica Goss for skilled technical assistance.

Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico

Additional index words: *Capsicum annuum*, Oomycetes, differential hosts, root rot, pepper wilt.

Abstract

Phytophthora blight of vegetables caused by *Phytophthora capsici* causes significant economic losses in production of Solanaceae and Cucurbitaceae crops in Mexico. The development of universal resistant chili pepper cultivars is challenging due to the diverse virulence phenotypes produced by *P. capsici*. The objective of the study was to characterize the diversity of phenotypic interactions for *P. capsici* isolates recovered from production fields in Michoacán, Mexico, to facilitate the development of resistant cultivars. Virulence phenotypes were characterized for 12 isolates of *P. capsici* using 26 *Capsicum annuum* New Mexico Recombinant Inbred Lines (NMRILs) in greenhouse conditions. Criollo de Morelos CM-334 and California Wonder were used as resistant and susceptible controls, respectively. Seedlings at the 4 to 8 true leaf stage were inoculated with 10,000 zoospores per seedling and disease severity was evaluated at 20 days post-inoculation. Two of the *P. capsici* isolates did not infect any pepper host even though the isolate was less than a year old. The 10 virulent isolates were designated in 10 virulence phenotypes. The information generated by this study is of utmost importance for efforts of producing resistant cultivars specific for Michoacán producers.

Introduction

The oomycete *Phytophthora capsici* is highly destructive to vegetable species in the Solanaceae, Cucurbitaceae and Fabaceae families (Kamoun et al. 2015). Worldwide,

it is the main pathogen limiting chili pepper (*Capsicum annuum*) production and can infect the roots, crown, stem and fruits (Barchenger et al. 2018a; García-Rodríguez et al. 2010; Glosier et al. 2008; Lamour and Hausbeck 2002). In Mexico, *P. capsici* primarily attacks the roots and foliar blight is rare in production fields (Macías-Valdez et al. 2010). *P. capsici* has an asexual phase characterized by the rapid production of deciduous sporangia on infected tissues, which can quickly release swimming zoospores under wet conditions. The sexual phase requires the interaction of two mating types (A1 and A2) and outcrossing can greatly increase the genetic diversity of field populations and may increase the overall evolutionary potential and the ability to adapt to control measures (Lamour et al. 2012). Recently, variable ploidy has been reported in this pathogen and could impact its ability to adapt to different environments (Barchenger et al. 2017).

In Mexico, the presence of *P. capsici* has been reported in multiple vegetable production zones and is considered the main cause of chili pepper root rot (Silva-Rojas et al. 2009). The use of chemical fungicides has been a costly and ineffective strategy to control this pathogen and may be harmful to the environment (García-Rodríguez et al. 2010). Among the alternatives to control *P. capsici*, the development of resistant cultivars could be the best method to reduce the losses associated with this plant pathogen (Gómez-Rodríguez et al. 2017). However, the development of resistant cultivars and varieties to *P. capsici* has been difficult due to the presence of diverse virulence phenotypes of this pathogen (Barchenger et al. 2018b; Jiang et al. 2015; Oelke et al. 2003; Sy et al. 2008).

Virulence phenotype characterization requires a set of host plants carrying one or more resistant genes with recombinant inbred lines (RILs) often used for race-typing (Oelke et al. 2003). Regarding the *Capsicum annuum*-*P. capsici* pathosystem, Sy et al. (2008) reported the development of a series of differential host lines specifically for the characterization in *P. capsici* known as the “New Mexico Recombinant Inbred Lines”

(NMRILs). The NMRILs were developed by crossing the landrace Criollo de Morelos CM-334 (considered a universally resistant host) with the highly susceptible variety Early Jalapeño. A subset of the resulting progeny was then selfed until the F₇ generation and 26 lines were further selected as useful to differentiate *P. capsici* isolates based on resistance/susceptibility reactions.

The NMRILs have been used to characterize *P. capsici* physiological races from isolates of different regions and are a valuable tool to characterize *P. capsici* isolates at a global scale. Recently, the term “race” has been replaced by the term “virulence phenotype” to characterize the interaction of *P. capsici* isolates on RILs carrying various host resistance genes (Barchenger et al. 2018b). By using the NMRILs, 12 *P. capsici* root rot virulence phenotypes were characterized from isolates recovered from New Mexico, 11 from isolates recovered from Brazil, and 24 from isolates recovered from Taiwan (Barchenger et al. 2018b; da Costa Ribeiro and Bosland 2012; Jiang et al. 2015). The NMRILs have also been used to characterize foliar blight virulence phenotypes (Monroy-Barbosa and Bosland 2010; Monroy-Barbosa and Bosland 2011).

Characterizing the virulence phenotypes present in production zones is useful in the development of resistant lines (Glosier et al. 2008). A promising approach is the introgression of specific resistance genes that could lead to multi-resistant cultivars (da Costa Ribeiro and Bosland 2012). In Mexico, there are no reports on the presence or characterization of virulence phenotypes of isolates of *P. capsici* recovered from production zones. Due to the high genetic diversity of this pathogen in Mexico (Castro-Rocha et al. 2016), it is likely that multiple virulence phenotypes exist in field populations. The objective of this study was to characterize the virulence phenotypes for *P. capsici* isolates recovered from Solanaceae and Cucurbitaceae production fields in Michoacán, Mexico using the NMRILs.

Materials and Methods

Differential hosts

For the present study, 26 NMRILs were used as differential hosts (Sy et al. 2008). The tested lines were: A, AA, AB, AC, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V, X and Z. The starting seeds of the NMRILs were provided by Dr. Paul Bosland of New Mexico State University. The NMRILs were grown in greenhouse conditions to obtain enough seed for the complete experiment. Criollo de Morelos CM-334 was used as resistant control and California Wonder (CW) as susceptible control (Seed brand “Los Molinos”, Morelos, Mexico). Seedlings were grown in germination trays divided in six sections of 100 cm³ using Sunshine® Mix 3 (90% Canadian peat moss, 10% plant starter mix) as substrate. Thirty days after germination, each plant was fertilized once per week with 20 mL of Miracle-gro ® universal fertilizer (24N-8P-16K).

Collection of isolates of *Phytophthora capsici* and determination of mating type

Twelve *P. capsici* isolates were recovered from *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* and *Cucurbita pepo* plants with root rot in eight production fields of the municipalities of Copándaro, Morelia, Queréndaro, Tacámbaro and Tarímbaro in Michoacán state (Fig. 1 and Fig. 2, Table 1). The following isolates were collected from the same field: CPV-259 and CPV-260 from a field located in Copándaro; CPV-270, CPV-271 and CPV-272 from a field located in Tarímbaro; CPV-277 and CPV-279 from a field located in Queréndaro. Plant tissues were rinsed with running tap water, small diseased tissue fragments were cut (1.0 x 0.5 cm), disinfested with 10% commercial chlorine solution (6% sodium hypochlorite) for 30 s, rinsed with sterile distilled water twice, blotted dry with sterile paper towels, transferred to NARPH-V8 plates (Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50% natamycin, 50% lactose)], Ampicillin (0.27 g L⁻¹), Rifampicin

(0.01 g L⁻¹), PCNB (0.10 g L⁻¹), and Hymexazol (0.075 g L⁻¹), and incubated at 25 °C in the dark.



Figure 1. Plants with symptoms caused by *Phytophthora capsici* in the field: a) Wilted pepper plants in a field in Queréndaro, b) Pepper plants with root rot and stem necrosis in Queréndaro, c) Wilted zucchini plant in Morelia.



Figure 2. Map of the sites where the *Phytophthora capsici* isolates were collected.

Table 1. Municipality, host and collection date of isolates of *Phytophthora capsici* from Michoacán.

Isolate	Municipality ^z	Host	Date of collection
CPV-1	Tacámbaro	<i>Capsicum annuum</i>	2002
CPV-33	Tacámbaro	<i>Solanum lycopersicum</i>	2002
CH11	Tarímbaro	<i>Capsicum annuum</i>	2011
CPV-259	Copándaro	<i>Capsicum annuum</i>	2016
CPV-260	Copándaro	<i>Capsicum annuum</i>	2016
CPV-267	Morelia	<i>Cucurbita pepo</i>	2016
CPV-270	Tarímbaro	<i>Capsicum annuum</i>	2016
CPV-271	Tarímbaro	<i>Capsicum annuum</i>	2016
CPV-272	Tarímbaro	<i>Capsicum annuum</i>	2016
CPV-273	Tarímbaro	<i>Solanum lycopersicum</i>	2016
CPV-277	Queréndaro	<i>Capsicum annuum</i>	2017
CPV-279	Queréndaro	<i>Capsicum annuum</i>	2017

^z Municipality of Michoacán, Mexico.

Mating type was determined by following the protocol described by Yin et al. (2012). All recovered isolates were placed in pairs with known A1 and A2 isolates on V8-agar medium in Petri dishes at a distance of 3 cm from each other and incubated at 25 °C for five days. After the incubation period, isolates were examined for oospore formation.

Molecular characterization of *Phytophthora capsici* isolates

The isolates CPV-1, CPV-33 and CH11 were previously reported as *P. capsici* by SNP sequencing (Castro-Rocha et al. 2016). The isolates CPV-267, CPV-270 and CPV-277 were reported as *P. capsici* by whole genome sequencing (Reyes-Tena et al. 2019). Genomic DNA was extracted from the isolates CPV-259, CPV-260, CPV-271, CPV-272, CPV-273, and CPV-279, following the method described by Saghai-Marroof et al. (1984).

Whole genomes were sequenced and assembled following the method reported by Reyes-Tena et al. (2019). A blast analysis was conducted to infer Cytochrome oxidase 1 (cox1) and cytochrome oxidase 2 (cox2) genes and determinate the identity of the isolates.

Differential host's inoculation

Host inoculation was performed as described by Bosland and Lindsay (1991) with modifications. Each isolate was transferred to V8 agar Petri dishes (150 x 15 mm). Once the growth media was completely colonized by the isolates, the agar was cut into 1 cm² fragments and transferred to new Petri dishes afterwards sterilized distilled water was added to each Petri dish until the mycelium fragments were completely covered up to the margin. The cultured isolates were kept under white light at 25°C and water was changed every 24 h during three consecutive days. Once the isolates produced sporangia, they were subjected to a temperature shock treatment of 30 min at 4 °C and 30 min at 24 °C to induce zoospore release. A sample of the zoospores containing liquid was used to quantify the zoospores in a Neubauer chamber using a drop of lactophenol blue to stain and immobilize them. A suspension containing 1 x 10⁴ zoospores mL⁻¹ was prepared for each isolate used in the experiment. One milliliter of the suspension was used as the inoculum for the resistance/susceptibility tests. The experimental unit consisted of a single plant inoculated with zoospores of a single isolate of the pathogen. Each tray had six repetitions of the same experimental unit. After the inoculation with *P. capsici*, the trays were placed in closed trays that had 4 cm of water and were randomly distributed in greenhouse benches to diminish the effect of environmental factors on the development of disease symptoms. The complete experiment had 26 NMRILs, two controls (resistant and susceptible), 12 isolates, controls without inoculum, and 6 replications for a total of 28 X 13 X 6 = 2184 experimental units. Host plants were tested at the 4-8 true leaf stage by inoculating them with 10,000 zoospores in the substrate next to the stem, with the aid

of a dosing syringe (Ape ®; 50 mL). To allow a successful plant-pathogen interaction, the substrate of the host plants was saturated with water for 24 h after the inoculation. Non-inoculated control plants were subjected to the same conditions but were not inoculated with zoospores. The pathogen was re-isolated from plants with symptoms.

Disease scoring

The severity of the disease was scored based on the following scale: 0 = No symptoms/healthy plant; 1 = yellow leaves without stem necrosis; 2 = minor stem necrosis; 3 = moderate stem necrosis and early signs of wilting; 4 = plant with severe stem necrosis and wilting; 5 = dead plant (Glosier et al. 2008).

The evaluation was performed at 20 days post-inoculation (dpi). At this time, susceptible control plants exhibited severe stem necrosis and wilting. The average disease severity for each host*isolate interaction was calculated.

Virulence phenotype determination and data analysis

The *P. capsici* virulence phenotypes were determined based on the unique resistant/susceptible interaction pattern on the differential lines. A unique resistance/susceptibility pattern on the differential hosts set was considered a unique virulence phenotype. The following criteria was used to determine if the plant hosts were resistant or susceptible: hosts with an average disease severity of 0 were considered resistant; hosts with an average diseases severity greater than 0 were considered susceptible. In addition, the data obtained from the severity scale on differential hosts was compared to the results obtained from the resistant and susceptible controls by using a Chi-squared (χ^2) test of homogeneity at a confidence level of 99%. Differential hosts lines that differed statistically from the resistant controls were considered as susceptible (Ho).

Differential hosts lines that did not differ statistically from the susceptible controls were considered as susceptible (Ha).

Results and Discussion

The *cytochrome oxidase I* and *cytochrome oxidase II* genes from the assembled genomes had at least 98% similarity to isolates of *P. capsici* in GenBank and the isolates CPV-259, CPV-260, CPV-271, CPV-272, CPV-273, and CPV-279 were identified as *P. capsici*. Ten of the isolates were able to cause infection on at least one of the differential lines and each of these pathogenic isolates produced a unique virulence phenotype using the NMRILs as differential hosts (Table 2). Ten virulence phenotypes differ from all previously reported and the prefix “MX” has been appended to their designations to indicate their unique geographical occurrence. Not all NMRILs are needed for the identification of new virulence phenotypes and the 10 new ones reported here are determined based on their differential reactions with six NMRILs (G, I, M, N, O and AC; Table 3). In previous reports, 7-10 NMRILs were used to determine the virulence phenotypes of *P. capsici* isolates (Barchenger et al. 2018b; da Costa Ribeiro and Bosland 2012; Jiang et al. 2015; Sy et al. 2008). Ideally, molecular markers could be used to determine virulence phenotypes and the use of a standardized set of differentials (e.g. NMRILs) is crucial to gain a reasonable estimate to support marker development (Barchenger et al. 2018b). Currently, *in planta* greenhouse experiments with differential hosts are the most effective method due to the limited information concerning genes directly associated with each virulence phenotype.

Table 2. Phenotypic response of the 26 NMRILs when tested for resistance against the isolates of *Phytophthora capsici*.

