

Response of *Capsicum pubescens* genotypes to damage caused by the fungal wilt complex

Respuesta de genotipos de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez

Alma Janeth Vallejo-Gutiérrez, Jaime Mejía-Carranza*, Rómulo García-Velasco, Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 1.5. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Tenancingo Estado de México, C.P. 52400, México; Marithza Guadalupe Ramírez-Gerardo, División de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero, Carretera Federal México-Ixtapan de la Sal km 64.5. La Finca, Villa Guerrero, Estado de México. C.P. 51760, México.
*Autor de correspondencia: jmejia@uaemex.mx

Recibido: 27 de Septiembre, 2018.

Aceptado: 19 de Noviembre, 2018.

Vallejo-Gutiérrez AJ, Mejía-Carranza J, García Velasco R and Ramírez-Gerardo MG. 2019. Response of *Capsicum pubescens* genotypes to damage caused by the fungal wilt complex. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 50-70.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1809-3

Primera publicación DOI: 15 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 15, 2018.

Resumen. En el sur del Estado de México el chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es un cultivo económicamente importante, sin embargo, es afectado por la “marchitez”, enfermedad de raíz que provoca la muerte de la planta. El objetivo fue identificar los organismos asociados y evaluar la variación en respuesta al daño de la marchitez en 16 genotipos (M1-M16) de chile manzano. Se sembraron segmentos de plantas infectadas en medio de cultivo PDA y 3P y se identificaron morfológica

Abstract. In the south of the State of Mexico the manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.) is an economically important crop, but is affected by the “wilt disease”, a root disease that causes the death of the plant. The objective was to identify the associated organisms and evaluate the variation in response to the damage of wilt using 16 genotypes (M1-M16) of manzano pepper. Segments of infected plants were sown in PDA and 3P culture medium. The associated organisms were morphologically and molecularly identified. To evaluate the pathogen-genotype interaction, associated organisms were inoculated alone and their combinations in *C. pubescens*. *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*, were identified as the main cause of wilt, in which there were differences in severity and incidence between colonies of *F. oxysporum* ($P \leq 0.01$), and *P. capsici* ($P \leq 0.05$). There were significant differences ($P \leq 0.01$) in pathogenicity between *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, and

y molecularmente a los organismos asociados. Para la interacción patógeno-genotipo, se inocularon los organismos asociados solos y sus combinaciones en *C. pubescens*. Se identificaron a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* como responsables de la marchitez, en los que hubo diferencias en severidad e incidencia entre colonias de *F. oxysporum* ($P \leq 0.01$), y de *P. capsici* ($P \leq 0.05$). Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en patogenicidad entre *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*, y combinaciones entre estos. Se observó variación en la resistencia a la marchitez, donde M8 fue el genotipo que presentó resistencia a *F. oxysporum* y *R. solani*, y M9 tolerancia a *F. oxysporum*. Éstos pueden ser aprovechados en el mejoramiento genético para desarrollo de genotipos resistentes.

Palabras clave: chile manzano, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*.

El género *Capsicum*, que incluye a los chiles dulces y picantes, son verduras y especias cultivadas y consumidas en todo el mundo (Carrizo *et al.*, 2016). De acuerdo a USDA-ARS (2011), el género *Capsicum* cuenta con 38 especies, de las cuales *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* y *Capsicum baccatum* son cultivadas. De las cinco especies *C. annuum* y *C. frutescens* fueron domesticados en Mesoamérica y *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* en América del Sur (Pickersgill, 2007). El chile en México, por su tradición e historia es un cultivo importante, en 2016 alcanzó 2.3 mill/t, con un valor que rebasa los 22 mil 500 millones de pesos (SAGARPA, 2017). En la diversidad de chiles que se cultivan en el territorio nacional, el chile manzano (*C. pubescens*) ha cobrado mayor importancia en la última década y de acuerdo con

combinaciones among them. Variation in resistance to wilt was observed, where M8 was the genotype that showed resistance to *F. oxysporum* and *R. solani*, and M9 tolerance to *F. oxysporum*. These can be used in breeding for the development of resistant genotypes.

Key words: Manzano pepper, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*.

The *Capsicum* genus, which includes sweet and hot chilies, are vegetables and spices cultivated and consumed worldwide (Carrizo *et al.*, 2016). According to USDA-ARS (2011), the genus *Capsicum* has 38 species, from which the most grown are *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* and *Capsicum baccatum*. From the five species, *C. annuum* and *C. frutescens* were domesticated in Mesoamerica, and *C. chinense*, *C. baccatum* and *C. pubescens* in South America (Pickersgill, 2007). Traditionally and historically, chili is an important crop in Mexico, whose production in 2016 was of 2.3 million tons valued at more than 22,500 million Mexican pesos (SAGARPA, 2017). Among the diversity of chili species cultivated in Mexico, the importance of manzano pepper (*C. pubescens*) increased in the last decade, and according to SAGARPA (2018), 4,221.83 tons are intended only for export to the United States, 86.3% of which are produced in the southern zone of the State of Mexico. Manzano pepper cultivation is intensive in that region. However, manzano pepper has agronomic production limitations, such as wilt susceptibility, a disease that causes root damage and death in manzano pepper plants. This disease, which is considered the most destructive worldwide (Zhang *et al.*, 2013), was first detected in *C. annuum* by Leonian (1922), who identified

SAGARPA (2018), 4,221.83 t están destinadas solo para exportación a los Estados Unidos, de las cuales el 86.3 % es producido en el sur del Estado de México. En esta región el cultivo de chile manzano es intensivo. Sin embargo, tiene limitaciones agroeconómicas en la producción, como la susceptibilidad a la “marchitez”, enfermedad que daña a la raíz y causa la muerte de la planta. Esta enfermedad considerada como una de las más destructivas en todo el mundo (Zhang *et al.*, 2013), fue reportada por primera vez en *C. annuum* por Leonian (1922), quien identificó a *Phytophthora capsici* como su agente causal. Los organismos asociados pueden afectar al cultivo en cualquier etapa de desarrollo, causan la pérdida de turgencia en la planta y su muerte posterior (Kousik *et al.*, 2012). Para *C. annuum* en México, se han reportado como agentes causales de la marchitez, además de *P. capsici*, a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Uc-Arguelles *et al.*, 2017).

