



# Congreso Internacional **Biología, Química y Agronomía**

Science and Technological Innovation:  
A Strategy for Well-Being

Ciencia e Innovación Tecnológica:  
Estrategia para el Bienestar

José Luis Zavala Aguirre  
Juan Villafaña Rojas  
Miguel J. Beltrán García  
Editores



Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara

La información compendiada en este libro digital proviene de los trabajos presentados durante el 5<sup>to</sup> Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara el cual fue celebrado del 31 de septiembre al 2 de octubre de 2015 en las instalaciones de UNICO de la misma Universidad. La información fue presentada por investigadores y grupos de trabajo especializados sobre quienes recae la responsabilidad de la validez de dichas investigaciones. Los autores, comité editorial y la casa editorial no somos responsables de las consecuencias del uso que se dé a la información presentada. La mención de productos comerciales o servicios, de ninguna manera implican compromisos o afiliaciones por parte de la Universidad Autónoma de Guadalajara. Se autoriza el uso y distribución de los contenidos, libremente proporcionados por los autores para su compilación y registro ante ISBN, para lo cual se requiere sean citados dando créditos a sus creadores. Cualquier duda o aclaración deberán ser realizadas directamente con los autores correspondientes cuyos datos de contacto están registrados en cada contribución. El comité editorial intentó unificar los formatos en base a las retroalimentaciones recibidas durante el proceso de galeras; los datos incompletos o faltas ortográficas son responsabilidad de los autores que no dieron retroalimentación.

ISBN: 978-607-719-005-9

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco, 45129. México. Primera edición: 2016

Comité Científico:

Agrobiotecnología	Dr. Miguel J. Beltrán García
Biocombustibles	Dr. Froylan Mario Espinosa Escalante
Biología de Recursos Naturales	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Biología Molecular	MC. Aurora Huerta Robles / MC Marcela de la Mora Amutio
Biología y Química del estrés oxidativo	Dr. Miguel J. Beltrán García
Biomateriales	Dr. Tito E. Herrera Larrasilla
Biorremediación	Dr. José A. Lomelí Sención
Biotecnología Alimentaria	MC. Gloria M. Macedo Raygoza / Biól. Claudia I. Cisneros Reyes
Biotecnología Clínica	MC. Araceli Escobedo Magallón
Biotecnología Farmacéutica	MC. Carlos Alberto Manuel Cabrera
Conservación de ecosistemas	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Control Biológico	Dr. David Ortiz Mendoza
Ecotoxicología	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Fermentaciones	Dr. Juan Villafañá Rojas
Fitopatología	MC. Laura Marcela Meixner Rojas
Ingeniería Química	Dr. Efrén Aguilar Garnica
Procesos Químicos	Dr. Efrén Aguilar Garnica
Q. Alimentos	Dra. Lourdes Contreras Pacheco
Q. Analítica	MC. Gloria Macedo Raygoza
Q. Bioorgánica	IQ. Ma. Lourdes Rivera Castro
Q. Clínica	MC. Araceli Escobedo Magallón
Q. Farmacéutica	MC. Carlos Alberto Manuel Cabrera
Q. Productos Naturales	IQ. Ma. Lourdes Rivera Castro
Química Agronómica	IA. Lydia Olvera Avila



## DEVELOPMENT OF A SCALE OF SEVERITY OF WILT CAUSED BY *Phytophthora capsici* L. IN POBLANO CHILI PLANTS

(Desarrollo de una escala de severidad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici* L. en plantas de chile poblano)

Alfredo Reyes-Tena<sup>a,b</sup>, Gabriel Rincón-Enríquez<sup>a</sup>, Sylvia Patricia Fernández-Pavía<sup>b</sup>, Luís López-Pérez<sup>b</sup>, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

\*Autor que presentó el trabajo.

+Autor para correspondencia: eqaguilar08@gmail.com

Área del conocimiento: Fitopatología.