Isolate ^z

Host	CPV-279	CPV-277	CH11	CPV-260	CPV-1	CPV-272	CPV-271	CPV-259	CPV-33	CPV-267
CM-334 ^y	R ^v	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-T ^x	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-Z	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-P	S ^v	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-F	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
NMRIL-X	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-A	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-C	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-D	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-E	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-J	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
NMRIL-K	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R
NMRIL-O	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
NMRIL-Q	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
NMRIL-R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
NMRIL-S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
NMRIL-AA	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
NMRIL-L	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
NMRIL-M	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
NMRIL-V	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R
NMRIL-AB	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R
NMRIL-G	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S
NMRIL-H	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R
NMRIL-AC	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R
NMRIL-I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S
NMRIL-N	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R
CW ^w	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Chi-squared test (χ^2) of homogeneity showed significant differences between all the infected hosts and the resistant controls.

^z Isolates from the Plant Pathology Laboratory culture collection (UMSNH, Morelia, Mexico), ordered from most virulent to least virulent isolate.

^y Resistant control: Criollo de Morelos CM-334.

^x NMRILs from most resistant to least resistant.

^w Susceptible control: California Wonder.

^v R: resistant host, S: susceptible host.

Table 3. Virulence phenotype designation based on virulence phenotype of 10 isolates of *Phytophthora capsici* on NMRILs differential hosts.

Isolate	CPV-279	CPV-277	CH11	CPV-260	CPV-1	CPV-272	CPV-271	CPV-259	CPV-33	CPV-267
Race	MX-1 ^z	MX-2	MX-3	MX-4	MX-5	MX-6	MX-7	MX-8	MX-9	MX-10
Mating type	A2	A1	A1	A2	A1	A2	A1	A1	A1	A2
NMRIL	Host response									
C ^y	S ^x	S	R	S	S	R	R	R	R	R
G	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S
I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S
M	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
N	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R
O	R ^x	R	R	S	R	R	S	R	R	R

^z Virulence phenotype designation for isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico.

^y NMRIL arranged in alphabetic order.

^x R: resistant host, S: susceptible host.

NMRIL-N was the most susceptible differential host with 6 of the 10 isolates able to infect. Lines T and Z were resistant to all isolates. These results differ from Jiang et al.

(2015), where line S was the most susceptible while lines X and AE were resistant to infection by isolates from New Mexico. Barchenger et al. (2018b) reported lines A, S and R as the most susceptible in their experiments and lines P and O as the most resistant against isolates from Taiwan. NMRILs resistant to many *P. capsici* isolates could be used as sources of resistance genes for local or regional programs (Barchenger et al. 2018a).

The disease symptoms produced by the virulent isolates ranged in severity (Fig. 3). CPV-279 was the most virulent isolate causing disease symptoms in 18 NMRILs. CPV-277 was the second most virulent isolate causing symptoms in 15 of the differential hosts. These isolates were recovered from the same cultivation field and had different mating types (Table 3). Isolates CPV-259 and CPV-260; CPV-270, CPV-271 and CPV-272 were recovered from the same field and had different mating types. Given that *P. capsici* is a heterothallic species, this finding suggests that sexual recombination could be occurring and may be important for the generation of new, better adapted, virulence phenotypes (Erwin and Ribeiro 1996; Polach and Webster 1972). This represents a challenge for producers, since genetic recombination can lead to the emergence of strains capable of breaking the resistance barrier of the hosts (Jiang et al. 2015). The high genetic diversity of *P. capsici* in the center of Mexico (Castro-Rocha et al. 2016) and the high diversity of the *Capsicum* genus in this country (Aguilar-Meléndez et al. 2009) may drive the evolution of diverse virulence phenotypes in Michoacán. It is necessary to know the virulence phenotype makeup of the *P. capsici* populations in the production fields to be successful in the development of resistant cultivars (Jiang et al. 2015).

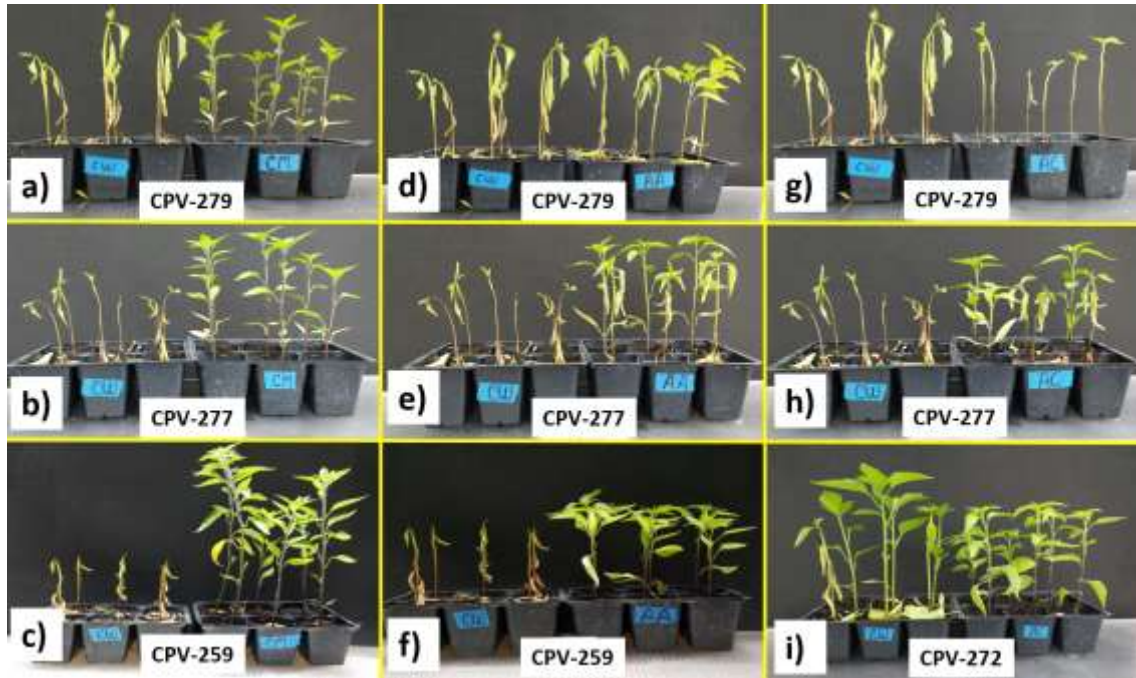


Figure 3. Disease symptoms exhibited in NMRILs inoculated with *Phytophthora capsici*. Controls: a) = CPV-279: CW (first three pots) and CM334 (second three pots), b) = CPV-277: CW (first three pots) and CM334 (second three pots), c) = CPV-259: CW (first three pots) and CM334 (second three pots). Phenotypic response in NMRIL-AA: d) = CPV-279: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AA (second three pots), e) = CPV-277: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AA, f) CPV-259: CW (first three pots) and the resistant NMRIL-AA. Phenotypic response in NMRIL-AC: g) = CPV-279: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AC (second three pots), h) = CPV-277: CW (first three pots) and the susceptible NMRIL-AC, i) CPV-272: CW (first three pots) and the resistant NMRIL-AC.

The isolates CPV-270 and CPV-273 were not virulent to any host. Non-virulent *P. capsici* isolates have been reported previously when using the NMRILs as differential hosts (da Costa Ribeiro and Bosland 2012). The isolate CPV-273 was isolated from *Solanum lycopersicum*, and it is possible that they were not pathogenic to *C. annuum* due to host specificity (Cohen 2002; Michalska et al. 2016). The remaining isolates were virulent to CW and at least to one NMRIL. For the isolates that were able to infect at least one NMRIL, CW seedlings had obvious signs of infection thus supporting the use of CW as a suitable susceptible control (Candole et al., 2012). None of the resistant CM-334 control plants showed any symptoms. The Chi-squared test (χ^2) of homogeneity showed significant differences between the infected hosts and the resistant controls (Table 2).

This study provides information of phenotypic diversity on pepper for Mexican isolates of *P. capsici* recovered from three different hosts. One limitation of this study was the low number of isolates utilized. Further studies will require to characterize a higher number of isolates from each host, with the goal to obtain a more robust virulence phenotype structure. These three hosts are cultivated in the same fields in most of the sampled sites, this activity is harmful to producers because it allows the survival of the virulence phenotypes of *P. capsici* throughout the seasons. A better crop rotation program is required to decrease the inoculum concentration. Crop rotation for three years with non-susceptible hosts is recommended because the oospores can survive and remain virulent in soils (Babadoost and Pavon, 2013; Ristaino and Johnston, 1999).

Overall, our results concur with other studies where NMRILs were successfully used as differential hosts to identify *P. capsici* virulence phenotypes from different parts of the world including USA, Brazil and Taiwan (Barchenger et al. 2018b; da Costa Ribeiro and Bosland 2012; Jiang et al. 2015; Sy et al. 2008). Also, the NMRILs are useful to designate virulence phenotypes in *P. capsici* isolates from non-*Capsicum* hosts. This was previously demonstrated by da Costa Ribeiro and Bosland (2012) and might provide a basis for determining the existence of special forms. One of the main limiting factors for the development of universally resistant cultivars is the lack of a standardized system for *P. capsici* virulence phenotypes determination (Barchenger et al. 2018b). Some studies have used commercial cultivars as differential hosts (Oelke et al. 2003; Glosier et al. 2008) which makes it difficult to compare results. Commercial pepper cultivars are not available worldwide and have the risk of gene segregation (Monroy-Barbosa and Bosland 2011), therefore the use of the NMRILs could be a viable alternative for a standardized test (Barchenger et al., 2018b).

The use of tolerant and resistant varieties is a low cost and environmentally friendly alternative that is easy to implement by producers (Hausbeck and Lamour 2004). Creole cultivars of “Huacle” and “Serrano” cultivars found in Mexico are resistant to some isolates of *P. capsici* (Gómez-Rodríguez et al. 2017; Palma-Martínez et al. 2017). Preliminary results show that native cultivars of “Chilaca” type chili pepper plants from the municipality of Queréndaro, Michoacán are tolerant to some *P. capsici* isolates when inoculated with 1×10^5 zoospores (data not shown). Now that ten *P. capsici* virulence phenotypes have been identified from the same geographic area, the next step would be to test the resistance of this tolerant plant material.

Our research provides important first results about the presence and composition of virulence phenotypes in the populations of *P. capsici* in production fields in Michoacán and is useful to producers of the state. The NMRILs were shown to be a valuable tool to designate virulence phenotype in *P. capsici* isolates of Mexico. The presence of multiple virulence phenotypes and of both mating types in the same production field suggests that outcrossing and sexual recombination may play a role in the emergence of new strains that could overcome host resistance. Knowledge of the virulence phenotypes composition within the populations of these production fields is useful in the decision-making process when developing resistant cultivars and disease management strategies. Further studies about the virulence phenotype structure in more regions from Mexico using the NMRILs, coupled with increased genetic diversity data, will help researchers and producers better understand the epidemiology of the disease in the country.

Literature Cited

- Aguilar-Meléndez, A., P.L. Morrell, M.L. Roose, and K. Seung-Chul. 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chili (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *Am. J. Bot.* 96:1190-1202.
- Babadoost, M., and C. Pavon. 2013. Survival of oospores of *Phytophthora capsici* in soil. *Plant Dis.* 97:1478-1483.
- Barchenger, D.W., K.H. Lamour, S. Zong-Ming, S. Shrestha, S. Kumar, L. Shih-Wen, R. Burlakoti, and P.W. Bosland. 2017. Intra- and intergenomic variation of ploidy and clonality characterize *Phytophthora capsici* on *Capsicum* sp. in Taiwan. *Mycol. Progress.* 16:955-963.
- Barchenger, D.W., K.H. Lamour, and P.W. Bosland. 2018a. Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Front. Plant Sci.* 9:1-16.
- Barchenger, D.W., Z.M. Sheu, S. Kumar, W.S. Lin, R.R. Burlakoti, and P.W. Bosland. 2018b. Race characterization of *Phytophthora* root rot on *Capsicum* in Taiwan as a basis for anticipatory resistance breeding. *Phytopathology* (In press.)
- Bosland, P.W., and D.L. Lindsay. 1991. A seedling screening for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Dis.* 75:1048-1050.
- Candole, B.L., P.J. Conner, C. McGregor, V. Waters, and P. Ji. 2012. The disease reactions of heirloom bell pepper “California Wonder” to *Phytophthora capsici*. *A.S.* 3:417-424.
- Castro-Rocha, A., S. Shrestha, B. Lyon, G.L. Grimaldo-Pantoja, J.P. Flores-Marges, J. Valero-Galván, M. Aguirre-Ramírez, P. Osuna-Ávila, N. Gómez-Dorantes, G. Ávila-Quezada, J.J. Luna-Ruíz, G. Rodríguez-Alvarado, S.P. Fernández-Pavía,

- and K. Lamour. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycol. Progress* 15:15.
- Cohen, Y. 2002. Populations of *Phytophthora infestans* in Israel underwent three major genetic changes during 1983 to 2000. *Phytopathology* 92:300-307.
- da Costa Ribeiro, C.S., and P.W. Bosland. 2012. Physiological race characterization of *Phytophthora capsici* isolates from several host plant species in Brazil using New Mexico Recombinant Inbred Lines of *Capsicum annuum* at two inoculum levels. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 137:421-426.
- Erwin, D.C., and O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Disease Worldwide. American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN, USA.
- García-Rodríguez, M.R., E. Chiquito-Almanza, P.D. Loeza-Lara, H. Godoy-Hernández, E. Villordo-Pineda, J.L. Pons-Hernández, M.M. González-Chavira, and J.L. Anaya-López (2010) Producción de chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44:701-709.
- Glosier, B.R., E.A. Ogundiwin, G.S. Sidhu, D.R. Sischo, and J.P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- Gómez-Rodríguez, O., T. Corona-Torres, and V.H. Aguilar-Rincón. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. *Crop. Prot.* 92:148-152.
- Hausbeck, M.K., and K. Lamour. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Dis.* 88:1292-1303.

- Jiang, L., S. Sanogo, and P.W. Bosland. 2015. Using Recombinant Inbred Lines to monitor changes in the race structure of *Phytophthora capsici* in chile pepper in New Mexico. *Plant Health Prog.* 16:235-240.
- Kamoun, S., O. Furzer, J.D.G. Jones, H.S. Judelson, G.S. Ali, R.J.D. Dalio, S.G. Roy, L. Schena, A. Zambounis, F. Penabieres, D. Cahill, M. Ruocco, A. Figueiredo, C. Xiao-Ren, J. Hulvey, R. Stam, K. Lamour, M. Gijzen, B.M. Tyler, N.J. Grünwald, M.S. Mukhtar, D.F.A. Tomé, M. Thör, G. Van den Ackerveken, J. McDowell, F. Daayf, W.E. Fry, H. Lindqvist-Kreuze, H.J.G. Meijer, B. Petre, J. Ristaino, K. Yoshida, P.R.J. Birch, and F. Govers. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 16:413-434.
- Lamour, K.H., and M.K. Hausbeck. 2002. The spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan and implications for disease management. *Phytopathology* 92:681-684.
- Lamour, K.H., R. Stam, J. Pupe, and E. Huitema. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol.* 13:329-337.
- Macías-Valdez, L., M.E. Baltazar-Brenes, E. González-Gaona, C. Serrano-Gómez, M.A. Galindo-Reyes, L.H. Maciel-Pérez, and F.J. Robles-Escobedo. 2010. Nueva Tecnología de Manejo para el Control de la Marchitez del Chile en Aguascalientes. INIFAP, Num.38, ISBN: 978-607-425-332-0, Aguascalientes, Mexico. 56 p. 14 May 2018 <<http://www.inifap-nortecentro.gob.mx/files/biblioteca/PE20820101192.pdf>>.
- Monroy-Barbosa, A., and P.W. Bosland. 2010. A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. plants. *Hortscience* 45:1563-1566.