De acuerdo con González-Pérez *et al.* (2014), *C. pubescens* cuenta con una baja diversidad genética como consecuencia de un efecto fundador durante su domesticación que lo hace una especie menos polimórfica. Aun así, en la zona sur del Estado de México, con un variado número de nichos ecológicos, se cultivan diferentes genotipos de *C. pubescens*, que representan considerable variación dentro de la especie y por lo tanto, un valioso reservorio de germoplasma que pudiera ser de utilidad en el mejoramiento de esta especie (Arias *et al.*, 2017), no solo para aspectos morfológicos sino también en la resistencia a enfermedades. Con la presencia de variación natural, algunos individuos de la población pueden expresar ciertas características con mayor o menor grado que otros, las cuales pueden dar al individuo ciertas ventajas ligadas a su ciclo de vida. Estos individuos pueden variar en la producción de frutos, tanto en número como en tamaño, color, textura, sabor, maduración, apariencia

Phytophthora capsici as the causal agent. The associated organisms affect the crop at any development stage, cause loss of turgidity and the subsequent death of plants (Kousik *et al.*, 2012). Besides *P. capsici*, in Mexico, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* have been reported as causal agents of wilt in *C. annuum* (Uc-Arguelles *et al.*, 2017).

According to González-Pérez *et al.* (2014), *C. pubescens* has low genetic diversity as a result of a founder effect during its domestication that makes it a less polymorphic species. However, in the southern zone of the State of Mexico, with a varied number of ecologic niches, different genotypes of *C. pubescens* are cultivated, which represents a considerable variation within the species and, therefore, a valuable germplasm reservoir that could be used to improve not only the morphological traits but also the disease resistance of this species (Arias *et al.*, 2017). With the existing natural variation, some individuals from a population can express certain characteristics with a higher or lesser degree than others, and this can give the individual certain advantages linked to their life cycle. Fruits produced by those individuals may vary both in number and size, color, texture, taste, maturity, appearance and quality, as well as plant's architecture and ability to resist abiotic or biotic stresses (Schubert *et al.*, 2009). Due to these factors, the variation in the reproduction of *C. pubescens* genotypes, during which some individuals may have a higher number of offspring than those of others, would mean that there is an increase in the frequency of their genetic material compared to others (Nora *et al.*, 2011).

The genetic diversity within species is the main reason why a determined species evolves under changing environmental conditions and selection pressures. Knowing the genetic diversity is key in order to diversify germplasm sources, try to minimize genetic vulnerability risks and increase

y la calidad, así como la arquitectura de la planta y su capacidad de resistir estrés abiótico o biótico (Schubert *et al.*, 2009). Debido a estos factores, la variación en la reproducción de genotipos de *C. pubescens*, en la que algunos pudieran tener mayor cantidad de descendientes que otros, implicaría un incremento en la frecuencia de su material genético con respecto a los demás (Nora *et al.*, 2011).

La diversidad genética dentro de las especies es la razón principal por la que una determinada especie tenga la oportunidad de evolucionar bajo condiciones cambiantes del ambiente y presiones de selección. Asimismo, el conocimiento de la diversidad genética es indispensable para diversificar las fuentes de germoplasma, tratar de minimizar los riesgos de vulnerabilidad genética e incrementar las probabilidades de detectar alelos favorables (Ruíz *et al.*, 2016). El Centro Universitario UAEM Tenancingo cuenta con 16 genotipos colectados en el sur del Estado de México, de los cuales, 15 presentan variabilidad morfológica y caracteres únicos de interés genético y comercial (Martínez, 2016). Con la finalidad de aprovechar los genotipos de *C. pubescens* que forman parte de la colección de germoplasma del CU Tenancingo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de 16 genotipos de chile manzano al complejo fúngico de microorganismos asociados de la marchitez del chile en el Estado de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado a 18° 58' 05.53" N y 99° 36' 50.51" O, a una altitud de 2068 msnm. En 2016, en el sur del Estado de México se colectaron plantas de chile manzano con síntomas de marchitez en las localidades siguientes: 5 en Ahuacatitlán, Ixtapan de la

the probabilities of detecting favorable alleles (Ruíz *et al.*, 2016). The University Center of the Autonomous University of Mexico State (UAEM for its acronym in Spanish) in Tenancingo has 16 genotypes that were collected in the southern zone of the State of Mexico, 15 of which represent morphological variability and have unique traits that are genetically and commercially important (Martínez, 2016). To make the most of the *C. pubescens* genotypes that are part of the collection of the UC-Tenancingo, the objective of the present study was to evaluate the response of 16 manzano pepper genotypes to the fungal complex of microorganisms associated with chili wilt in the State of Mexico.

MATERIALS AND METHODS

The research was conducted at UAEM's University Center in Tenancingo, located at 18° 58' 05.53" N and 99° 36' 50.51" W, 2068 masl. In 2016, manzano pepper plants showing wilt symptoms were collected at the following locations of the southern zone of the State of Mexico: 5 in Ahuacatitlán, Ixtapan de la Sal; 5 in El Zarco, Tenancingo; 3 in Santa Ana, Tenancingo; 4 in Tepoxtepec, Tenancingo; 3 in Matlazinca, Villa Guerrero; 4 in San Miguel, Ixtapan de la Sal; 5 in El Potrero, Coatepec Harinas; 5 in Ixtlahuaca, Coatepec Harinas; 3 in San Nicolás, Tenancingo; and 4 in Las Cabañas, Tenancingo. The collection sites were classified according to their cropping intensity (IC) that was defined based on the cultivated area: low: up to 3 ha; intermediate: 3.1-8.0 ha; high: more than 8.1 ha. Samples wrapped with wet brown paper were placed in transparent plastic bags and transported in a cooler to the laboratory, where were kept at 4 °C until the next day, when they were used.

Sal; 5 en El Zarco, Tenancingo; 3 en Santa Ana, Tenancingo; 4 en Tepoxtepec, Tenancingo; 3 en Matlazinca, Villa Guerrero; 4 en San Miguel, Ixtapan de la Sal; 5 en El Potrero, Coatepec Harinas; 5 en Ixtlahuaca, Coatepec Harinas; 3 en San Nicolás, Tenancingo; y, 4 en Las Cabañas, Tenancingo. Los sitios de colecta se clasificaron con base en la Intensidad de Cultivo (IC) definida por la superficie cultivada en: Baja, hasta 3 ha; media, de 3.1 a 8.0 ha; y alta, más de 8.1 ha. Las muestras envueltas en papel de estraza húmedo se guardaron en bolsas de plástico transparente y fueron transportadas en hielera al laboratorio, donde se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para su utilización al siguiente día.

Aislamiento de los organismos asociados. De 41 plantas colectadas en los 10 sitios muestreados, de cada una se obtuvieron ocho segmentos de raíz y ocho de tallo, que en total sumaron 656 muestras. Las muestras se desinfectaron y para hongos se sembraron de acuerdo a López (1984) en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA); para oomicetos se sembraron en 20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimaricina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L⁻¹ de ampicilina en agua destilada, de acuerdo a López *et al.*, (2009), modificado de Kannwischer and Mitchell (1978). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 24 °C bajo oscuridad. Las siembras se revisaron cada 24 h para observar el crecimiento y desarrollo del hongo. Una vez crecidos los hongos y el oomiceto, se hicieron transferencias sucesivas hasta la obtención de cultivos puros, de los que se hicieron cultivos monospóricos y de punta de hifa. Las colonias se preservaron en tubos con PDA cubierto con aceite mineral estéril.