### ABSTRACT

The use of virulence scales little objective and accurate proves to be an important problem when evaluating the results of bioassays on bioprotection against pathogens like *Phytophthora capsici* (PC). In order to establish a severity or virulence scale qualitative ordinal of PC in poblano chile plants, it developed an experimental design completely randomized with two treatments (with and without inoculation PC) and 25 repetitions under greenhouse conditions. When the plants had an approximate size of 15 cm and 20 sheets, 25 plants were inoculated with a suspension of zoospores of CH11 strain PC set to  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , this strain (highly pathogenic) isolated from a culture of chili in Michoacán. In the remaining 25 plants they are not inoculated PC. Every two days after inoculation of PC they were made destructive sampling of healthy and diseased plants for to register signs and disease progression. A written and photographic aerial and radical part description was made. The scale was subsequently validated with Koch's postulates, to the isolate the phytopathogen of diseased tissue and reinfected in pepper plants. A qualitative ordinal severity scale with six levels according to the severity and progression of the disease developed. The levels were: Level 0 (healthy plant), level 1 (mild wilting), Level 2 (moderate wilt), Level 3 (advanced wilt), Level 4 (very late blight) and Level 5 (severe wilting or dead plant). The objective and detailed description of the damage caused by PC shown in pepper plants, could allow the use of a better parameter to measure the severity of this disease in bioassays developed under specific experimental conditions.

Keywords: *Capsicum annuum*, pathogenicity, symptomatology, analysis of virulence.

### RESUMEN

El uso de escalas de virulencia poco objetivas y precisas resulta ser un problema importante en la evaluación de resultados de bioensayos en bioprotección contra patógenos como *Phytophthora capsici* (PC). Con el fin de establecer una escala de severidad o virulencia ordinal cualitativa de PC en plantas de chile poblano, se desarrolló un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos (con y



sin inoculación de PC) y 25 repeticiones en condiciones de invernadero. Cuando las plantas tenían un tamaño aproximado de 15 cm y 20 hojas, 25 plantas fueron inoculadas con una suspensión de zoosporas de PC cepa CH11 a una concentración de  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , esta cepa (altamente patógena) aislada de un cultivo de chile en Michoacán. En las 25 plantas restantes no se inoculó PC. Cada dos días después de la inoculación de PC se hizo un muestreo destructivo de plantas sanas y enfermas para registrar los signos y progresión de la enfermedad. Una descripción escrita y fotográfica de parte aérea y radical de la planta fue realizada. La escala fue posteriormente validada con los postulados de Koch, a partir de tejido enfermo se aisló al fitopatógeno y se reinfectó en plantas de chile. Una escala cualitativa ordinal con seis niveles fue desarrollada de acuerdo a la severidad y la progresión de la enfermedad. Los niveles fueron: nivel 0 (planta sana), nivel 1 (marchitez leve), nivel 2 (marchitez moderado), nivel 3 (marchitez avanzado), nivel 4 (marchitez muy avanzado) y nivel 5 (marchitez severa o plantas muertas). La descripción objetiva y detallada de los daños causados por PC en plantas de chile podría permitir el uso de un mejor parámetro para medir la severidad de esta enfermedad en bioensayos desarrollados en condiciones experimentales específicas.

Palabras Clave: *Capsicum annuum*, patogenicidad, sintomatología, análisis de virulencia.