- Monroy-Barbosa, A., and P.W. Bosland. 2011. Identification of novel physiological races of *Phytophthora capsici* causing foliar blight using the New Mexico Recombinant Inbred pepper Lines set as a host differential. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 136:205-210.
- Oelke, L.M., P.W. Bosland, and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128:213-218.
- Palma-Martínez, E., V.H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres, and O. Gómez-Rodríguez. 2017. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en líneas de chile huacle (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Fitotec. Mex.* 40:359-363.
- Polach, F.J., and R.K. Webster. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 62:20-26.
- Reyes-Tena, A., J.C. Huguet-tapia, K.H. Lamour, E.M. Goss, G. Rodríguez-Alvarado, G. Vázquez-Marrufo, R. Santillán-Mendoza, and S.P. Fernández-Pavía. 2019. Genome sequence data of six isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico. *Mol. Plant Microbe Interact.* (In Press.)
- Ristaino J.B., and S.A. Johnston. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Dis.* 83:1080-1089.
- Silva-Rojas, H.V., S.P. Fernández-Pavía, C. Góngora-Canul, B.C. Macías-López, and G.D. Ávila-Quezada. 2009. Distribución espaciotemporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27:134-147.

Sy, O., R. Steiner, and P.W. Bosland PW. 2008. Recombinant inbred line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 98:867-870.

Yin, J., K.L. Jackson, B.K. Candole, A.S. Csinos, D.B. Langston, and P. Ji. 2012. Aggressiveness and diversity of *Phytophthora capsici* on vegetable crops in Georgia. *Ann. Appl. Biol.* 160:191-200.

Capítulo III. Tolerancia a fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici* en cultivares de chile pasilla (*Capsicum annuum*).

Alfredo Reyes-Tena¹, Gerardo Rodríguez-Alvarado¹, José de Jesús Luna-Ruíz², Viridiana Arreola Romero³, Kirsten Lizeth Arriaga Solorio¹, Sylvia P. Fernández-Pavía^{1*}.

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), 58880, km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, México. (eyesnator@hotmail.com; gra.labpv@gmail.com; kirstenarriaga@gmail.com); ²Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico CP 20131. (joselunarui11@yahoo.com.mx).

³Universidad Tecnológica de Morelia, 58200, Vicepresidente Pino Suárez 750, Morelia, Michoacán, México. (arreolaviridiana@hotmail.com).

*Autor para correspondencia: fernandezpavia@hotmail.com.

Resumen

México es uno de los principales países productores de chile (*Capsicum annuum*) a nivel mundial. Sin embargo, el factor limitante más importante en la producción es la enfermedad marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici*. Este patógeno puede presentar distintos fenotipos de virulencia capaces de infectar a diversos cultivares, lo cual dificulta el manejo de esta enfermedad. El control químico es costoso, poco efectivo y detrimental para el medio ambiente; por lo cual, la búsqueda y el desarrollo de cultivares de chile con resistencia específica a diferentes fenotipos de virulencia es una excelente alternativa para el manejo de este patógeno. En este trabajo se evaluaron cuatro cultivares de chile tipo pasilla (PAS-1, PAS-2, PAS-3 y PAS-4) inoculados con fenotipos de virulencia de *P. capsici* (MX-1, MX-2, MX-7, MX-8 y MX-10). Para ello, se realizaron dos experimentos durante abril-junio de 2017 y 2018 bajo condiciones de invernadero. El

cultivar California Wonder se empleó como control susceptible y se emplearon plantas de cada cultivar sin inóculo como control negativo. De cada cultivar se inocularon seis plantas de 56 días de edad con una suspensión de 1×10^4 zoosporas/mL en la base del tallo y de manera independiente con cada fenotipo de virulencia. La severidad de la enfermedad fue evaluada a partir del tercer día después de la inoculación (ddi) y hasta 20 ddi mediante una escala de seis niveles. Se determinó el porcentaje de supervivencia y se registró la presencia de plantas asintomáticas al final del experimento. Tres de los cuatro cultivares mostraron severidades similares al control negativo en respuesta a 1, 2 o 3 fenotipos de virulencia (PAS-1 x MX-7 y MX-10; PAS-2 x MX-7, MX-8 y MX-10; y PAS-3 x MX-10). Estos cultivares también mostraron mayor porcentaje de sobrevivencia y mayor número de plantas asintomáticas. Al parecer, los cultivares PAS-1, PAS-2 y PAS-3 tienen tolerancia específica a los fenotipos de virulencia evaluados.

Palabras Clave: tolerancia específica, cultivares criollos, marchitez del chile.

Introducción

El cultivo de chile (*Capsicum annuum*) en México tiene gran importancia económica, social y científica, al ser un país con una gran diversificación y domesticación de esta solanacea (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). De acuerdo con información de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural SADER, (2019), en el año 2018 en México se produjeron 1, 046, 193 t lo que lo ubicó como uno de los principales productores a nivel mundial y el principal exportador de este producto. Los principales estados productores son Chihuahua, Michoacán, San Luis Potosí, Sinaloa y Zacatecas (SIAP, 2020). Sin embargo, el principal problema que enfrenta la producción de este cultivo a nivel local y mundial es la enfermedad conocida como “marchitez del chile” causada por el oomycete *Phytophthora capsici* (Leonian, 1922; Silva-Rojas *et al.*, 2009; Macías-Valdez *et al.*,

2010; Barchenger *et al.*, 2018a), el cual puede ocasionar la pérdida del cultivo hasta en 100% (Barchenger *et al.*, 2017). Este fitopatógeno es altamente destructivo y tiene un amplio rango de hospedantes de importancia económica (Lamour *et al.*, 2012b). La elevada diversidad genotípica y la variabilidad genética de las poblaciones especialmente en el centro de México (Castro-Rocha *et al.*, 2016), podrían conferir a este patógeno una gran capacidad de adaptación a los distintos ambientes. Además, se ha reportado en poblaciones de *P. capsici* la pérdida de heterocigosidad como un mecanismo de fijación de alelos que favorece la adaptación rápida hacia nuevos hospedantes y el surgimiento de nuevos genotipos (Lamour *et al.*, 2012a).

El control de *Phytophthora capsici* es complejo debido a la presencia de distintos fenotipos de virulencia, los cuales se determinan evaluando la resistencia o susceptibilidad de genotipos de Chile a diferentes aislados de este oomicete (Barchenger *et al.*, 2018b), los cuales pueden atacar en diferentes partes de la planta, especialmente la raíz, corona y el tallo (Oelke *et al.*, 2003; Sy *et al.*, 2008; Monroy-Barbosa y Bosland, 2010; Monroy-Barbosa y Bosland, 2011; da Costa Ribeiro y Bosland, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Reyes-Tena *et al.*, 2019). El uso de fungicidas, la solarización, y la rotación de cultivos es poco efectivo (Bi *et al.*, 2014; Barchenger *et al.*, 2018a). Por este motivo, la búsqueda, el desarrollo y el empleo de cultivares de Chile resistentes a los fenotipos de virulencia locales podría ser mejor alternativa para el manejo de esta enfermedad (Reyes-Tena *et al.*, 2019); además, es una estrategia amigable con el ambiente al evitar el uso de agroquímicos (Barchenger *et al.*, 2017). En *Capsicum annuum* se han reportado seis regiones cromosómicas mayores relacionadas con la resistencia a fitopatógenos (Castro-Rocha *et al.*, 2012); sin embargo, la comprensión de esta interacción aún no se ha logrado debido a que la resistencia es producto de la expresión de varios genes aún desconocidos (Barchenger *et al.*, 2018a). Actualmente, la búsqueda de resistencia específica a los

fenotipos de virulencia podría ser la estrategia más adecuada para la obtención de genotipos resistentes (Foster y Hausbeck, 2010).

México es un reservorio importante de variación genética dentro del género *Capsicum* (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009; Aguilar-Rincón *et al.*, 2010), donde los cultivares criollos que se utilizan en la agricultura tradicional poseen genes de resistencia y tolerancia a *P. capsici* y podrían ser fuente de germoplasma para el desarrollo de cultivares mejorados con resistencia a *P. capsici* (Palma-Martínez *et al.*, 2017; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017). Lo anterior demuestra que en México podrían encontrarse otros cultivares de chile criollo con resistencia a este patógeno y mediante selección y purificación mejorarlos para uso directo por los productores locales. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la resistencia a fenotipos de virulencia de *P. capsici* en cuatro cultivares de chile tipo pasilla del Centro-Norte de México (Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas).

Materiales y Métodos

Aislados de *Phytophthora capsici*. Se evaluaron los aislados CPV-259, 267, 271, 277 y 279, los cuales en un estudio previo se caracterizaron como los fenotipos de virulencia MX-8, MX-10, MX-7, MX-2 y MX-1 r (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Estos aislados provienen de los municipios de Copándaro, Morelia, Queréndaro y Tarímbaro, Michoacán, México. Para la producción de inóculo e inoculación de las plantas se utilizó el protocolo descrito por Reyes-Tena *et al.* (2019). Cada aislado se transfirió a cajas de Petri (150 X 15mm) con Agar-V8, cuando el crecimiento cubrió por completo la placa de agar, se cortaron fragmentos de 1 cm² los cuales se transfirieron a nuevas cajas Petri con 15 mL de agua destilada estéril. Los cultivos se incubaron bajo luz blanca fluorescente a 25 °C y el agua se cambió cada 24 h durante tres días consecutivos. En el momento en que se observó la formación de abundantes esporangios, los aislados se sometieron a un

choque térmico a 4 °C por 30 min para permitir la liberación de zoosporas. Se recuperó la suspensión de zoosporas de cada aislado y esta se ajustó a una concentración de 1×10^4 zoosporas por mL^{-1} . Un mililitro de la suspensión se inoculó en las plantas de cada cultivar de chile pasilla utilizando una jeringa dosificadora de 50 mL, (Ape ®).

Material vegetal. Se evaluaron cuatro cultivares criollos de chile pasilla: pasilla-1 (PAS-1), pasilla-2 (PAS-2), pasilla 3 (PAS-3) y pasilla 4 (PAS-4), provenientes del municipio de Queréndaro, Michoacán, Sur de Zacatecas y Norte de Aguascalientes, México. Como control susceptible se empleó el pimiento California Wonder (CW), el cual ha sido evaluado anteriormente como un control susceptible estándar (Candole *et al.*, 2012). La siembra y producción de plántulas se realizó en bandejas de 100 cm^3 con Mezcla 3 (Sunshine®) como sustrato. Cada 48 h las plántulas se regaron con agua a capacidad de campo y se fertilizaron con Miracle-Gro® (24N-8P-16K) cada siete días. Cincuenta y seis días después de la siembra todas las plantas se inocularon con el patógeno. Como control negativo, se dejó un juego de plantas de cada cultivar sin inocular.

Variables registradas. Las plantas se evaluaron de acuerdo con la escala de severidad descrita por Glosier *et al.* (2008). Esta escala comprende seis niveles de severidad: 0 = sin síntomas/planta sana; 1 = hojas cloróticas, sin necrosis en el tallo; 2 = necrosis menor del tallo; 3 = necrosis moderada del tallo y marchitez temprana; 4 = planta con necrosis severa del tallo y marchitez; 5 = planta muerta. La evaluación de la severidad se realizó 15 días después de la inoculación, momento en el que murieron las plantas del control susceptible. Al final del experimento se evaluó el porcentaje de supervivencia y se aisló al patógeno de plantas sintomáticas, y plantas que sólo mostraban puntas de raíces necróticas para verificar la presencia del patógeno.

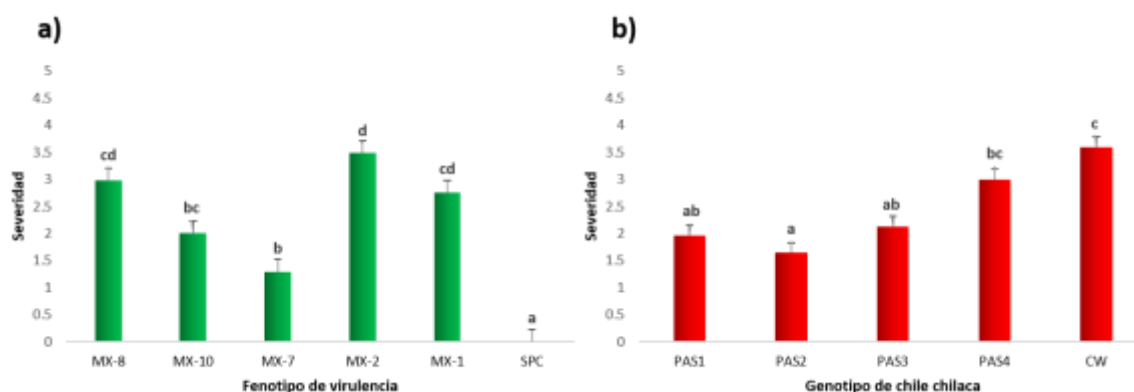
Diseño experimental. Se utilizó un diseño factorial 6 x 5 con seis repeticiones (Reyes-Tena *et al.*, 2019). El diseño contempló seis niveles del patógeno (cinco fenotipos de virulencia de *P. capsici* más un control sin inocular), y cinco cultivares (cuatro del tipo Pasilla más el control susceptible CW). La combinación arrojó 30 tratamientos o combinaciones entre los seis fenotipos del patógeno y los cinco cultivares del hospedero. Se usaron seis repeticiones (plantas) por combinación, arrojando un total de 180 unidades experimentales. El experimento se repitió dos veces durante los meses de abril-junio de 2017 y 2018.