Identificación morfológica de los organismos asociados. Los organismos asociados se identificaron

Isolation of the associated organisms. Eight segments of root and eight segments of stem were taken from each of the 41 plants collected in the 10 sampled sites, with a total of 656 samples. The samples were disinfected; for fungi, the samples were placed in Petri dishes containing a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, according to the method of López (1984); oomycetes were cultivated in 20 g of maize flour, 18 g of agar-agar, 0.8 mL of pimaricin, 0.02 g of rifamycin and 0.25 g L⁻¹ of ampicillin diluted in distilled water, according to the method of López *et al.*, (2009), modified from Kannwischer and Mitchell (1978). The cultures were incubated at 24 °C in darkness and monitored every 24 h to observe fungus growth and development. When fungi and oomycetes had grown, successive transfers were made to obtain pure cultures and then prepare monosporic and hyphal tip cultures. The colonies were kept in tubes containing a PDA culture medium covered with sterile mineral oil.

Morphological identification of the associated organisms. The associated organisms were identified using taxonomic keys for fungi and oomycetes. The keys of Booth (1971) and Leslie and Summerell (2006) were used to characterize fungi micronidia and macronidia size and shape, and to describe chlamydospores, which are an important structure for identification; and the keys of Singleton *et al.* (1992) and Watanabe (2002) to characterize sclerotia, ramification angles and mycelium. The keys of Erwin and Ribeiro (1996) and Gallegly and Hong (2008) were used to identify oomycetes colony growth, type of mycelium, and sporangia and chlamydospores shape.

Molecular identification of the associated organisms. DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method

por claves taxonómicas para hongos y oomicetos. Para hongos, se utilizaron las claves de Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006), para caracterizar el tamaño y la forma de micro y macroconidios, así como descripción de clamidosporas, estructuras importantes para la identificación; y las claves de Singleton *et al.* (1992) y Watanabe (2002), para la caracterización de esclerocios, ángulos de ramificación, así como micelio. Para oomicetos, se usaron las claves de Erwin y Ribeiro (1996) y Gallegly y Hong (2008), en la identificación de crecimiento de la colonia, tipo de micelio, forma de esporangios y clamidosporas.

Identificación molecular de organismos asociados. La extracción del ADN se hizo por el método (CTAB) y acetato de sodio. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos y oomicetos con los iniciadores ITS-1 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (White *et al.*, 1990); los cuales amplifican fragmentos de entre 500 y 900 pares de bases (pb). La mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL fue de 10 µL de agua ultrapura, 12 µL de MyTaq Mix® (Bioline), 1 µL de Primer F, 1 µL de Primer R y 1 µL de ADN. El programa térmico fue de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 s, respectivamente y una extensión final a 72 °C por 5 min para oomicetos. Para hongos fue de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-60-72 °C durante 30-30-60 s, respectivamente y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en TBE con geles de agarosa al 1.2 %.

Secuenciación. Productos de PCR se purificaron con el Kit EZ-10 Spin Column Handbook (Bio Basic Canada Inc.) y se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la FES- Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

and sodium acetate. Universal PCR reactions were performed for fungi and oomycetes using the ITS-1 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' and ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' primers (White *et al.*, 1990) that amplify fragments of 500-900 base pairs (bp). The reaction mixture in a final volume of 25 µL was made from a mixture of 10 µL of ultrapure water, 12 µL of MyTaq Mix® (Bioline), 1 µL of F primer, 1 µL of R primer and 1 µL of DNA. For oomycetes, the thermal program was set at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94-55-72 °C for 30-30-60 s, respectively, and one final extension at 72 °C for 5 min. For fungi, the thermal program was set at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94-60-72 °C for 30-30-60 s, respectively, and one final extension at 72 °C for 5 min. The amplified products from the PCR reactions were separated by electrophoresis using tris-borate-EDTA (TBE) and 1.2% agarose gels.

Sequencing. The PCR amplified fragments were purified using the EZ-10 Spin Column Handbook kit (Bio Basic Canada, Inc.) and then sequenced in the Molecular Biology Laboratory of FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The sequences in FASTA format (Chromas 2.6.5 version) were aligned with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank database for consensus and identity –BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (available at <https://www.yeastgenome.org/blast-fungal>).

Pathogenicity *in vitro*. Pathogenicity was evaluated on *C. pubescens* M3 genotype, the most cultivated material in the study region. Seeds were disinfested and inoculated following the method of Apodaca-Sánchez *et al.* (2001), and then placed in Petri dishes containing an agar-water culture medium. Each strain obtained from the monosporic and

Las secuencias en formato FASTA (Chromas versión 2.6.5) se alinearon para consenso e identidad con la base de datos del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) – BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (disponible en <https://www.yeastgenome.org/blast-fungal>).

Patogenicidad *in vitro*. La patogenicidad se evaluó en el genotipo M3 de *C. pubescens*, material más cultivado en la región. Las semillas se desinfectaron e inocularon de acuerdo a Apodaca-Sánchez *et al.* (2001) y después se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar-agua. Cada cepa obtenida de cultivo monospórico y de punta de hifa, fue considerada un tratamiento, con 5 repeticiones de 10 semillas cada una. El testigo fue semilla desinfectada y sumergida en agua destilada estéril. Se evaluó la patogenicidad mediante la incidencia y la severidad medidas a los 10 días de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012), y se registraron los síntomas de radícula e hipocótilo. La incidencia se determinó por el porcentaje de plántulas con manifestación de la enfermedad. La severidad se midió por la longitud de la lesión a lo largo de la plántula expresada en porcentaje. Los valores obtenidos se promediaron dentro de cada unidad experimental. La relación entre incidencia y severidad se calculó por proporción mediante el cociente severidad/incidencia (Segura *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

Interacción en infecciones múltiples. Semillas desinfectadas del genotipo M3, se sembraron en un tubo de ensayo con agar-agua, se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y al germinar se establecieron a 12 h de luz y 12 de oscuridad a 25 °C. A los siete días de germinadas las semillas se inocularon de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012). Se aplicaron 100 µL de una suspensión de esporas 1×10^6

hyphal tip cultures was considered as a treatment of 5 repetitions with 10 seeds each. Disinfested seed immersed in sterile distilled water was used as control. The pathogenicity was evaluated using the incidence and severity levels measured at day 10, according to Herrera and Laurentin (2012), and radicle and hypocotyl symptoms were recorded. The incidence was determined using the percentage of seedlings showing disease symptoms. The severity was measured using the lesion length along the seedling and expressed as percentage. The obtained values were averaged within each experiment unit. The ratio between incidence and severity was calculated proportionally using the severity/incidence quotient (Segura *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