## INTRODUCCIÓN

*Phytophthora capsici* L. es un oomycete fitopatógeno que provoca la principal enfermedad a nivel mundial del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) [1]. La importancia en el manejo de ésta enfermedad radica en la necesidad de generar nuevas estrategias de control sustentables, entre ellas el control biológico por medio de microorganismos antagonistas [2]. Para la evaluación de la capacidad bioprotectora de diferentes agentes o métodos de control *in planta*, es necesario realizar ensayos bajo diferentes condiciones experimentales (laboratorio, invernadero o campo) [3]. Al momento de evaluar el nivel de daño de la enfermedad por efecto de diferentes tratamientos, se requiere del uso de escalas de severidad o virulencia del fitopatógeno en la especie vegetal, así como en las condiciones experimentales específicas donde se lleva a cabo el ensayo. En la literatura se han reportado algunas escalas de severidad de *P. capsici* en plantas de chile [4; 5; 6 y 7], la mayoría emplean niveles de 0 a 5 partiendo desde planta sana hasta planta muerta. Sin embargo, algunas descripciones de la sintomatología son fuertemente subjetivas y poco precisas, lo que podría afectar su interpretación y aplicación en ensayos similares. Otro detalle importante a tomar en cuenta son las condiciones experimentales donde fueron desarrolladas (temperatura, humedad, variedad o cultivar vegetal, edad de la planta, método de inoculación y concentración de zoosporas del fitopatógeno), estos factores podrían afectar la agresividad o el tipo de síntomas mostrado por las plantas. Por lo cual, para evaluar la severidad de ésta enfermedad en un ensayo *in planta* es recomendable el desarrollo anticipado de escalas de severidad en las mismas condiciones experimentales. Con base a lo anterior, en éste trabajo se tuvo como objetivo desarrollar una escala cualitativa ordinal de severidad de la marchitez causada por *P. capsici* en plantas de chile poblano bajo condiciones de invernadero.

## METODOLOGÍA

En un invernadero tipo cenital plastificado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia Michoacán, México (latitud N  $19^{\circ}45'95''$ ; longitud W  $101^{\circ}09'16''$ ; altitud 1900 m), durante la temporada verano-2014 en condiciones naturales de luz (radiación total del 80%), temperatura (15-32°C) y humedad del 70%. Se germinaron semillas de chile poblano variedad San Luis, en charolas de aluminio con arena esterilizada ( $120^{\circ}\text{C}/15 \text{ psi} / 3\text{h}$ ). Las semillas germinaron a los 12 días después de la

siembra. Las plántulas de chile fueron trasplantadas cuando presentaban crecimiento homogéneo y dos hojas verdaderas (30 días después de la siembra) en recipientes de unicel con 500 g de sustrato (mezcla de suelo: arena, 1:1, v/v) esterilizada (120°C/ 15 psi / 3 h), las cuales constituyeron las unidades experimentales (Figura 1).



Figura 1.- Aspecto general de las unidades experimentales empleadas para la generación de la escala de severidad de la marchitez en el cultivo de chile bajo condiciones de invernadero.

Se emplearon un total de 50 unidades experimentales (UE). A los 59 días después del trasplante (DDT), 25 UE fueron inoculadas con 1 mL de una suspensión de zoosporas de la cepa CH11 de *P. capsici* (cepa muy virulenta aislada del estado de Michoacán), ajustada a una concentración de  $1 \times 10^4$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$  [5], la cual se inoculó en la base del tallo (Figura 2). Para asegurar la infección del fitopatógeno, las plantas inoculadas con *P. capsici* se inundaron durante 24 h colocando las macetas en charolas de plástico con agua. A las 25 UE restantes no se les inoculó el fitopatógeno.



Figura 2.- Inoculación de *Phytophthora capsici* ( $1 \times 10^4$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ ) en la base del tallo de plantas de chile. Nótese que las UE fueron colocadas en una charola para tratar por 24 h con saturación de agua con el fin de promover la infección del patógeno.

Cuatro días después de la inoculación con *P. capsici*, se realizó un registro fotográfico y escrito de la

sintomatología que mostraron las plantas. Se tomó en cuenta los síntomas visuales como: caída de hojas (defoliación), hojas enrolladas y marchitas, hojas cloróticas, presencia de necrosis en las raíces, necrosis en la base del tallo y de hojas; finalmente la muerte de la planta. Para lo anterior se hicieron muestreos destructivos donde se eliminaron diariamente dos plantas infectadas con *Phytophthora capsici* y dos plantas controles para comparar la severidad de la enfermedad a nivel radical en plantas sanas y enfermas. Con base en la sintomatología de la enfermedad, se propuso una escala cualitativa ordinal de severidad con seis niveles (0-5). Finalmente la escala fue validada al reaislar al fitopatógeno de tejido enfermo y re-infectarse nuevamente en plantas sanas para el cumplimiento de los postulados de Koch (Figura 3).