Análisis estadístico. Los datos de severidad y sobrevivencia provenientes de cada experimento fueron analizados de manera independiente. Para analizar la interacción entre fenotipo del patógeno y cultivar del hospedero se empleó el Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías (factorial). La respuesta independiente de cada cultivar a los fenotipos del patógeno se analizó mediante un ANOVA de una vía (unifactorial). Para comparaciones específicas entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVIII y en todos los casos se consideraron efectos significativos cuando $P \leq 0.05$.

Resultados

Los resultados del análisis de varianza factorial indicaron que la interacción entre los factores fenotipo de virulencia y cultivar de Chile pasilla afectaron de forma significativa la severidad de la enfermedad ($p = 0.00$). Los fenotipos de virulencia causaron síntomas en los cultivares de Chile pasilla, donde MX-2 causó la mayor severidad en las plantas independientemente del cultivar evaluado. Estadísticamente, los fenotipos MX-1 y MX-8 causaron el mismo nivel de daño que MX-2, mientras que MX-7 causó un menor nivel de severidad y fue estadísticamente similar a MX-10 (Figura 1a). El cultivar susceptible

CW registró el mayor daño frente a los fenotipos de virulencia y fue estadísticamente similar a PAS-4, el cultivar PAS-2 registró los menores niveles de severidad y fue estadísticamente similar a PAS-1 y PAS-3 (Figura 1b).



Figura_1. Efecto de los factores: a) Fenotipo de virulencia, y b) Cultivar de chile pasilla; en el nivel de severidad de la enfermedad. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En los resultados de los ANOVAs de una vía, la respuesta de cada cultivar de chile pasilla a los fenotipos de virulencia registró diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$, Tabla 1). El cultivar PAS-1 registró una media de severidad estadísticamente similar al control sin inóculo y diferente a CW frente a los fenotipos MX-7 y MX-10; PAS-2 registró los mismos resultados frente a los fenotipos MX-7, MX-8 y MX-10; PAS-3 frente al fenotipo MX-10, mientras que PAS-4 registró un nivel de daño similar al control susceptible frente a los fenotipos evaluados.

Tabla 1. Severidad de la enfermedad causada por cinco fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici* en tres cultivares de chile pasilla.

Severidad de la enfermedad					
Aislado	CPV-259	CPV-267	CPV-271	CPV-277	CPV-279
Fenotipo de virulencia	MX-8	MX-10	MX-7	MX-2	MX-1

Sn/Pc	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
PAS-1	3.18 bc	1.67 ab	0.58 ab	3.58 bc	1.92 b
PAS-2	1.67 ab	0.89 a	0.45 ab	2.25 b	3.50 bc
PAS-3	2.18 b	1.27 a	1.91 bc	3.75 bc	2.50 bc
PAS-4	4.67 c	4.17 c	2.00 abc	3.55 bc	2.92 bc
CW	5.00 c	3.83 c	3.00 c	4.78 c	4.11 c

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$). CW = Control susceptible California Wonder. Sn/Pc = Control sin inóculo de *Phytophthora capsici*.

El porcentaje de supervivencia de los cultivares de chile pasilla osciló entre el 16.7 y 100%. El cultivar PAS-4 registró los menores porcentajes de supervivencia frente a los fenotipos de virulencia. Se encontraron plantas sin síntomas en la parte aérea, entre las repeticiones de los tratamientos, donde el mayor número de plantas sin daño se registró frente al fenotipo MX-7 (Tabla 2). De manera general, las plantas de CW registraron niveles inferiores de supervivencia y la totalidad de las plantas mostraron síntomas de la enfermedad en comparación con los cultivares de chile pasilla. El patógeno se re-aisló a partir de raíces de plantas sin síntomas en la parte aérea, por lo tanto éstas se consideraron como tolerantes. En la Figura 2 se muestran algunas interacciones cultivar x fenotipo de virulencia donde se encontraron plantas tolerantes.

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia a *Phytophthora capsici* y número de plantas asintomáticas en cultivares de chile pasilla.

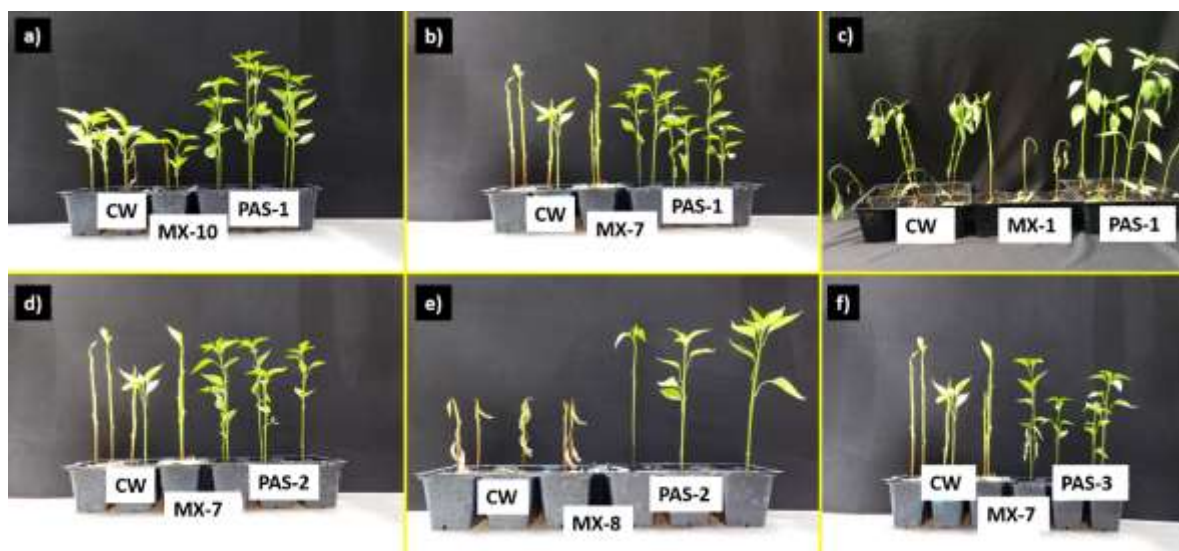
Porcentaje de supervivencia (%)					
Aislado	CPV-259	CPV-267	CPV-271	CPV-277	CPV-279
Fenotipo de virulencia	MX-8	MX-10	MX-7	MX-2	MX-1

Sn/Pc	100	100	100	100	100
PAS-1	66.7	75.0	90.0	58.3	91.7
PAS-2	75.0	100	100	66.7	66.7
PAS-3	90.0	91.7	81.8	58.3	91.7
PAS-4	33.3	16.7	75.0	72.7	55.0
CW	0.00	50.0	66.7	11.1	50.0

Número de plantas sin síntomas en la parte aérea

Sn/Pc	12	12	12	12	12
PAS-1	2	7	9	2	5
PAS-2	7	5	9	5	1
PAS-3	4	5	5	0	4
PAS-4	0	1	2	1	3
CW	0	0	0	0	0

CW = Control susceptible California Wonder. Sn/Pc = Control sin inóculo de *Phytophthora capsici*.



Figura_ 2. Interacciones cultivar x fenotipo de virulencia que registraron plantas tolerantes a *Phytophthora capsici*. a) PAS-1 x MX-10, b) PAS-1 x MX-7, c) PAS-1 x MX-1, d) PAS-2 x MX-7, e) PAS-2 x MX-8, f) PAS-3 x MX-7. CW = Control susceptible California Wonder.

Discusión

El análisis de la severidad de la enfermedad en los cultivares de chile pasilla mostró variación en la susceptibilidad, al registrarse cultivares con un nivel de daño similar al control negativo frente a ciertos fenotipos de virulencia, pero susceptibles a otros. Una amplia variación entre ambos factores, con una respuesta diferencial entre aislados y cultivares de chile también fue reportada en Corea del Sur por Byung-Soo *et al.* (2010), donde cultivares de chile tolerantes al aislado Pc003 fueron susceptibles a Pc002; y en México por Morán-Bañuelos *et al.* (2010), donde al evaluar 29 poblaciones nativas de chile del sur de Puebla frente al aislado 6143 de *P. capsici* reportaron diferencias en la agresividad, atribuibles a la variación genética de las poblaciones de chile. Por otro lado, la resistencia en cultivares de chile en función de la concentración y virulencia del aislado fue reportado en Corea del Sur por Su-Jung *et al.* (2014), quienes al evaluar la resistencia de 100 cultivares comerciales de chile frente a cuatro aislados de *P. capsici* bajo condiciones controladas, encontraron que cultivares tolerantes a 1.5×10^4 zoosporas/mL fueron susceptibles a una concentración de 1.5×10^6 zoosporas/mL. En el presente estudio, únicamente se evaluó una concentración de 1×10^4 zoosporas/mL, por lo tanto, en las interacciones cultivar x fenotipo de virulencia que mostraron tolerancia es necesario realizar evaluaciones posteriores a concentraciones más elevadas para confirmar este resultado.

El cultivar PAS-1 registró un nivel de daño similar al control sin inóculo frente a los fenotipos MX-7 y MX-10; PAS-2 frente a MX-7, MX-8 y MX-10; y PAS-3 frente al fenotipo MX-10. Adicionalmente, en estos tratamientos se encontró un mayor número de plantas sin síntomas en la parte aérea. Lo anterior sugiere que los cultivares de chile pasilla PAS-1, PAS-2 y PAS-3 podrían tener potencial para usarse en programas de fitomejoramiento frente a los fenotipos de virulencia en donde mostraron tolerancia, sin

embargo, es recomendable seguir buscando material vegetal que sea tolerante a todos los fenotipos de *P. capsici*. El fenotipo de virulencia MX-7 indujo niveles de severidad inferiores en los cultivares de chile pasilla, causando un daño similar al control sin inóculo, numéricamente los cultivares PAS-1 y PAS-2 registraron menor daño y un mayor número de plantas sin síntomas en la parte aérea por lo que son recomendables a emplearse frente a ese aislado en particular. PAS-1 es el único cultivar que podría ser usado como fuente de resistencia frente al fenotipo MX-1 al registrar valores de severidad diferentes estadísticamente al control susceptible, obtener un porcentaje de supervivencia del 91.7% y 5 plantas sin síntomas en la parte aérea. Por otro lado, MX-2 fue el fenotipo más virulento al causar un nivel de daño similar al registrado en CW en los cultivares de chile pasilla PAS-1, PAS-3 y PAS-4; sin embargo, en PAS-2 se encontraron 5 plantas sin síntomas en la parte aérea y el nivel de daño fue inferior en comparación con el control susceptible por lo que éste cultivar podría ser fuente de resistencia contra éste fenotipo. La presencia de plantas sin síntomas en la parte aérea en los cultivares de chile pasilla podría deberse a la falta de homogeneidad y la capacidad de segregación, lo que podría generar variación genética entre las plantas (Candole *et al.*, 2012). Sólo se consideraron como tolerantes aquellos cultivares donde el nivel de severidad de la enfermedad fue similar estadísticamente a la ausencia de inoculación y distinto a la severidad registrada en el control susceptible.

En la actualidad el chile tipo serrano criollo de Morelos (CM-334) es la fuente principal de resistencia a este patógeno sin importar la agresividad del aislado o las condiciones ambientales (Sy *et al.*, 2008; Castro-Rocha *et al.*, 2012). Una desventaja de este cultivar es que posee características agronómicas no deseables y actualmente no existe ninguna variedad comercial de chile que muestre resistencia universal a este patógeno (Glosier *et al.*, 2008; Oelke *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los cultivares de chile criollo de

México pueden presentar resistencia o tolerancia a aislados virulentos de *P. capsici* (Ortega *et al.*, 1991). En un estudio reciente, Palma-Martínez *et al.* (2017) encontraron cultivares de chile serrano y huacle con genes dominantes de resistencia a éste patógeno. Posteriormente, estas accesiones mostraron resistencia a 10 aislados de *P. capsici* provenientes de distintas regiones de producción de chile en México (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017). Por otro lado, Anaya-López *et al.* (2011) encontraron resistencia a aislados de *P. capsici* en las accesiones BG102 y BG107 del banco de germoplasma del INIFAP, México. Candole *et al.* (2010) al evaluar seis aislados de *P. capsici* de Georgia en 2301 accesiones de chile, encontraron que dos accesiones de México: PI 201237 y PI640532 mostraron consistentemente altos niveles de resistencia. De forma paralela, genotipos de *C. annuum* con resistencia a *P. capsici* se han reportado en Nueva York (USA), Michigan (USA), Laos y Corea del Sur, (Dunn, *et al.*, 2014; Foster y Hausbeck, 2010; Mo *et al.*, 2014; Su-jung *et al.*, 2014). Un problema común entre los genotipos de chile con resistencia es que no se comportan como resistentes en todos los lugares donde existen otras condiciones ambientales y aislados diferentes (Dunn and Smart, 2015; Messaouda *et al.*, 2015). Esto es explicado en gran medida, por la presencia de los fenotipos de virulencia del patógeno (Oelke *et al.*, 2003; Sy *et al.*, 2008). Por este motivo, la búsqueda de resistencia específica a los fenotipos de virulencia locales es la mejor vía para el desarrollo de material vegetal resistente. En este sentido, los cultivares de chile pasilla PAS-1, PAS-2 y PAS-3 podrían tener potencial para emplearse en programas de fitomejoramiento al mostrar tolerancia específica a fenotipos de virulencia previamente caracterizados (Reyes-Tena *et al.*, 2019); sin embargo, no muestran la resistencia que se observó en CM-334, por lo cual es necesario seguir buscando material vegetal con un espectro más amplio de resistencia.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado 429123.

Literatura Citada

Aguilar-Meléndez, A., P.L. Morrell, M.L. Roose, and K. Seung-Chul. 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *Am. J. Bot.* 96:1190-1202.

Aguilar-Rincón, V.H., T. Corona-Torres, P. López-López, L. Latournerie-Moreno, M. Ramírez-Meraz, H. Villalón-Mendoza, y J. A. Aguilar-Castillo. 2010. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114p.

Anaya-López, J.L., M.M. González-Chavira, E. Villordo-Pineda, R. Rodríguez-Guerra, R. Rodríguez-, Martínez, R.G. Guevara-González, L. Guevara-Olvera, V. Montero-Tavera, and I. Torres-Pacheco. 2011. Selection of chili pepper genotypes resistant to pathogenic wilt disease complex. *REMEXCA.* 2:373-383.

Barchenger, D.W., K.H. Lamour, S. Zong-Ming, S. Shrestha, S. Kumar, L. Shih-Wen, R. Burlakoti, and P.W. Bosland. 2017. Intra- and intergenomic variation of ploidy and clonality characterize *Phytophthora capsici* on *Capsicum* sp. in Taiwan. *Mycol. Progress.* 16:955-963.