Interaction in multiple infections. Disinfested seeds of the M3 genotype were placed in a test tube containing an agar-water medium, kept in darkness at 25 °C, and, when germinated, at intervals of 12 h light and 12 h darkness at 25 °C. At day 7, the seeds were inoculated following the method of Herrera and Laurentin (2012). A 100 µL of 1×10^6 spore suspension and 100 µL of monosporic and hyphal tip culture of the associated organisms, alone and combined, were applied to seven treatments with 10 replications each: *P. capsici* (P); *P. capsici* plus *R. solani* (P+R); *F. oxysporum* plus *P. capsici* (F+P); *F. oxysporum* plus *P. capsici* plus *R. solani* (F+P+R); *F. oxysporum* (F); and *R. solani* (R). The treatments were incubated at intervals of 12 h light and 12 h darkness at 25 °C and monitored every 24 h to evaluate the disease severity, which was determined by lesion length/seedling length x 100.

Pathogens-genotype interaction. *C. pubescens* M1-M16 genotypes collected at different sites of the southern zone of the State of Mexico were used because they are morphologically contrasting

y 100 µL de cultivo monospórico y de punta de hifa de los organismos asociados en forma individual y sus combinaciones en siete tratamientos con 10 repeticiones cada uno: *P. capsici* (P); *P. capsici* más *R. solani* (P+R); *F. oxysporum* más *P. capsici* (F+P); *F. oxysporum* más *P. capsici* más *R. solani* (F+P+R); *F. oxysporum* (F); y *R. solani* (R). Se incubaron a 12 horas de luz y 12 de oscuridad a 25 °C y se observaron cada 24 h para evaluar la severidad determinada por (longitud de la lesión/longitud de la plántula) x 100.

Interacción patógenos-genotipo. Se emplearon los genotipos de *C. pubescens* M1 a M16, materiales morfológicamente contrastantes a diferentes caracteres como flor y fruto, colectados en diferentes localidades de la región sur del Estado de México (Martínez, 2016). Plántulas con cuatro hojas verdaderas se inocularon con los patógenos identificados solos y combinados de acuerdo a los siguientes tratamientos (T): *F. oxysporum* (T1); *P. capsici* (T2); *R. solani* (T3); *F. oxysporum* + *P. capsici* (T4) y *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* (T5). El método de inoculación utilizado fue el descrito por Martínez *et al.* (1996). Las plantas inoculadas fueron trasplantadas en vasos de poliestireno de un litro, con sustrato de una mezcla desinfectada de turba y agrolita en proporción de 2:1 respectivamente, y con cinco repeticiones por tratamiento. La severidad de la enfermedad se midió por el porcentaje de daño en hipocótilo y raíz de la plántula según la escala 1-9, desarrollada en el CIAT (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). Los datos se transformaron logarítmicamente para obtener el modelo lineal general utilizando el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza, los tratamientos se compararon mediante la prueba de Duncan ($p=0.05$), con el empleo de InfoStat.

with different traits such as flower and fruit (Martínez, 2016). Seedlings with four true leaves were inoculated with the identified pathogens, alone and combined, according to the following treatments (T): *F. oxysporum* (T1); *P. capsici* (T2); *R. solani* (T3); *F. oxysporum* + *P. capsici* (T4) and *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* (T5). The inoculation method used was that described by Martínez *et al.* (1996). The plants inoculated were transplanted to 1-liter polystyrene cups containing peat and expanded mineral perlite (agrolita) at a 2:1 ratio, respectively, with five replications per treatment each. The disease severity was measured by the percentage of the seedling's hypocotyl and root using a 1-9 scale developed at CIAT (Abawi and Pastor-Corrales, 1990). Data were logarithmically converted to obtain a general linear model using the InfoStat statistical software (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Statistical analysis. The data obtained were subjected to an analysis of variance and the treatments were compared using Duncan's test ($p=0.05$) and the InfoStat program.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of the associated organisms. *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani* (Table 1) were isolated from samples collected at the study sites. *F. oxysporum* was constantly found in all the sites (9/10), while *P. capsici* was found only in sites with intermediate and high cropping intensity (Table 1). The presence of *R. solani* in one sampled site suggests a limited participation in wilt damage. The three associated organisms were isolated at one site, and this indicates that the pathogen may individually or collectively affect the host. These results coincide with those reported by Anaya-López *et al.* (2011),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organismos asociados aislados. De las localidades muestreadas se aisló a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* (Cuadro 1). *Fusarium oxysporum* fue constante casi en todas las localidades (9/10), mientras que la presencia de *P. capsici* se limitó a las localidades con intensidad de cultivo media y alta (Cuadro 1). La presencia de *R. solani* en solo un sitio de muestreo sugiere limitada participación en el daño por marchitez. Solo en una localidad se aislaron los tres organismos asociados, lo que denota la participación individual o colectiva en el ataque al huésped. Los resultados coinciden con lo reportado por Anaya-López *et al.* (2011), quienes mencionaron a *F. oxysporum* como el más común y en segundo turno a *R. solani* en cultivo de *C. annuum*. De acuerdo a Nelson *et al.* (1983), la variación en las frecuencias de estos organismos asociados como responsables de la marchitez se ve afectada por diversos factores, donde las condiciones climáticas son determinantes.

who mentioned *F. oxysporum* as the most common pathogen, followed by *R. solani* in *C. annuum* crops. According to Nelson *et al.* (1983), the frequency variation of the associated organisms that cause wilt is affected by diverse factors, among which climate conditions are crucial. Compared to the other communities, the climate at El Potrero, the site where the three associated organisms were found, is warmer and rainy, and favors the development of the associated organisms. On the other hand, the crop systems, the use of fungicides and the genotype of the same crop itself, are decisive factors that favor the presence and survival of the organisms associated with the fungal complex (Guigón-López *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 2015). The crop's phenological stage at which samples are collected could influence the presence of the fungal complex, as has been observed in the case of *C. annuum* seedling stage (Vásquez *et al.*, 2009).

Morphological description of the associated microorganisms identified. *Fusarium oxysporum*

Cuadro 1. Organismos aislados en cultivo de *C. pubescens* en localidades de tres municipios del sur del Estado de México.

Table 1. Isolated organisms from *C. pubescens* crops at three municipalities in the southern zone of the State of Mexico.

Localidad Zona	IC ^z	Microorganismo fitopatógeno			Muestras procesadas ^y
		<i>F.oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>R. solani</i>	
Ahuacatitlan	Baja	X			75
El Zarco	Media	X	X		75
Santa Ana	Baja	X			45
Tepoxtepec	Baja	X			60
Matlazinca	Media	X	X		45
San Miguel	Media	X	X		60
El Potrero	Alta	X	X	X	75
Ixtlahuaca	Alta	X	X		75
San Nicolás	Baja	X			45
Las Cabañas	Media		X		60
Total					656

^zIntensidad de cultivo; ^ysegmentos de tallo y raíz / ^zCropping intensity; ^ystem and root segments.