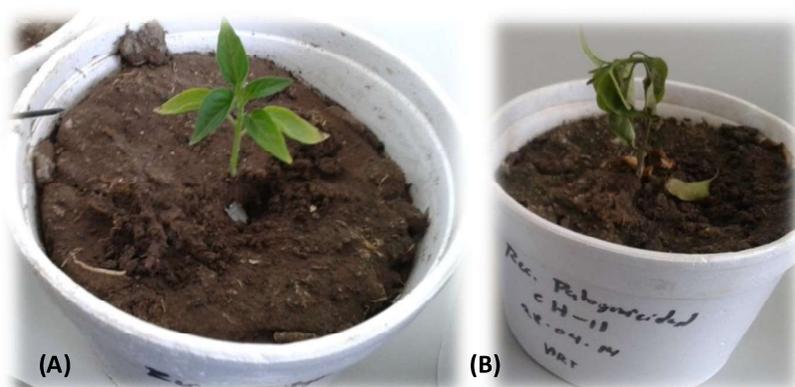


Figura 3.- Aspecto general de la pruebas para la comprobación de los postulados de Koch. (A) Re-infección de *P. capsici* en plantas sanas; (B) marchitez causada después de la re-infección.

#### RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta la escala cualitativa ordinal de severidad de la marchitez provocada por *P. capsici* que se generó de acuerdo al registro de la sintomatología en plantas de chile poblano variedad San Luis bajo condiciones de invernadero. Esta escala contempló 6 niveles partiendo desde el nivel 0 (planta sana), hasta el nivel 5 (planta muerta), en la Tabla 1 se muestra el nivel de severidad de la marchitez en planta en maceta, planta completa y el sistema radical mediante imágenes comparativas entre los diferentes niveles de daño, así como la descripción detallada de los mismos.

Tabla 1. Propuesta de escala cualitativa ordinal de severidad (virulencia) de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano variedad San Luis en invernadero.

NIVEL	DESCRIPCIÓN	PLANTA EN MACETA	PLANTA COMPLETA	SISTEMA RADICAL
0	Planta sana: hojas turgentes y de color verde intenso, tallo erguido. Sistema radical sano y abundante, no se observa necrosis en haces vasculares.			

<p><b>1</b></p>	<p>Marchitez leve: planta con hojas encorvadas, y poco turgentes. Tallo con necrosis en la zona basal, visible únicamente realizando un corte longitudinal. Necrosis en la zona basal del tallo.</p>			
<p><b>2</b></p>	<p>Marchitez moderada: planta con hojas encorvadas y poco turgentes, hasta un 20% de hojas desprendidas. Tallo con necrosis avanzada hasta un 20%. Necrosis en la zona basal las raíces secundarias y haces vasculares.</p>			
<p><b>3</b></p>	<p>Marchitez avanzada: planta con hojas encorvadas y poco turgentes, hasta un 50% de hojas desprendidas. Tallo con necrosis en hasta un 40%. Necrosis en raíces secundarias y haces vasculares hasta en un 40% de su longitud (pérdida del 30% del sistema radical). La planta puede desprenderse del sustrato con facilidad. El crecimiento se detiene.</p>			

4	<p>Marchitez muy avanzada: planta con hojas muy encorvadas, poco turgentes y con más de 50% desprendidas. Necrosis del tallo mayor a un 50% de su longitud. Sistema radical con necrosis casi en su totalidad, (pérdida del 50% del volumen radical). La epidermis de las raíces se desprende con facilidad. Se observa tejido degradado en los haces vasculares.</p>			
5	<p>Marchitez severa: planta muerta. Hojas secas con un 90 a 100% desprendidas. Tallo con necrosis casi en su totalidad, rígido. Sistema radical necrótico, raíces con epidermis desprendida (pérdida del 70% del volumen radical). Se observa tejido degradado en los haces vasculares.</p>			