Barchenger, D.W., K.H. Lamour, and P.W. Bosland. 2018a. Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Front. Plant Sci.* 9:1-16.

- Barchenger, D.W., Z.M. Sheu, S. Kumar, W.S. Lin, R.R. Burlakoti, and P.W. Bosland. 2018b. Race characterization of *Phytophthora* root rot on *Capsicum* in Taiwan as a basis for anticipatory resistance breeding. *Phytopathology* 108:964-971.
- Bi, Y., J. Hu, X. Cui, J. Shao, X. Lu, Q. Meng, and X. Liu. 2014. Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. *Plant Pathol.* 63:1365-1373.
- Byung-Soo, K., K. Tae-Ryong, H. Ji-Eun, L. Jae-Moo, P. Dong-Guen, A. Joon-Hyung, and K. Hye-Yeon. 2010. Resistant to *Phytophthora* blight of commercial pepper cultivars in Korea. *Res. Plant. Dis.* 16:141-147.
- Candole, B.L., P.J. Conner, and P. Ji. 2010. Screening *Capsicum annuum* accessions for resistance to six isolates of *Phytophthora capsici*. *Hortsci.* 45:254-259.
- Candole, B.L., P.J. Conner, C. McGregor, V. Waters, and P. Ji. 2012. The disease reactions of heirloom bell pepper “California Wonder” to *Phytophthora capsici*. *A.S.* 3:417-424.
- Castro-Rocha, A., S. P. Fernández-Pavía, y P. Osuna-Ávila. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum* - *Phytophthora capsici*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 30:49-65
- Castro-Rocha, A., S. Shrestha, B. Lyon, G.L. Grimaldo-Pantoja, J.P. Flores-Marges, J. Valero-Galván, M. Aguirre-Ramírez, P. Osuna-Ávila, N. Gómez-Dorantes, G. Ávila-Quezada, J.J. Luna-Ruíz, G. Rodríguez-Alvarado, S.P. Fernández-Pavía, and K. Lamour. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycol. Progress* 15:15.

- da Costa Ribeiro, C.S., and P.W. Bosland. 2012. Physiological race characterization of *Phytophthora capsici* isolates from several host plant species in Brazil using New Mexico Recombinant Inbred Lines of *Capsicum annuum* at two inoculum levels. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 137:421-426.
- Dunn, A.R., H.W. Lange, and C.D. Smart. 2014. Evaluation of commercial bell pepper cultivars for resistance to *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*). Plant Health Prog. 15:19-24.
- Dunn, A.R. and C.D. Smart. 2015. Interactions of *Phytophthora capsici* with resistant and susceptible pepper roots and stems. Phytopathology. 105:1355-1361.
- Foster, J.M., and M.K. Hausbeck. 2010. Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. Plant. Dis. 94:24-30.
- Glosier, B.R., E.A. Ogundiwin, G.S. Sidhu, D.R. Sischo, and J.P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica 162:23-30.
- Gómez-Rodríguez, O., T. Corona-Torres, and V.H. Aguilar-Rincón. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. Crop. Prot. 92:148-152.
- Jiang, L., S. Sanogo, and P.W. Bosland. 2015. Using Recombinant Inbred Lines to monitor changes in the race structure of *Phytophthora capsici* in chile pepper in New Mexico. Plant Health Prog. 16:235-240.
- Lamour, K.H., J. Mudge, D. Gobena, O.P. Hurtado-Gonzales, J. Schmutz, A. Kuo, N.A. Miller, B.J. Rice, S. Raffaele, L.M. Cano, A.K. Bharti, R.S. Donahoo, S. Finley, E. Huitema, J. Hulvey, D. Platt, A. Salamov, A. Savidor, R. Sharma, R. Stam, D.

- Storey, M. Thines, J. Win, B.J. Haas, D.L. Dinwiddie, J. Jenkins, J.R. Knight, J.P. Affourtit, C.S. Han, O. Chertkov, E.A. Lindquist, C. Detter, I.V. Grigoriev, S. Kamoun, and S.F. Kingsmore. 2012a. Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:1350-1360.
- Lamour, K.H., R. Stam, J. Pupe, and E. Huitema. 2012b. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol.* 13:329-337.
- Leonian, L.H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology.* 12:401-408.
- Macías-Valdez, L., M.E. Baltazar-Brenes, E. González-Gaona, C. Serrano-Gómez, M.A. Galindo-Reyes, L.H. Maciel-Pérez, and F.J. Robles-Escobedo. 2010. Nueva tecnología de manejo para el control de la marchitez del chile en Aguascalientes. INIFAP, Num.38, ISBN: 978-607-425-332-0, Aguascalientes, Mexico. 56 p.
- Messaouda, B., G. Abdelhadi, and M. Samia. 2015. Susceptibility of Algerian pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) to *Phytophthora capsici* strains from different geographic areas. *AJB* 14:3011-3018.
- Mo, H., S. Kim, K.P.P. Wai, M.I. Siddique, H. Yoo, and K. Byung-Soo. 2014. New sources of resistance to *Phytophthora capsici* in *Capsicum* spp. *Hort. Environ. Biotechnol.* 55:50-55.
- Monroy-Barbosa, A., and P.W. Bosland. 2010. A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. plants. *HortScience* 45:1563-1566.

- Monroy-Barbosa, A., and P.W. Bosland. 2011. Identification of novel physiological races of *Phytophthora capsici* causing foliar blight using the New Mexico Recombinant Inbred pepper Lines set as a host differential. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 136:205-210.
- Morán-Bañuelos, S.H., V.H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres, y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. Rev. Fitotec. Mex. 33: 21-26.
- Oelke, L.M., P.W. Bosland, and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 128:213-218.
- Ortega, R.G., C.P. Español, and J.C. Zueco. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line ‘SCM-334’. Plant Breed. 107:50-55.
- Palma-Martínez, E., V.H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres, and O. Gómez-Rodríguez. 2017. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en líneas de chile huacle (*Capsicum annuum* L.). Rev. Fitotec. Mex. 40:359-363.
- Reyes-Tena, A., A. Castro-Rocha, G. Rodríguez-Alvarado, G. Vázquez-Marrufo, M.E. Pedraza-Santos, K. Lamour, J. Larsen, and S.P. Fernández-Pavía. 2019. Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico. HortScience 54: 1526-1531.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.gob.mx/siap (consulta, julio 2019).
- Silva-Rojas, H.V., S.P. Fernández-Pavía, C. Góngora-Canul, B.C. Macías-López, y G.D. Ávila-Quezada. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile

(*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Rev. Mex. Fitopatol. 27:134-147.

Su-Jung, J., S. Sun-Ah, S.J. Kyoung, H.C. Yong, K. Jin-Cheol, and J.C. Gyung. 2014. Resistance of chili pepper cultivars to isolates of *Phytophthora capsici*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 32:66-76.

Sy, O., R. Steiner, and P.W. Bosland PW. 2008. Recombinant inbred line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. Phytopathology 98-867-870.

Capítulo IV. Artículo publicado en la revista *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-01-19-0014-A>

Genome sequence data of six isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico

Alfredo Reyes-Tena ^{1,2}, José C. Huguet-Tapia ², Kurt H. Lamour ³, Erica M. Goss ^{2,4}, Gerardo Rodríguez-Alvarado ¹, Gerardo Vázquez-Marrufo ⁵, Ricardo Santillán-Mendoza ¹, and Sylvia P. Fernández-Pavía ^{1,*}

¹ Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, México 58880.

² Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A. 32611.

³ Department of Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, Knoxville, TN, U.S.A. 37996.

⁴ Emerging Pathogens Institute, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A. 32610.

⁵ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México 58880.

*Corresponding author: Sylvia P. Fernández-Pavía; E-mail: fernandezpavia@hotmail.com

Funding

Funding for activities associated with sequencing were supported by Hatch project TN00523 to Kurt Lamour.

Abstract

Phytophthora capsici is an oomycete plant pathogen with a wide host range. Worldwide, *P. capsici* is known for causing the principal disease of chili pepper crops. Our goal was to expand the available genome resources for this diverse pathogen by generating whole genome sequences for six isolates of *P. capsici* from Mexico.

Genome Announcement

Phytophthora capsici is an important oomycete plant pathogen on vegetable crops. It is the causal agent of the principal disease of *Capsicum annuum* worldwide, and can infect many other economically important vegetables in Solanaceae and Cucurbitaceae (Reis et al. 2018). Disease can be on all portions of the host plants, including root rot, stem necrosis, foliar blight and fruit rot (Candole et al. 2012). The main virulence factors of this pathogen are secreted RXLR and Crinklers (CRN) effector proteins that counteract the plant defense response and facilitate infection (Stam et al. 2013; Kong et al. 2017). *Phytophthora capsici* has shown great adaptability to fungicides and new hosts. Analysis of the reference genome suggested that the loss of heterozygosity could be involved in fixing alleles and facilitating adaptation to its environment (Lamour et al. 2012). To expand upon the available sequenced genomes, we assembled six genomes of isolates of *P. capsici* from four hosts in Michoacan, Mexico. These isolates are from hosts that are not represented in previous studies of *P. capsici* (Hu et al. 2018).

Phytophthora capsici isolates were obtained from *Cucurbita pepo* (CPV-262 and, CPV-267, from the same field), *Capsicum annuum* (CPV-270, CPV-277), *Capsicum chinense* (CPV-302), and *Capsicum pubescens* (CPV-219) in Michoacan, Mexico. The isolates were cultivated in V8-agar. Genomic DNA was extracted following the method described by Saghai-Marooof et al. (1984). For sequencing, 2x150-bp paired-end PCR-free Illumina

libraries with an average insert size of 250-bp were constructed using the KAPA hyperprep kit according to the manufacturer’s directions. Sequencing was performed on a HiSeq X device at Admera Health according to current Illumina protocols. The sequences obtained had the following read depth per genome: CPV-219: 111x, CPV-262: 62x, CPV-267: 74x, CPV-270: 80x, CPV-277: 77x, and CPV-302: 98x. The raw sequences were quality filtered and adapter-trimmed with Trim-Galore (Babraham Bioinformatics). Platanus-allee version 2.0.1 was used for the *de novo* genome assembly (Kajitani et al. 2014). To remove alternative heterozygous contigs and to obtain less fragmented assemblies, the Redundans pipeline was applied to each genome (Pryszcz and Gabaldón 2016). Contigs shorter than 1 Kb were filtered out from the final assembly. General statistics of the genome assemblies were assessed with QUAST (Gurevich et al. 2013). The GC content ranged between 49.85 and 49.96 % among genomes. The genome sizes, number of contigs assembled, the N50 and L50 values are shown in Table 1.

Table 1. General metrics of the genome assemblies of *P. capsici*.

Isolate	Total length (Mb)	# contigs	N50	L50	Total predicted proteins	RXLR content	CRN content	NPP1
CPV-219	58.88	7,580	14,052	1,184	25,102	379	230	83
CPV-262	40.77	11,754	4,558	2,492	19,275	263	121	64
CPV-267	52.19	11,832	6,599	2,287	23,579	341	183	79
CPV-270	58.29	8,363	11,645	1,422	25,004	371	213	75
CPV-277	53.43	9,341	9,423	1,599	23,404	350	181	82
CPV-302	56.90	9,277	9,970	1,652	24,322	353	187	85

GeneMark-ES was used for the *ab initio* prediction of genes and to obtain protein sequences (Lomsadze et al. 2005). The assembly completeness was calculated with

BUSCO v3 (Simão et al. 2015), based on the *alveolata_stramenophiles_ensembl* data set, available at: <https://busco.ezlab.org/>. The BUSCO analysis produced the following percentage of complete or partially complete gene groups: CPV-219: 91.5 %, CPV-262: 72.6 %, CPV-267: 82.9 %, CPV-270: 89.8 %, CPV-277: 91.0 %, and CPV-302: 93.2 %.

A core of 11,248 orthologs from the seven genomes was obtained using OrthoMCL (Li et al. 2003). Two phylogenetic trees were obtained using 6,555 single copy orthologous genes from our six genomes and the reference genome using MRBAYES with the evolution model GTR + G (Huelsenbeck and Ronquist, 2001); and PhyML (Maximum-likelihood) (Guindon et al. 2010). Both trees showed an identical topology and indications of different relationships across core genes based on posterior probability and bootstrap support values. The majority of core genes did not cluster isolates by host or collection location.

Protein predictions were annotated by comparing our sequences against the Pfam database 32.0 (El-Gebali et al. 2018). Among the predicted proteins, we found an average of 78 genes belonging to a NPP1 *Phytophthora* toxins family. The total number of predicted proteins by genome were in the range of 19,275 to 25,102. We retrieved high-quality RXLR and CRN protein sequences from the GenBank to create a protein model for each effector family. Protein models were created with hmm-build tool from HMMER v3.2.1 (hmm.org). The proteome of each sequenced strain was scanned with the protein effector models, using hmm-search from HMMER v3.2.1. We found an average of 345.8 RXLR and 185.8 CRN proteins, of which 1,756 RXLR and 430 CRN are not in the reference genome. The effector sequences were deposited in the Database of Virulence Factors in Fungal Pathogens from the University of Nebraska-Lincoln (Lu et al. 2012). These data may reveal conserved and host-specific RXLR and CRN effectors, for which

one could determine specific functions and mechanisms of action during the development of the disease in plants.

Data availability. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accessions numbers RQEI00000000 (CPV-302), RQEJ00000000 (CPV-277), RQEK00000000 (CPV-270), RQEL00000000 (CPV-267), RQEM00000000 (CPV-262), and RQEN00000000 (CPV-219). The versions described in this paper are the first versions. The reads for all isolates were deposited at NCBI/SRA under the accession number PRJNA505815.

Acknowledgments

Alfredo Reyes-Tena thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (CONACYT) for providing a doctoral scholarship (number 429123), and the mobility scholarship.

Literature Cited

- Candole, B. L., Conner, P. J., McGregor, C., Waters, V., and Ji, P. 2012. The disease reactions of heirloom bell pepper “California Wonder” to *Phytophthora capsici*. *Agr. Sci.* 3:417-424.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., and Finn, R. D. 2018. The Pfam protein families database in 2019, *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gky995.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59:307-321.