El Potrero, comunidad en la que se encontraron los tres organismos asociados, a diferencia de las otras comunidades presenta un clima más cálido y lluvioso lo que favorece el desarrollo de los organismos asociados. Por otra parte, los sistemas de producción, la utilización de fungicidas y el genotipo mismo del cultivo son determinantes para la presencia y sobrevivencia de los organismos asociados al complejo fúngico (Guigón-López *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 2015). Es posible que la etapa fenológica del cultivo al momento de la colecta influya en la presencia del complejo fúngico, como se ha marcado para la etapa de plántula en *C. annuum* (Vásquez *et al.*, 2009).

Descripción morfológica de microorganismos asociados identificados. *Fusarium oxysporum* presentó micelio aéreo y abundante con un hábito de crecimiento radial y pigmentación naranja. Micelio hialino y septado, microconidios de forma ovalada, de tamaño promedio 8.6 x 4.3 µm con 0 ó 1 septo, abundantes en falsas cabezas y en monofialides; macroconidios en menor cantidad, con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie de tres a cuatro septos, de tamaño promedio 23.8 x 4.2 µm. También se observaron clamidosporas abundantes, terminales o intercalares en la hifa (Figura 1).

Rhizoctonia solani presentó micelio con coloración blanca los primeros cuatro días, a partir del quinto día el micelio se tornó café y mostró la presencia de esclerocios. Microscópicamente se logró observar ramificación próxima al septo distal en células vegetativas jóvenes, ángulo de 90°, estrechamiento de hifa y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro (Figura 1).

Phytophthora capsici presentó micelio color blanco, crecimiento arrosetado en medio de cultivo

desarrolló abundante micelio aéreo, hialino y septado, con hábito de crecimiento radial y pigmentación naranja, microconidios de forma ovalada, de tamaño promedio 8.6 x 4.3 µm con 0 ó 1 septo, abundantes en falsas cabezas y en monofialides, a menor número de macroconidios con célula apical atenuada y célula basal en forma de pie de tres a cuatro septos, de tamaño promedio 23.8 x 4.2 µm, así como abundante micelio intercalary y clamidosporas terminales e intercalares en las hifas (Figura 1).

Los primeros cuatro días, *Rhizoctonia solani* desarrolló micelio blanco en color, que se volvió café al quinto día, y esclerocios. Observaciones microscópicas mostraron células vegetativas jóvenes con ramificación próxima al septo distal, ángulo de 90°, hifas estrechas y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro (Figura 1).

Phytophthora capsici desarrolló micelio blanco en color, crecimiento arrosetado en medio de cultivo, hialino y coenocítico. Observaciones microscópicas mostraron células vegetativas jóvenes con ramificación próxima al septo distal, ángulo de 90°, hifas estrechas y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro (Figura 1).

Diferentes autores (Lozano *et al.*, 2015) han reportado los organismos asociados como los agentes causales de la marchitez en *C. annuum*. Estos organismos han sido encontrados en el norte y centro de México (Anaya-López, 2011). Sin embargo, en el caso de *C. pubescens*, incluso cuando los tres organismos asociados han sido encontrados, la presencia de *P. capsici* está asociada con una intensidad intermedia y alta de poda en la zona de producción del Estado de México (Tabla 1).

Identificación molecular de los organismos asociados. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los tres organismos asociados confirmaron la identidad del patógeno, que ya había sido previamente establecida morfológicamente. Los fragmentos



Figura 1. Organismos asociados causales de la marchitez de *C. pubescens*. 1. *F. oxysporum* a) Microconidios, b) Micelio hialino, c) Micelio septado. 2. *R. solani* a) Septo cercano al punto de origen a la ramificación hifal, b) Micelio grueso y septado, c) Angulo de 90°. 3. *P. capsici* a) Esporangios, b) Micelio hialino y toruloso.
Figure 1. Associated organisms that caused wilt in *C. pubescens*. 1. *F. oxysporum* a) microconidia, b) hyaline mycelium, c) septate mycelium. 2. *R. solani* a) septa close to the point of origin to the hyphal ramification, b) thick and septate mycelium, c) 90° angle. 3. *P. capsici* a) sporangia, b) hyaline and torulose mycelium.

PDA, micelio cenocítico, hialino y toruloso; esporangios ovoides de forma alimonada y poco papilados de 11 a 54 μm de largo y 9 a 36 μm de ancho, clamidosporas intercalares de 9.5 μm de diámetro (Figura 1).

Dichos organismos asociados han sido reportados en *C. annuum* como responsables de la marchitez por diferentes autores (Lozano *et al.*, 2015). Éstos se han encontrado en el Norte y Centro de México (Anaya-López, 2011). Sin embargo para el caso de *C. pubescens*, aun cuando se encuentran los tres organismos asociados, la presencia de *P. capsici* se ve relacionada a la media y alta intensidad del cultivo en la zona productora del Estado de México (Cuadro 1).

Identificación molecular de los organismos asociados. La amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de los tres organismos asociados confirmó la identidad, previamente establecida morfológicamente. El fragmento amplificado de *F. oxysporum* mostró peso molecular de 900 pares de bases (pb), mientras que *P. capsici* y *R. solani* mostraron un peso aproximado de 650 pb (Figura 2).

Los fragmentos secuenciados de la cepa de *F. oxysporum* se alinearon con la secuencia de *F.*

fragment of *F. oxysporum* had a molecular weight of 900 base pairs (bp), and *P. capsici* and *R. solani* had an approximate weight of 650 bp (Figure 2).

The sequenced fragments of the *F. oxysporum* strain were aligned with the *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sequence (accession CM000593.1), and the consensus showed 88% identity with fragments from the region 248-270. The sequenced fragments of the *P. capsici* strain were aligned with the *P. capsici*_LT1534 sequence version 11 accession PcapLT1534_SC064, and the consensus showed 83% identity with fragments from the region 146-259. Similarly, the DNA sequenced fragments of the *R. solani* strain were aligned with sequences from the NCBI's gene bank, and its highest level of identity (90%) coincided with that of *R. solani*, accession number JATN01000256.1 (Version JATN01000256.1 GI: 576995022) with fragments from the region 144-292.