#### DISCUSIÓN

La escala resultante (6 niveles) partiendo desde el nivel 0 (planta sana) hasta el nivel 5 (planta muerta) concuerda con el número de niveles descritos en los trabajos reportados en la literatura [4; 5 y 6]. Kim y colaboradores en 1989, reportaron una escala de severidad con seis niveles de *P. capsici* en plantas de pimiento bajo condiciones de invernadero donde la concentración de zoosporas por mL que emplearon fue de  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , sin embargo a diferencia de este trabajo, ellos inocularon 20 mL en el sustrato, lo cual representa una cantidad 20 veces mayor que la reportada en este estudio. Esto afectaría la velocidad de la infección y progresión de la enfermedad haciendo más difícil la distinción entre los distintos niveles evaluados. Por otro lado, Sanogo [7] emplea una escala de severidad por *P. capsici* propuesta por Ristaino [5] con modificaciones, para evaluar el daño de la enfermedad en plantas de pimiento sometidas a estrés salino. Esta escala conserva los mismos niveles de severidad que la escala propuesta por [5], sin embargo simplifica la descripción de la sintomatología únicamente a la presencia de necrosis



del tallo y el porcentaje de defoliación hasta planta muerta. Este tipo de modificaciones a escalas de severidad propuestas con anterioridad podrían permitir la estandarización a las condiciones experimentales en las que se desarrolla un ensayo, sin embargo la descripción detallada es necesaria para una evaluación con mayor precisión. Finalmente esta escala de severidad para *P. capsici* podría permitir una descripción más detallada de la sintomatología mostrada en el sistema radical de las plantas de Chile (necrosis y pérdida del volumen radical), esto debido a que por lo general las escalas descritas en la literatura se basan en la descripción de la necrosis del tallo, clorosis, necrosis en hojas y defoliación.

#### CONCLUSIONES

Se generó una escala cualitativa ordinal de severidad (virulencia) de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de Chile poblano variedad San Luis bajo condiciones de invernadero, la cual podría ser empleada en la evaluación del daño de la enfermedad en ensayos sobre el control o manejo de la enfermedad bajo estas condiciones experimentales.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Aguascalientes por el financiamiento del proyecto "Desarrollo de una tecnología para el control biológico de la marchitez del Chile por medio de actinomicetos nativos del estado de Aguascalientes" con el número de proyecto 2011-02-181930. A la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia por facilitar la cepa CH11 de *Phytophthora capsici*. Alfredo Reyes-Tena, agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría.

#### REFERENCIAS

- [1] Li, Z., Long, W., Zheng, J., Lei, J. (2007). "Isolation and identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation", *Front. Agric. China*. 1: 377-381.
- [2] Segarra, G., Avilés, M., Casanova, E., Borrero, C., Trillas, I. (2013). "Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34", *Phytopathol. Mediterr.* 52: 77-83.
- [3] Ozgonen, H., Erkilic, A. (2007). "Growth enhancement and phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper", *Crop Prot.* 26: 1682-1688.
- [4] Kim, Y.J., Hwang, B.K., Park, K.W. (1989). "Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*", *Plant Dis.* 73: 745-747.
- [5] Ristaino, J.B. (1990). "Intra-specific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina", *J. Phytopathol.* 80: 1253-1259.
- [6] Kook-Lee, B., Seok-Kim, B., Wong-Chang, S., Kook-Wang, B. (2001). "Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pepper", *Plant Dis.* 85: 497-500.
- [7] Sanogo, S. (2004). "Response of Chile pepper to *Phytophthora capsici* in relation to soil salinity", *Plant Dis.* 88: 205-209.