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072-1075.
- Hu, J., Shrestha, S., Zhou, S., Liu, X., and Lamour, K. 2018. Dynamic Extreme Aneuploidy (DEA) in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici* sheds light on instant evolution and intractability. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/297788>.
- Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, H., Toyoda, A., Ogura, Y., Okuno, M., Yabana, M., Harada, M., Nagayasu, E., Maruyama, H., Kohara, Y., Fujiyama, A., Hayashi, T., Itoh, T. 2014. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.* 24:1384-95. doi: 10.1101/gr.170720.113.
- Kong, L., Qiu, X., Kang, J., Wang, Y., Chen, H., Huang, J., Qiu, M., Zhao, Y., Kong, G., Ma, A., Wang, Y., Ye, W., Dong, S., Ma, W., and Wang, Y. 2017. A *Phytophthora* effector manipulates host histone acetylation and reprograms defense gene expression to promote infection. *Curr. Biol.* 27:981-991.
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., Miller, N. A., Rice, B. J., Raffaele, S., Cano, L. M., Bharti, A. K., Donahoo, R. S., Finley, S., Huitema, E., Hulvey, J., Platt, D., Salamov, A., Savidor, A., Sharma, R., Stam, R., Storey, D., Thines, M., Win, J., Haas, B. J., Dinwiddie, D. L., Jenkins, J., Knight, J. R., Affourtit, J. P., Han, C. S., Chertkov, O., Lindquist, E. A., Detter, C., Grigoriev, I. V., Kamoun, S., and Kingsmore, S. F. 2012. Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid

- adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:1350-1360.
- Li, L., Stoeckert C. J. Jr., and Roos D. S. 2003. OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13:2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503.
- Lomsadze, A., Ter-Hovhannisyan, V., Chernoff, Y. O., and Borodovsky, M. 2005. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. *Nucleic Acids Res.* 33:6494-6506.
- Lu, T., Yao, B., and Zhang, C. 2012. DFVF: database of fungal virulence factors. *Database* 2012:bas032. doi: 10.1093/database/bas032.
- Pryszcz, L. P., and Gabaldón, T. 2016. Redundans: an assembly pipeline for highly heterozygous genomes. *Nucleic Acids Res.* 44:e113.
- Reis, A., Paz-Lima, M. L., Moita, A. W., Aguiar, F. M., Fonseca, M. E. N., Café-Filho, A. C., and Boiteux, L. S. 2018. A reappraisal of the natural and experimental host Rosaceae and Fabaceae. *J. Plant Pathol.* 100:215-223.
- Saghai-Marroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:8014-8018.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., and Zdobnov, E. M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210-3212.

Stam, R., Jupe, J., Howden, A. J. M., Morris, J. A., Boevink, P. C., Hedley, P. E., and Huitema, E. 2013. Identification and characterization CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functionality diversity. PLoS ONE 8(3): e59517.

Discusión general

Los cultivos de solanaceas y cucurbitaceas en zonas de producción del centro de México son afectados por el patógeno *Phytophthora capsici*. En los cultivos de chile en Michoacán evaluados en el presente estudio se registraron incidencias de la enfermedad de la marchitez en el rango de 20 a 80%. Este dato es consistente con lo reportado en la literatura donde se han registrado pérdidas económicas entre el 25 y el 90% en cultivos de Michigan (Estados Unidos de América) y México (Espinosa-Victoria *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2010; Granke *et al.*, 2012). Uno de los factores que dificulta el manejo de *P. capsici* es la posible presencia de reproducción sexual en los cultivos cuando están presentes los tipos de compatibilidad A1 y A2 en la misma zona, esto propicia la formación de estructuras de resistencia y el surgimiento de nuevos genotipos con mayor capacidad de adaptación (Barchenger *et al.*, 2018a Meitz *et al.*, 2010). En este trabajo, las poblaciones del patógeno en las zonas muestreadas están conformadas por individuos de distinto tipo de compatibilidad sexual en una proporción 1:1. Además, ambos tipos de compatibilidad fueron detectados en una misma parcela de cultivo, lo cual concuerda con lo reportado en poblaciones del patógeno en China, Brasil, Estados Unidos, Sudáfrica, Taiwán y Vietnam (Bi *et al.*, 2014; da Costa-Ribeiro y Bosland, 2012; Meitz *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2015; Sheu *et al.*, 2009; Sy *et al.*, 2008), donde se han registrado poblaciones con distintos tipos de compatibilidad sexual y en una misma parcela. Sin embargo, estos resultados contrastan con los reportados en regiones de Perú y Argentina, donde se ha reportado la presencia de poblaciones clonales con individuos pertenecientes a un solo tipo de compatibilidad sexual (Gobena *et al.*, 2012; Hurtado-González *et al.*, 2008). La reproducción sexual en poblaciones del centro de México podría favorecer el desarrollo de nuevos genotipos y dificultar su manejo debido a la posible formación de oosporas. En el presente trabajo se encontró también un aislado homotálico obtenido de

chile tipo poblano; la presencia de homotalismo en *P. capsici* ha sido previamente reportada y es posible que existan un mayor número de aislados con esta característica (Islam *et al.*, 2004). Por otro lado, se encontraron dos aislados obtenidos de *C. annuum* y *C. chinense* con capacidad de formar clamidosporas; esta característica ha sido debatida entre investigadores donde se ha reportado que *P. capsici* no forma clamidosporas (Martin *et al.*, 2012). Sin embargo, la presencia de clamidosporas en aislados de este patógeno ha sido previamente reportada en aislados de Illinois y Malasia (Farhana *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2004) y podría ser un dato característico de la plasticidad fenotípica que presenta este patógeno.

Este es el primer reporte sobre la caracterización de fenotipos de virulencia de *P. capsici* en *C. annuum* en México. Las poblaciones de *P. capsici* de zonas productoras de cucurbitáceas y solanáceas de Michoacán contienen distintos fenotipos de virulencia los cuales dificultan el manejo del patógeno. La presencia de fenotipos de virulencia ha sido reportado en poblaciones de Brasil, Estados Unidos y Taiwán (Barchenger *et al.*, 2018b; da Costa-Ribeiro y Bosland, 2012; Oelke *et al.*, 2003; Sy *et al.*, 2008), lo que sugiere que *P. capsici* presenta una gran diversidad de fenotipos de virulencia alrededor del mundo, lo anterior en gran medida podría explicar la dificultad para encontrar cultivares resistentes. El presente estudio demuestra la importancia de caracterizar los fenotipos de virulencia debido a que los diez aislados evaluados pertenecieron a diez distintos fenotipos de virulencia, y es posible que existan múltiples fenotipos en una misma zona o campo de producción. Por otro lado, los cultivares de chile tipo pasilla evaluados frente a los fenotipos de virulencia de Michoacán, no mostraron tolerancia a todos los fenotipos de *P. capsici*, lo anterior concuerda con lo reportado por Byung-Soo *et al.* (2010), donde no encontraron cultivares resistentes a la totalidad de los aislados evaluados. Sin embargo, existen estudios donde se han evaluado cultivares de chile criollo tipo huacle y serrano

que fueron resistentes a aislados virulentos del patógeno (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017; Palma-Martínez *et al.*, 2017). Por este motivo, es necesario la evaluación de este material vegetal contra fenotipos de virulencia previamente caracterizados y la búsqueda de nuevos cultivares con un mayor rango de resistencia los cuales posean características agronómicas deseables para el mercado. Finalmente, en este trabajo se reporta por primera vez la secuenciación genómica de aislados de *P. capsici* en México. La disponibilidad de un mayor número de secuencias genómicas de este patógeno podría ser útil para la detección de nuevos genes de factores de virulencia y sus posibles mecanismos de acción, tal es el caso de las proteínas efectoras de tipo RXLR, CRN y NPP1. Los ensamblajes de los genomas se realizaron empleando el programa Platanus-Allee (Kajitani *et al.*, 2019). Este programa mostró ser útil para ensamblar genomas en organismos eucariotas altamente variables, como nuestro caso, y se perfila para ser una herramienta que permitirá incrementar la calidad de los ensamblajes de esta y otras especies del género *Phytophthora* en el futuro.

Conclusiones generales

Las zonas de producción de solanáceas y cucurbitáceas del centro de México son afectadas por distintos fenotipos de virulencia de *P. capsici*. Esta información podría ser de utilidad para la evaluación de material vegetal resistente frente a los fenotipos de virulencia caracterizados.

Los cultivares de chile pasilla de Michoacán no mostraron tolerancia a todos los fenotipos de virulencia del patógeno, por lo tanto es necesario la búsqueda de material vegetal con un espectro de resistencia más amplio.

Los genomas de *P. capsici* contienen un amplio número de secuencias de genes de efectores de tipo RXLR, CRN y NPP1. Esta información podría ser de utilidad para determinar nuevos factores de virulencia y sus mecanismos de acción en el hospedante.

Literatura citada complementaria

Amaro T. M. M. M., Thilliez G. J. A., Motion G. B., and Huitema E. 2017. A perspective on CRN proteins in the genomics age: evolution, classification, delivery and function revisited. *Front. Plant Sci.* 8:99.

Akino S., Takemoto D., and Hozaka K. 2014. *Phytophthora infestans*: a review of past and current studies on potato late blight. *J. Gen. Plant Pathol.* 80:24-27.

Barchenger D. W., Lamour K. H., and Bosland P. W. 2018a. Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Front. Plant Sci.* 9:1-16.

Barchenger D. W., Sheu Z. M., Kumar S., Lin W.S., Burlakoti R.R., and Bosland P.W. 2018b. Race characterization of *Phytophthora* root rot on *Capsicum* in Taiwan as a basis for anticipatory resistance breeding. *Phytopathology.* 108:964-971.

Bautista-Calles J., García-Espinosa R., Zavaleta-Mejía E., Pérez-Moreno J., Montes-Belmont R., Ferrera-Cerrato R., y Huerta-Lara M. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annuum* L.). *Interciencia.* 35:613-618.

Bi Y., Hu J., Cui X., Shao J., Lu X., Meng Q., and Liu X. 2014. Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. *Plant Pathol.* 1365-1373.

- Bozkurt T. O., Schornack S., Banfield M. J., and Kamoun S. 2012. Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:483-492.
- Byung-Soo, K., Tae-Ryong K., Ji-Eun H., Jae-Moo L., Dong-Guen P., Joon-Hyung A., and Hye-Yeon K. 2010. Resistant to *Phytophthora* blight of commercial pepper cultivars in Korea. *Res. Plant Dis.* 16:141-147.
- Candole B. L., Conner P. J., and Ji P. 2010. Screening *Capsicum annuum* accessions for resistance to six isolates of *Phytophthora capsici*. *Hortscience.* 45:254-259.
- Castro-Rocha A., Shrestha S., Lyon B., Grimaldo-Pantoja G. L., Flores-Marges J. P., Valero-Galván J., Aguirre-Ramírez M., Osuna-Ávila P., Gómez-Dorantes N., Ávila-Quezada G., Luna-Ruíz J. J., Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S. P., and Lamour K. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycol. Progress.* 15:15.
- Chen X. R., Zhang Y., Li H. Y., Zhang Z. H., Sheng G. L., Li Y. P., Xing Y. P., Huang S. X., Tao, H., Kuan T., Zhai Y., and Ma W. The RXLR effector PcAvh1 is required for full virulence of *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Microbe In.* 32:986-1000.
- da Costa Ribeiro C. S., and Bosland P.W. 2012. Physiological race characterization of *Phytophthora capsici* isolates from several host plant species in Brazil using New Mexico Recombinant Inbred Lines of *Capsicum annuum* at two inoculum levels. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 137:421-426.
- Dunn A. R., and Smart C. D. 2015. Interactions of *Phytophthora capsici* with resistant and susceptible pepper roots and stems. *Phytopathology.* 105:1355-1361.

- Enzenbacher T. B., Naegele R. P., and Hausbeck M. K. 2015. Susceptibility of greenhouse ornamentals to *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis*. *Plant Dis.* 99:1808-1815.
- Erwin D. C., and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 562 p.
- Espinosa-Victoria D., González-Mendoza D., Placencia de la Parra J., y García-Espinoza R. 2004. Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo en el sistema radical de plantas de Chile pre-micorrizadas con *Glomus intraradices*. *Terra Latinoamericana.* 22:317-326.
- Farhana M. D. S. N., Bivi M. R., Khairulmazmi A., Wong S. K., and Sariah M. 2013. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora capsici*, the causal agent of foot rot disease of black pepper in Sarawak, Malaysia. *Int. J. Agric. Biol.* 15: 1083-1090.
- Fitchner E. J., Lynch S. C., and Rizzo D. M. 2007. Detection, distribution, sporulation, and survival of *Phytophthora ramorum* in a California redwood-tanoak forest soil. *Phytopathology.* 97:1366-1375.
- Foster J. M., and Hausbeck M. K. 2010. Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. *Plant Dis.* 94:24-30.
- García-Rodríguez M. R., Chiquito-Almanza E., Loeza-Lara P. D., Godoy-Hernández H., Villordo-Pineda E., Pons-Hernández J. L., González-Chavira M. M., and Anaya-López J. L. 2010. Producción de Chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia.* 44:701-709.

- Gobena D., Roig J., Galmarini C., Hulvey J., and Lamour K. 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* isolates from pepper and pumpkin in Argentina. *Mycologia*. 104:102-107.
- Gómez-Rodríguez O., Corona-Torres T., and Aguilar-Rincón V. H. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. *Crop Prot.* 92:148-152.
- Granke L. L., Quesada-Ocampo L., Lamour K., and Hausbeck M. K. 2012. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Dis.* 95:1588-1600.
- Hurtado-González O., Aragon-Caballero L., Apaza-Tapia W., Donahoo R., and Lamour K. 2008. Survival and spread of *Phytophthora capsici* in coastal Peru. *Phytopathology* 98:688-694.
- Hwang Y. T., Wijekoon C., Kalischuk M., Johnson D., Howard R., Prüfer D., and Kawchuk L. 2014. Evolution and management of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* in Canada and the United States. *Am. J. Potato Res.* 91:579-593.
- Islam S. Z., Babadoost M., Lambert N. K., Ndeme A., and Fouly H. M. 2004. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. *Plant Dis.* 89: 191-197.
- Jiang L., Sanogo S., and Bosland P. W. 2015. Using Recombinant Inbred Lines to monitor changes in the race structure of *Phytophthora capsici* in chile pepper in New Mexico. *Plant Health Prog.* 16:235-240.

- Kajitani R., Yoshimura D., Okuno Miki., Minakuchi Y., Kagoshima H., Fujiyama A., Kubokawa K., Kohara Y., Toyoda A., and Itoh T. 2019. Platanus-allee is a de novo haplotype assembler enabling a comprehensive access to divergent heterozygous regions. *Nat. commun.* 10:1702.
- Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:41-60.
- Lamour K. H., Stam R., Pupe J., and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol.* 13:329-337.
- Leonian L. H. 1922. Steam and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology.* 12:402-408.
- Lo-Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Zuccaro A., Reissman S., Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:513-545.
- Martin F. N., Abad Z. G., Balci Y., and Ivors K. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Dis.* 96:1080-1103
- Meitz J. C., Linde C. C., Thompson A., Langenhoven S., and McLeod A. 2010. *Phytophthora capsici* on vegetable hosts in South Africa: distribution, host range and genetic diversity. *Australas. Plant Path.* 39:431-439.
- Monroy-Barbosa A., and Bosland P. W. 2010. A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. plants. *Hortscience.* 45:1563-1566.