Pathogenicity *in vitro*. The symptoms observed were necrotic root apex, hypocotyl and/or cotyledons. The *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* isolates were pathogenic to manzano pepper seedlings but symptoms appeared at different time. The expression of symptoms when *F. oxysporum*

oxysporum f.sp. *lycopersici* accesión CM000593.1, y en el consenso tuvo un 88 % de identidad en fragmentos de la región 248 a 270. Los fragmentos secuenciados de la cepa de *P. capsici* se alinearon con la secuencia de *P. capsici*_LT1534, versión 11, accesión PcapLT1534_SC064, con un 83 % de identidad en consenso con fragmentos de la región 146 – 259. Similarmente los fragmentos secuenciado de ADN de la cepa de *R. solani* se alinearon con secuencias del banco de genes NCBI y su mayor identidad (90 %) se consensó con *R. solani* accesión número JATN01000256.1 (Versión JATN01000256.1 GI: 576995022), con fragmentos de la región 144 – 292.

Patogenicidad *in vitro*. Los síntomas observados fueron necrosis en ápice de raíz, hipocótilo y/o cotiledones. Los aislamientos de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* resultaron patogénicos en las plántulas de chile manzano con variación temporal en la manifestación de los síntomas. La expresión de los síntomas con inóculo de *F. oxysporum* varió de 8 a 12 días después de la siembra de acuerdo a la cepa. En el caso de las plántulas inoculadas con *P. capsici* y *R. solani* los síntomas se presentaron a los 10 días después de la inoculación.

En incidencia y severidad se observaron diferencias estadísticas entre colonias de *F. oxysporum* ($P \leq 0.01$; con valores respectivos máximo y mínimo entre tratamientos de 34.4 y 92.8 % en incidencia y de 48.8 y 81.6 % en severidad) y entre colonias de *P. capsici* ($P \leq 0.05$; con valores respectivos máximo y mínimo entre tratamientos de 49.2 y 63.6 % en incidencia y de 69.3 y 90.9 % en severidad) asociadas al lugar de colecta, lo que posiblemente indique heterogeneidad intraespecífica, asociada entre otros factores a la dispersión natural de los patógenos, como la reportada para cenicienta (*Leveillula taurica*) en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Guzmán-Plazola *et al.*, 2011)

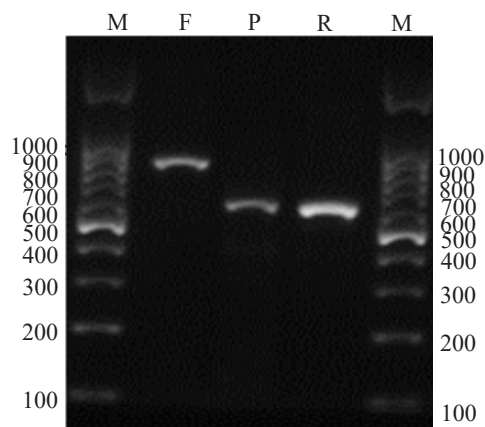


Figura 2. Electroforesis en gel de 1.2 % de agarosa en TBE para fragmentos amplificados de ADN ITS de *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (P) y *R. solani* (R); carriles M corresponden al marcador molecular de 100 pb.

Figure 2. Electrophoresis in 1.2% agarose gel in TBE for ITS DNA amplification of fragments of *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (P) and *R. solani* (R); M lanes correspond to the 100 bp molecular marker.

was inoculated varied 8-12 days after being cultivated depending on the strain. In the case of seedlings inoculated with *P. capsici* and *R. solani*, symptoms appeared 10 days after inoculation.

Statistical differences in incidence and severity were observed on *F. oxysporum* ($P \leq 0.01$ colonies, with maximum and minimum values between 34.4 and 92.8% incidence, and 48.8 and 81.6% severity, respectively, and on *P. capsici* colonies ($P \leq 0.05$, with maximum and minimum values between 49.2 and 63.6% incidence, and 69.3 and 90.9% severity, respectively, that were associated with the collection site, a fact that may indicate intraspecific heterogeneity associated, among other factors, with pathogens natural spread, such as that reported for powdery mildew (*Leveillula taurica*) in tomato crops (*Solanum lycopersicum*) (Guzmán-Plazola *et al.*, 2011), and resistance development by the pathogens due to the selection pressure caused by

y desarrollo de resistencia de los patógenos por la presión de selección ejercida con fungicidas (Silva-Rojas *et al.*, 2009). La incidencia de los patógenos fue de 65 % en *F. oxysporum*, 56.4 % en *P. capsici* y del 76 % para *R. solani*. Por otra parte, los valores de severidad fueron de 81.4 % para *P. capsici*, 64.6 % *F. oxysporum* y 65.5 % para *R. solani* lo que denota un efecto más devastador del oomiceto, el cual procede de una zona altamente productora de chile manzano, donde el control de enfermedades es por medio de productos químicos, lo cual de acuerdo a Silva-Rojas *et al.* (2009), trae como consecuencia la resistencia de *P. capsici*.

Los valores mayores a uno del cociente severidad/ incidencia (Figura 3), indican mayor patogenicidad, ya que aun cuando los patógenos mostraron incidencia relativamente similar, el proceso infeccioso en términos de superficie del tejido (severidad) fue más acelerado. En *F. oxysporum*

fungicidas (Silva-Rojas *et al.*, 2009). The pathogens incidence was 65% in *F. oxysporum*, 56.4% in *P. capsici*, and 76% in *R. solani*. On the other hand, the severity values were 81.4% in *P. capsici*, 64.6% in *F. oxysporum*, and 65.5% in *R. solani*. These values indicate a more devastating effect caused by oomycetes, which come from a major manzano pepper production zone, where chemical products are used to control diseases, a fact that, according to Silva-Rojas *et al.* (2009), causes *P. capsici* to become resistant.

Values higher than 1 in the severity/incidence quotient (Figure 3) indicate a higher level of pathogenicity given that although the pathogens showed a relatively similar incidence, the infection process was faster (severity) on the tissue area. The severity/incidence quotient of *F. oxysporum* was lower than 1.0 in five out of nine sites where *F. oxysporum* was found (Figure 3), which

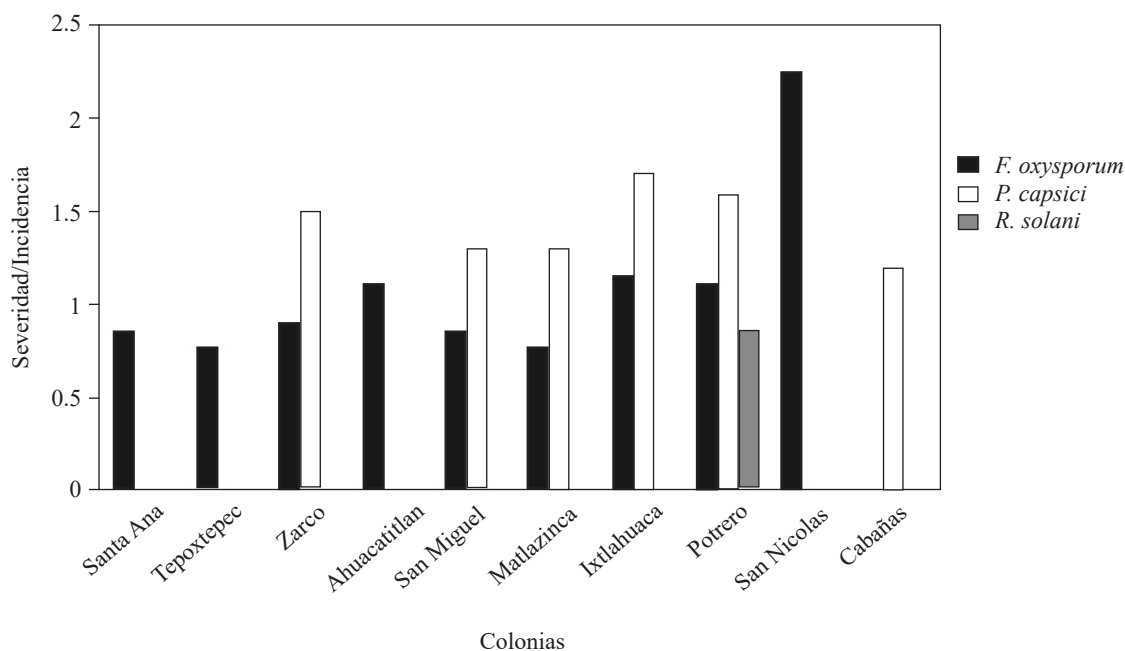


Figura 3. Cociente de severidad/incidencia de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* en plántulas de chile manzano en 10 localidades productoras del sur del Estado de México.

Figure 3. Severity/incidence quotient of *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* in manzano pepper seedlings in 10 production sites of the southern zone of the State of Mexico.

El cociente severidad/ incidencia fue menor a 1.0 en cinco de nueve localidades donde se presentó (Figura 3), lo que representó mayores valores de incidencia que de severidad; sin embargo, el valor promedio del cociente de las nueve colonias de este patógeno fue muy cercano a uno, lo que sugiere una relación proporcional entre la incidencia y la severidad para este patógeno. Por el contrario, el cociente severidad/ incidencia de *P. capsici* muestra valores mayores a 1.0 en todas las colonias evaluadas (Figura 3), indicativo de que el grado de daño es más acelerado aun con menores valores de incidencia. En el caso de *R. solani* el valor del cociente fue similar al descrito para *F. oxysporum*.

Interacción en infecciones múltiples. El proceso infeccioso después de la inoculación se aceleró tanto en infecciones simples como combinadas, al manifestarse los síntomas tres días después de la inoculación (ddi) (Figura 4). Cinco ddi todas las plantas infectadas con *P. capsici* murieron (Figura 5). Resultados similares en *Capsicum* spp., ubican al patógeno como el más catastrófico a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012). Adicionalmente, información de Sanzón *et al.* (2012), describe necrosis de raíz a 24 h de la inoculación y muerte posterior a los cinco días, con evidencias de invasión de micelio y esporangios en la planta. Sin embargo, una vez que *P. capsici* se combina con otro u otros patógenos, aun sin diferencia significativa en algunos tratamientos (Figura 5), el daño disminuye, lo cual puede deberse a la competencia por nutrientes por parte de los patógenos (Abdullah *et al.*, 2017). Los valores de severidad promedio de tres días de medición (Figura 5), denotaron variación significativa ($p \leq 0.05$) en la aceleración del proceso infeccioso entre tratamientos, marcando también al inóculo individual de *P. capsici* como el más severo al acumular más rápido el daño.

En el caso de *F. oxysporum*, cinco ddi el hipocótilo de las plántulas mostraron manchas color ma-

represented higher levels of incidence than those of severity, but the average value of the quotient of the nine pathogen colonies was very close to one, which suggests a proportional relation between the pathogen's incidence and severity. In contrast, the severity/incidence quotient of *P. capsici* had values higher than 1.0 in all the evaluated colonies (Figure 3), which indicates that the rate of damage was faster even though the incidence was lower. In the case of *R. solani*, the quotient value was similar to that of *F. oxysporum*.

Interaction in multiple infections. The infectious process after inoculations, alone and combined, was faster and symptoms appeared three days after inoculation (dai) (Figure 4). At five dai, plants infected with *P. capsici* died (Figure 5). Similar results of *Capsicum* spp. indicate that this is the most lethal pathogen around the world (Lamour *et al.*, 2012). Additionally, reports by Sanzón *et al.* (2012) describe root necrosis 24 h after inoculation and plant death at day five, as well as evidence of plants being invaded by mycelium and sporangia. However, when *P. capsici* was combined with other pathogen(s), although no significant differences were found in some treatments (Figure 5), the level of damage was low, which could be due to pathogens competition for nutrients (Abdullah *et al.*, 2017). The average severity values from three-day measurements (Figure 5) showed a significant variation ($p \leq 0.05$) in the infection process rate between treatments, which also indicated that the *P. capsici* inoculum alone was the most severe because of the faster damages accumulation.

In the case of *F. oxysporum*, seedlings developed brown spots on the hypocotyl five ddi, which, according to Sanzón *et al.* (2012), are caused by a higher accumulation of polyphenols in the stem tissue that causes the cells in contact to die. Cell wall degradation could be due to activity of lytic enzymes that are produced by the pathogens (Feng *et al.*, 2010).