- Monroy-Barbosa A., and Bosland P. W. 2011. Identification of novel physiological races of *Phytophthora capsici* causing foliar blight using the New Mexico Recombinant Inbred pepper Lines set as a host differential. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 136:205-210.
- Mora-Dañino A. L. 2014. Variabilidad de aislados de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* provenientes de plantas ornamentales. Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. 112 p.
- Morgan W., and Kamoun S. 2007. RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. Curr. Opin. Microbiol. 10:332-338.
- Nguyen V. L. 2015. Spread of *Phytophthora capsici* in black pepper (*Piper nigrum*) in Vietnam. Engineering. 7:506-513.
- Oelke L. M., Bosland P. W., and Steiner R. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 128:213-218.
- Palma-Martínez E., Aguilar-Rincón V.H., Corona-Torres T., and Gómez-Rodríguez O. 2017. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en líneas de chile huacle (*Capsicum annuum* L.). Rev. Fitotec. Mex. 40:359-363.
- Quesada-Ocampo L. M., and Hausbeck M. K. 2010. Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology. 100:619-627
- Reeksting B. J., Coetzer N., Mahomed W., Engelbrecht J., and van den Berg N. 2014. *De novo* sequencing, assembly, and analysis of the root transcriptome of *Persea*

- americana* (Mill.) in response to *Phytophthora cinnamomi* and flooding. Plos One. 9: e86399.
- Rehmany A. P., Gordon A., Rose L. E., Allen R. L., Armstrong M. R., Whisson S. C., Kamoun S., Tyler B. M., Birch P. J. R., and Beynon J. L. 2005. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPPI resistance genes from two *Arabidopsis* lines. Plant Cell. 17:1839-1850.
- Reyes-Tena A., Castro-Rocha A., Rodríguez-Alvarado G., Vázquez-Marrufo G., Pedraza-Santos M. E., Larsen J., and Fernández-Pavía S. P. 2019. Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico. Hortscience. 54:1526-1531.
- Ristaino J. B. 1990. Intraespecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. Phytopathology. 80:1253-1259.
- Schorneck S., Huitema E., Cano L. M., Bozkurt T. O., Oliva R., van Damme M., Schwizer S., Raffaele S., Chaparro-García A., Farrer R., Segretin M. E., Bos J., Haas B. J., Zody M. C., Nusbaum C., Win J., Thines M., and Kamoun S. 2009. Ten things to know about oomycete effectors. Mol. Plant Pathol. 10:795-803.
- Shen D., Liu T., Ye W., Liu L., Liu P., Wu Y., Wang Y., and Dou D. 2013. Gene duplication and fragment recombination drive functional diversification of a superfamily of cytoplasmic effectors in *Phytophthora sojae*. Plos One. 8: e70036.
- Sheu Z. M., Chen J. R., Wang T. C. 2009. First report of the A2 mating type of *Phytophthora capsici* infecting peppers (*Capsicum annuum*) in Taiwan. Plant Dis. 93:548.

- Song T., Ma Z., Shen D., Li Q., Li W., Su L., Ye T., Zhang M., Wang Y., and Dou D. 2015. An oomycete CRN effector reprograms expression on plant HSP genes by targeting their promoters. *Plos One*. 11:1-30.
- Sy O., Bosland P. W., and Steiner R. 2005. Inheritance of *Phytophthora* stem blight resistance as compared to *Phytophthora* root rot and *Phytophthora* foliar blight resistance in *Capsicum annuum* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130:75-78.
- Sy O., Steiner R., and Bosland P. W. 2008. Recombinant inbred line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*. 98:867-870.
- Tian D., and Babadoost M. 2004. Host range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of isolates. *Plant Dis.* 88:485-489.
- Tyler B. M. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Mol. Plant Pathol.* 8:1-8.
- Win J., Morgan W., Bos J., Krasileva K. V., Cano L. M., Chaparro-García A., Ammar R., Staskawicz J., and Kamoun S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell*. 19:2349-2369.

Anexos

Anexo I. Preparación de medios de cultivo.

Esterilización

Todos los medios de cultivo se esterilizaron mediante el siguiente procedimiento:

Esterilizar a 121°C y 15lb/20 min. Colocar en baño María a 49°C/30 min. Vaciar en cajas Petri en campana de flujo laminar. Dejar secar durante 15-30 min.

Medio de cultivo Agar – agua.

Ingredientes para 1 L de medio:

- 15 g de agar.
- 1 L de agua destilada.

Agregar primero el agar y posteriormente el agua, esterilizar, vaciar y guardar en cuarto de cultivos a 25°C.

Medio de cultivo Agar – Harina de maíz.

Ingredientes para 1 L de medio:

- 17 g de agar harina de maíz (AHM).
- 1L de agua destilada estéril.

Agregar primero el AHM y posteriormente el agua, esterilizar, vaciar y guardar en cuarto de cultivos a 25°C.

Medio papa dextrosa agar (PDA).

Ingredientes para 1 L de medio

- 39 g de PDA.

Esterilizar, vaciar y guardar en cuarto de cultivos a 25°C.

Medio papa dextrosa agar (PDA) + ácido tartárico.

Ingredientes para 1 L de medio

- 39 g de PDA.
- 14 mL de ácido tartárico al 10%

El PDA y el ácido tartárico se preparan y esterilizan por separado, se mezclan antes de vaciar el medio en las cajas Petri.

Modo de preparación del ácido tartárico al 10%

Disuolva 1.4 g de ácido tartárico en 14 mL de agua destilada y esterilizar en un tubo Falcon de 50 mL al mismo tiempo que el PDA.

Medio de cultivo Agar - V8.

Ingredientes para 1 L de medio:

- 15 g de agar.
- 3 g de CaCO₃.
- 160 mL de Jugo V8.
- 840 mL de agua destilada.

Esterilizar, vaciar y guardar en cuarto de cultivos a 25°C.

NOTA: para el medio V8 líquido no se agrega agar, se sigue el mismo procedimiento y se almacena en tubos de ensayo de 50 mL.

Medio V8 selectivo (PARNH).

Ingredientes para 1 L de medio:

- 15 g de agar.
- 0.75 g de CaCO₃.
- 160 mL de Jugo V8.
- 840 mL de agua destilada.

Esterilizar, atemperar en baño maría y en campana de flujo laminar agregar los siguientes antibióticos y fungicidas:

- 2 mL de pentacloronitrobenzeno (PCNB).
- 2 mL de delvocid (natamicina)
- 2 mL de ampicilina.

- 2 mL de rifampicina.
- 2 mL de himexazol.

Vaciar en cajas Petri en campana de flujo laminar. Dejar secar durante 15-30 min. Guardar en cuarto de cultivos a 25°C.

NOTA: Se debe considerar el volumen de los antibióticos al momento de agregar el agua destilada al medio de cultivo, por ejemplo si se prepara 1L de medio se agregan 990 mL de agua destilada.

Cuadro 1. Protocolo de preparación de los antibióticos y fungicidas para medio selectivo.

		Para 20 mL de stock	Para 10 mL de stock
PCNB (fungicida)	0.10 g/L	1 g	0.5 g
Delvolid (fungicida)	0.02 g/L	0.4 g	0.2 g
Ampicilina (antibiótico)	0.27 g/L	2.7 g	1.35 g
Rifampicina (antibiótico)	0.01 g/L	0.1 g	0.05 g
Himexazol (fungicida)	0.075 g/L	0.75 g	0.375 g

PCNB y rifampicina son disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO), el resto en agua destilada estéril. Adicionar el DMSO en campana de extracción. Separar los antibióticos en alícuotas de 1 mL en tubos de microcentrífuga y almacenar a -20°C.

Caldo Luria Bertani (LB).

Ingredientes para 1 L de medio:

- 20 g de medio LB

Esterilizar, enfriar y almacenar a 15 °C en tubos de ensaye colocando 2 mL por tubo.

Anexo II. Artículo publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología.

<http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-1>

Fusarium wilt caused by *Fusarium solani* in chili chilaca (*Capsicum annuum*) in Michoacán

Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán

Resumen. En Queréndaro, Michoacán, México, el cultivo de chile chilaca (*Capsicum annuum*) es de importancia económica, social y cultural; sin embargo, los problemas fitosanitarios limitan su producción. En junio de 2017, se observaron plantas enfermas con síntomas de marchitez y necrosis. Con el objetivo de identificar el agente causal de la enfermedad se recolectaron secciones de 10-15 cm de tallo y raíz, se obtuvo consistentemente (30%) un aislado fúngico del género *Fusarium*. El aislado mostró abundantes clamidosporas terminales de pared lisa, macroconidios con tres a cinco septos y célula apical ligeramente curva, microconidios septados y aseptados, ovales, elipsoides y reniformes. Se realizaron pruebas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero, se inocularon 1.2×10^6 conidios/mL⁻¹ de *Fusarium* en plantas de chile chilaca de 45 días de edad. Veinte días posteriores a la inoculación, se observaron síntomas de marchitez, defoliación, clorosis, y necrosis en el tallo y la raíz. Se re-aisló al patógeno a partir de tejido vegetal enfermo y se amplificó el gen del factor de elongación 1- α . La secuencia obtenida se sometió a un análisis BLAST contra secuencias de las bases de datos de GenBank. De acuerdo con las características morfológicas y moleculares, el agente causal de la marchitez en chile chilaca de Queréndaro, Michoacán es *Fusarium solani*.

Palabras clave: necrosis del tallo, clorosis, filogenia, postulados de Koch.

Abstract. In Queréndaro, Michoacán, Mexico the chili chilaca crop (*Capsicum annuum*) had a great economic, social and culture importance, however, phytosanitary problems limit the production. In July 2017, diseased plants with wilt and necrosis symptoms were observed. With the aim to identify the causal agent of the disease, sections of 10-15 cm from stem and root were collected, and one fungus isolate from the *Fusarium* genre was consistent obtained (30%). The isolate showed abundant terminal chlamydospores with smooth wall, macroconidia with three to five septa and slightly bend apical cell, microconidia oval ellipsoids and reniform with and without septa. Pathogenicity tests carried out in a greenhouse conditions, 1.2×10^6 *Fusarium* conidia were inoculated on 45 day-old chili chilaca plants. Twenty days after the inoculation, chlorosis, wilt, necrosis on the stem and roots, were observed on the inoculated plants. The pathogen was re-isolated and the elongation factor 1- α gene was amplified. The sequence obtained was analyzed by BLAST against sequences from the GenBank. According to the morphologic and molecular characteristics, the causal agent of wilting in chili chilaca plants in Queréndaro, Mexico is *Fusarium solani*.

Keywords: stem necrosis, chlorosis, phylogeny, Koch's postulates.

Introducción

México produce anualmente un volumen mayor a tres millones de t de chile verde (*Capsicum annuum*) lo que le permite ser el principal exportador a nivel mundial (SADER, 2019). En el estado de Michoacán, en el año 2018, se produjeron más de 116 000 t de chile, cifra que lo ubicó en el séptimo lugar de producción nacional. Queréndaro destaca entre los municipios productores de chile chilaca debido a su importancia cultural al ser la sede de la “Feria del chile” que se celebra anualmente. Sin embargo, las enfermedades que se presentan en el cultivo de esta hortaliza son una limitante para la

producción. Dentro de estas, la marchitez del chile chilaca ocasiona mayores pérdidas en producción, al reducir hasta en 50% el rendimiento del cultivo, y está asociada con patógenos de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Velarde-Félix *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce con exactitud la identidad del patógeno.

Materiales y métodos

Con el objetivo de identificar al agente causal de la enfermedad, se recolectaron muestras de raíz primaria, raíces secundarias, corona y tallo de plantas sintomáticas de chile chilaca en parcelas del municipio de Queréndaro, Michoacán durante junio de 2017. Las muestras se lavaron con agua y detergente marca Roma[®], se cortaron segmentos de 0.5 cm de longitud en la zona intermedia entre el tejido sano y enfermo; éstos se desinfestaron en una solución de Cloralex[®] al 10% (0.6% de hipoclorito de sodio); se enjuagaron en agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Cinco segmentos de tejido de raíz y cinco de tallo se sembraron en cajas Petri con medio selectivo (NARPH) que contenía natamicina (0.02 g L⁻¹), ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), pentacloronitrobenzeno (0.10 g L⁻¹) e himexazol (0.075 g L⁻¹) y se almacenaron a 24°C (Soto-Plancarte *et al.*, 2017). El aislado fúngico obtenido se purificó por punta de hifa y se empleó para la caracterización morfológica y molecular; se cultivó en medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), se cortaron discos de agar con micelio de 6 mm de diámetro y se almacenaron en microtubos con agua destilada estéril a 15 °C en la Colección de Hongos del Laboratorio de Patología Vegetal de la UMSNH con el código MXMIC-798. Para la caracterización molecular, se extrajo ADN genómico utilizando un protocolo con base en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB; Sigma-Aldrich) descrito por Leslie y Summerell (2016) con modificaciones. El micelio se incubó en buffer de lisis a 65 °C durante 1 h y se usó etanol absoluto en lugar de isopropanol (2-propanol). La concentración del ADN genómico fue calculada en un espectrofotómetro (Nanodrop;

Thermo Scientific, Waltham, MA). Se amplificaron porciones parciales del gen factor de elongación de la traducción 1- α (EF).

La verificación de la patogenicidad se realizó en el invernadero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual registró una temperatura de 30 ± 8 °C. El cultivar de chile chilaca CHL1 se empleó como material vegetal. Se obtuvieron plántulas en celdas de 100 cm² de volumen empleando el sustrato Mezcla 3 (Sunshine[®]). Se aplicaron 20 mL del fertilizante universal Miracle-Gro[®] (24N-8P-16K) a cada planta cada siete días hasta la inoculación del patógeno. Las plantas se colocaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar. El aislado de *F. solani* se cultivó en medio SNA a 24 °C durante 10 días; luego se preparó una suspensión de conidios a una concentración de 1.2×10^6 conidios mL⁻¹. Doce plantas sanas de chile chilaca de 45 días de edad fueron inoculadas con 1.0 mL de la suspensión de conidios aplicando directamente en la rizósfera. Seis plantas inoculadas con agua destilada estéril se emplearon como controles negativos. El patógeno se re-aisló a partir de tejido sintomático y se corroboró la identidad mediante la amplificación de EF. Para inferir las relaciones filogenéticas se realizó un análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de *F. solani* y de especies de *Fusarium* depositadas en la base de datos del GenBank.

Resultados y discusión

Se registró una incidencia de la enfermedad del 10% en campo, los síntomas consistieron en pérdida de turgencia foliar, clorosis, necrosis de tejido de raíz, tallo y corona (Figuras 1 A y B). En las cajas de aislamiento, después de 48 h se observó crecimiento micelial en tres de los segmentos de tallo y se seleccionó un aislado fúngico. En SNA el aislado mostró características morfológicas del género *Fusarium* tales como

macroconidios de entre 22 y 33 μm de largo y 2.5 a 5.0 μm de ancho, con tres a cinco septos y célula apical ligeramente curva; microconidios de entre 6.0 y 9.5 μm de largo y 1.5 a 4.0 μm de ancho, ovales, reniformes, elipsoides, aseptados o con uno o dos septos (Figura 1D); abundantes clamidosporas de pared lisa de 6.0 a 8.0 μm de diámetro, terminales, solas o dispuestas en pares o en cadenas de tres (Figura 1E). Las características anteriores y las medidas de macro y microconidios coincidieron con la descripción de *Fusarium solani* (Leslie y Summerell, 2006; Ramdial y Rampersad, 2010; Wang *et al.*, 2014; Hans-Josef *et al.*, 2016).

La secuencia obtenida mostró 100% de identidad y cobertura con 20 cepas pertenecientes al complejo de especies de *F. solani*, y se almacenó en la base de datos del GenBank con el código de accesoión MK532475. El análisis filogenético mostró que el aislado que se obtuvo en el presente estudio se agrupó con cepas de *F. solani* (Figura 1F). En la prueba de patogenicidad, las plantas inoculadas con *F. solani* mostraron clorosis, pérdida de turgencia foliar, defoliación y necrosis en raíces y tallo 20 días después de la inoculación (Figura 1C). A partir de tejido vegetal enfermo se re-aisló al patógeno. Las plantas control no mostraron síntomas y no se aisló a *Fusarium* a partir de éstas.

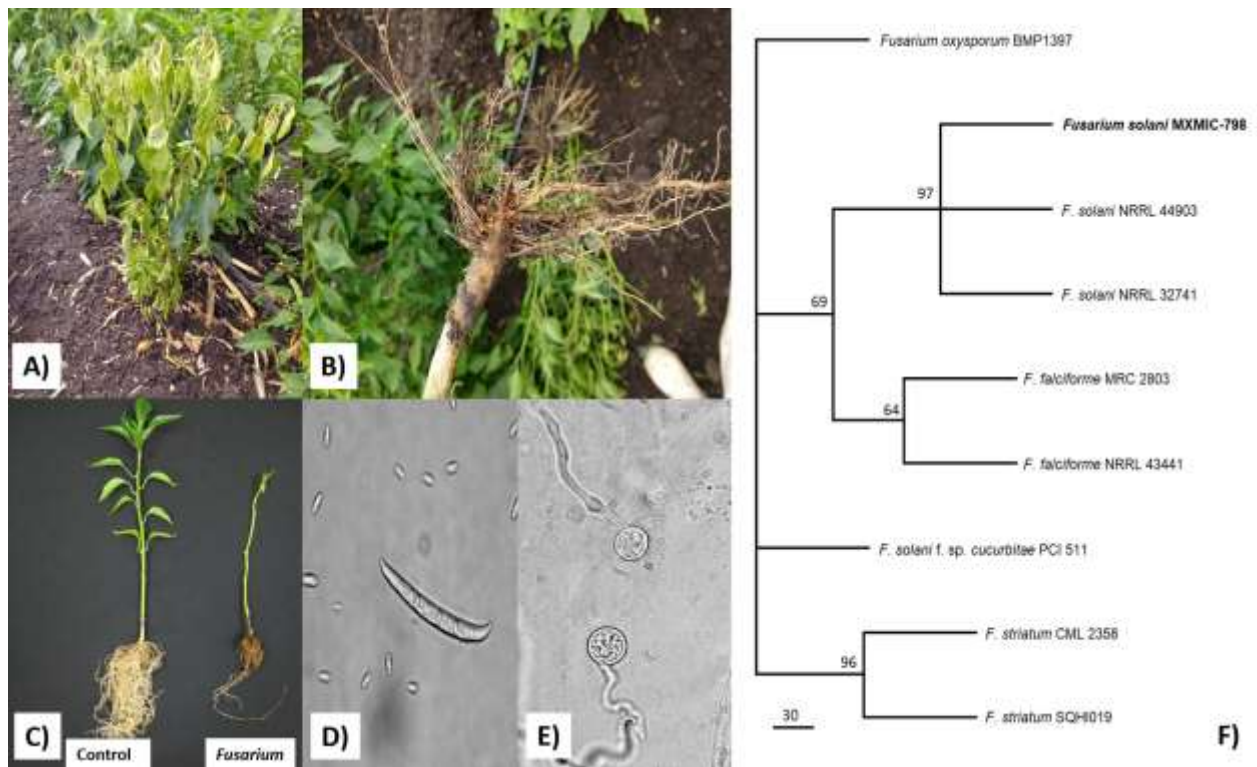


Figura 1. A) Planta de chile chilaca (*Capsicum annuum*) de tres meses de edad con síntomas de marchitez y clorosis en campo. B) Raíz y corona mostrando necrosis. C) Derecha: Planta de chile de 45 días edad inoculada con 1.2×10^6 conidios de *Fusarium solani*; izquierda: planta control. D) Macro y microconidios. E) Clamidosporas terminales. F) Relaciones filogenéticas del aislado MXMIC-798 de *Fusarium solani* y especies cercanas; *Fusarium oxysporum* se usó como grupo externo.

De acuerdo con las características morfológicas, la caracterización molecular, las pruebas de patogenicidad y el análisis filogenético, se estableció que *F. solani* es el agente causal de marchitez y necrosis en raíz y tallo de chile chilaca en Queréndaro, Michoacán, México. *Fusarium solani* se reportó como agente causal de pudrición de tallo y frutos de pimiento dulce (*C. annuum*) en Ontario, Canadá (Jarvis *et al.*, 1994) y pudrición de frutos en Trinidad y Tobago (Ramdial y Rampersad, 2010). Recientemente se reportó a *F. solani* como agente causal de la marchitez en plantas maduras de chile poblano y damping-off en plántulas en Puebla, México (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018); y a *Fusarium oxysporum* como agente causal de marchitez en plantas de pimiento en invernaderos en

Sinaloa (Velarde-Félix *et al.*, 2018). Los resultados del presente trabajo confirman que *F. solani* es un patógeno de importancia económica, ya que limita la producción de chile en México. Este es el primer reporte de este patógeno como agente causal de la marchitez del chile chilaca en Michoacán. La información del presente estudio será de utilidad para los productores locales de chile chilaca, ya que permitirá desarrollar estrategias de manejo de esta enfermedad, y disminuir la incidencia y severidad de la marchitez inducida por *Fusarium*.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado.

Literatura citada

- Jarvis WR, Khosla SK and Barrie SD. 1994. *Fusarium* stem and fruit rot of sweet pepper in Ontario greenhouses. Canadian Plant Diseases Survey 74: 131-134. http://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol74/CPDS_Vol_74_No_2_1994_OCR.pdf#page=5.
- Hans-Josef S, Samuels GJ, Zhang N, Short DPG, Juba J and Geiser DM. 2016. Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. Mycologia 108: 806-819. <https://doi.org/10.3852/15-255>.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First Edition. Blackwell Publishing, Hoboken USA, 388 p. <https://www.wiley.com/en-ca/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>.

- Ramdiel HA and Rampersad SN. 2010. First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of sweet pepper in Trinidad. Plant Disease 94: 1375. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0433>.
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-de-los-Santos G, Vaquera-Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. Mycological Progress 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.gob.mx/siap (consulta, mayo 2019).
- Soto-Plancarte A, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, López-Pérez L, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8: 1867-1880. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>.
- Velarde-Félix S, Garzón-Tiznado JA, Hernández-Verdugo S, López-Orona CA and Retes-Manjarrez JE. 2018. Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. Canadian Journal of Plant Pathology 40: 238-247. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>.
- Wang RY, Gao B, Li XH, Ma J and Chen SL. 2014. First report of *Fusarium solani* causing *Fusarium* root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in China. Plant Disease 98: 160. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0651-PDN>.

Anexo III. Productos obtenidos durante la formación doctoral

Artículos científicos

Alfredo Reyes-Tena, José C. Huguet-Tapia, Kurt H. Lamour, Erica M. Goss, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Gerardo Vázquez-Marrufo, Ricardo Santillán-Mendoza, Sylvia P. Fernández-Pavía. **Genome sequence data of six isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 32: 1267-1269. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-19-0014-A>

Alfredo Reyes-Tena, Arturo Castro-Rocha, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Gerardo Vázquez-Marrufo, Martha Elena Pedraza-Santos, Kurt Lamour, John Larsen, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. **Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico.** *Hortscience.* 54: 1526-1531. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13964-19>

Alfredo Reyes-Tena, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Ricardo Santillán-Mendoza, Marlene Díaz-Celaya, Sylvia P. Fernández-Pavía. **Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 37: 43-47. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-1

A. Reyes-Tena, R. Vallejo-González, R. Santillán-Mendoza, G. Rodríguez-Alvarado, J. Larsen, S. P. Fernández-Pavía. ***Pythium arrhenomanes* causal agent of root rot on yellow maize in Mexico.** *Australasian Plant Disease Notes.* 2018, 13:6 <https://doi.org/10.1007/s13314-018-0291-8>

Artículos de divulgación científica

Alfredo Reyes-Tena, Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Gerardo Rodríguez-Alvarado. **¿Qué son los pseudohongos?** Lectura científica 2017, nivel medio superior. Secretaría de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico de Michoacán. 2017: 22-27.

Asesoría a productores

Evaluación fitosanitaria de cultivos de chile en el Municipio de Queréndaro, Michoacán, para el diagnóstico de la marchitez causada por *Phytophthora capsici* y recomendaciones para su control. Queréndaro, Michoacán, Mexico. 30 de octubre de 2017.

Congresos y conferencias

Alfredo Reyes-Tena. Oomycetes de importancia económica. Conferencia impartida en la Semana Académica de la Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro, Michoacán, 4 y 5 de Diciembre de 2019.

Alfredo Reyes-Tena, José de Jesús Luna Ruiz, Viridiana Arreola-Romero, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. Tolerancia de chile pasilla a fenotipos de virulencia de *Phytophthora capsici*. 10° Foro académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Morelia, Michoacán, 27 y 28 de Noviembre de 2019. (Ponencia oral).

Alfredo Reyes-Tena. Oomycetes de importancia económica. Conferencia impartida dentro el ciclo de conferencias de la materia de Micología, Facultad de Biología, UMSNH, Morelia, Michoacán, 23 y 24 de Octubre de 2019.

Alfredo Reyes-Tena, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Ricardo Santillán-Mendoza, Marlene Díaz-Celaya, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile tipo pasilla (*Capsicum annuum*) en Michoacán. XXI Congreso Internacional & XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Morelia, Michoacán, 24 al 28 de Agosto de 2019. (Ponencia oral).

Alfredo Reyes-Tena, José Hugueta-Tapia, Erica M. Goss, Ricardo Santillán-Mendoza, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. Programas bioinformáticos para el ensamble de genomas de *Phytophthora capsici*. XXI Congreso Internacional & XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Morelia, Michoacán, 24 al 28 de Agosto de 2019. (Poster).

Alfredo Reyes-Tena, Marlene Díaz-Celaya, Nuria Gómez-Dorantes, Ricardo Santillán-Mendoza, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. Tizón del ejote causado por *Phytophthora capsici* en Michoacán. XXI Congreso Internacional &

XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Morelia, Michoacán, 24 al 28 de Agosto de 2019. (Poster).

Alfredo Reyes-Tena, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Martha Elena Pedraza-Santos, Gerardo Vázquez-Marrufo, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. **Caracterización de razas fisiológicas de *P. capsici***. XX Congreso Internacional y XLV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Saltillo, Coahuila, 20 al 24 de Agosto de 2018. (Poster).

Alfredo Reyes-Tena, Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Marlene Díaz-Celaya, Amelia Cristina Montoya-Martínez, Gerardo Rodríguez-Alvarado. **Tizón foliar causado por *Stemphylium* sp. y *Alternaria* sp. en cultivos de cebolla de Michoacán, México**. XX Congreso Internacional y XLV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Saltillo, Coahuila, 20 al 24 de Agosto de 2018. (Poster).

Alfredo Reyes-Tena, Alejandro Soto-Plancarte, Nuria Gómez-Dorantes, Viridiana Arreola-Romero, Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Gerardo Rodríguez-Alvarado. **Marchitez y pudrición de raíz causada por *Phytophthora capsici* en *Capsicum pubescens***. XX Congreso Internacional y XLV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Saltillo, Coahuila, 20 al 24 de Agosto de 2018. (Poster).

Alfredo Reyes-Tena, Martha Elena Pedraza-Santos, Gerardo Vázquez-Marrufo, John Larsen, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. **Determinación de razas fisiológicas de *P. capsici***. Reunión Académica 2017 del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Morelia, Michoacán, 27 y 28 de noviembre de 2017. (Ponencia oral).

Alfredo Reyes-Tena, Rebeca Vallejo-González, Ricardo Santillán-Mendoza, Gerardo Rodríguez-Alvarado, John Larsen, Sylvia Patricia Fernández-Pavía. **Nuevo agente causal de pudrición de raíz en maíz en México**. 12° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Morelia, Michoacán, 5 y 6 de octubre de 2017. (Ponencia oral).

Alfredo Reyes Tena, Alejandro Soto Plancarte, Martha E. Pedraza Santos, Gerardo Rodríguez Alvarado, Gerardo Vázquez Marrufo, John Larsen, Sylvia Patricia Fernández Pavía. **Marchitez en plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) en Michoacán causada por *Phytophthora***. IV Simposio Nacional de Herramientas en Biotecnología para una

Agricultura Sustentable, Morelia, Michoacán, 30 de noviembre al 2 de diciembre de 2016.
(Poster).

Alfredo Reyes Tena, Sylvia Patricia Fernández Pavía, Nuria Gómez Dorantes, Joshua Emmanuel Hernández Ramírez, Alejandro Soto Plancarte, Gerardo Rodríguez Alvarado.
Aislamiento y caracterización de *Phytophthora capsici* de cultivos de chile en Copándaro, Michoacán. 13ª Convención Mundial del Chile, Campeche, Campeche, 27 al 29 de octubre de 2016.