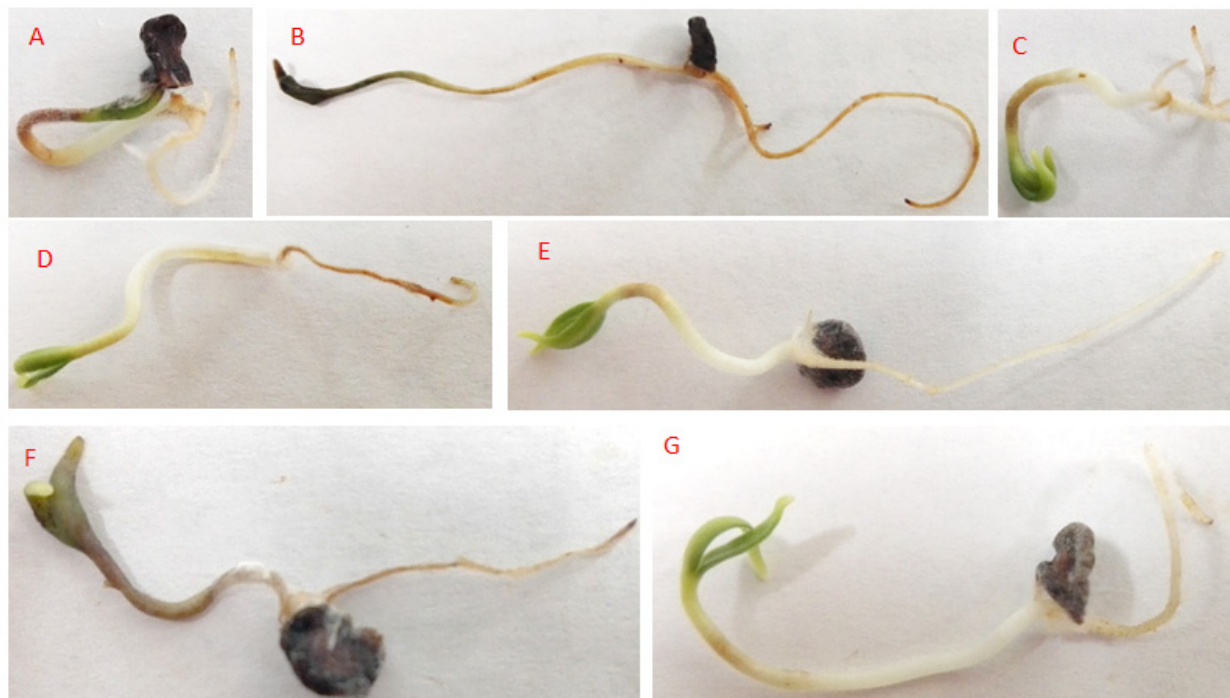


Figura 4. Daños ocasionados en *C. pubescens* cinco ddi por: A) *F. oxysporum*, B) *P. capsici*, C) *R. solani*, D) *P. capsici* + *R. solani*, E) *F. oxysporum* + *R. solani*, F) *P. capsici* + *F. oxysporum* y G) *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*.
Figure 4. Damage caused in *C. pubescens* five dai by: A) *F. oxysporum*, B) *P. capsici*, C) *R. solani*, D) *P. capsici* + *R. solani*, E) *F. oxysporum* + *R. solani*, F) *P. capsici* + *F. oxysporum* and G) *F. oxysporum*+ *P. capsici* + *R. solani*.

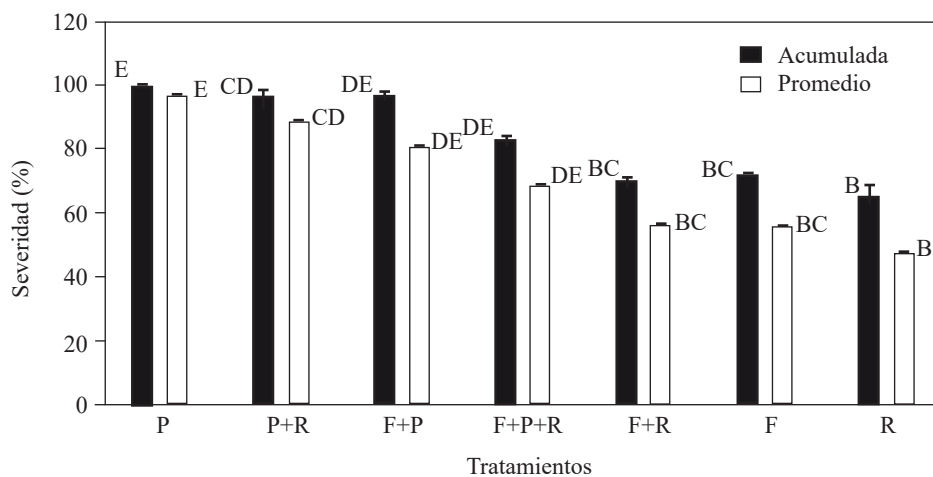


Figura 5. Severidad acumulada y promedio de organismos asociados con acción individual o combinada en plantas de *C. pubescens* 5 días después de la inoculación. P= *P. capsici*, P+R= *P. capsici* + *R. solani*, F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*, F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, F= *F. oxysporum* y R= *R. solani*. Barras de error corresponden al error estándar. Columnas con la misma letra no difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Figure 5. Accumulated and average severity of associated organisms alone and combined in *C. pubescens* plants, 5 days after inoculation. P= *P. capsici*, P+R= *P. capsici* + *R. solani*, F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*, F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, F= *F. oxysporum* and R= *R. solani*. The error bars correspond to the standard error. Columns with the same letter are not statistically different ($p \leq 0.05$).

rrón, las cuales de acuerdo a Sanzón *et al.* (2012), se deben a la mayor acumulación de polifenoles en tejido del tallo, que ocasionan que las células en contacto mueran. La degradación de las paredes celulares posiblemente se debe a la actividad de enzimas líticas producidas por los patógenos (Feng *et al.*, 2010).

En la combinación *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* se observó una interacción de coinfección, donde la patogenicidad se redujo con respecto a *P. capsici* individual (Figura 5). En este complejo de interacción la respuesta provocada por un patógeno modificó la presencia del otro. Esta interacción compleja, tiende a alterar el curso de la enfermedad, ya que los patógenos coexistentes entran en competencia por crecimiento y por los nutrimentos en el mismo huésped, y la nutrición subóptima conduce a la competencia por la cual algunas especies pueden dominar (Abdullah *et al.*, 2017). No obstante, la gravedad y el tipo de competencia se determinan por el consumo de nutrimentos a lo largo del tiempo (Chesson, 2000).

En la interacción *F. oxysporum* + *R. solani*, la patogenicidad fue similar a la correspondiente del inóculo individual *F. oxysporum* y ligeramente mayor a la de *R. solani* (Figura 5), lo que sugiere que entre estos dos patógenos la presencia de uno en términos generales no altera la presencia del otro. A este respecto Alizon *et al.* (2013), señalan que existen una amplia variedad de respuestas en las combinaciones de patógenos en un huésped determinado, las cuales tiene que ver con aspectos evolutivos y ecológicos entre ambas partes.

Interacción patógenos-genotipo. Los síntomas en las plantas inoculadas con patógenos individuales y combinados se observaron 15 ddi. Plantas con daños de *P. capsici* mostraron flacidez en la parte aérea y lesiones necróticas en la parte interna y externa de la corona del tallo, así como radícu-

When *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* were combined, a co-infection interaction occurred where the pathogenicity was lower compared to that of the infection produced by *P. capsici* alone (Figure 5). In this interaction complex, the response elicited by one pathogen may be modified in the presence of another pathogen. This complex interaction tends to alter the course of the disease because the co-existing pathogens compete for growth and nutrients in the same host, and suboptimal nutrition leads to a competition whereby some species may dominate (Abdullah *et al.*, 2017). However, the severity and type of competition are determined by nutrient consumption over time (Chesson, 2000).

In the interaction *F. oxysporum* + *R. solani*, the pathogenicity was similar to that of *F. oxysporum* alone, and slightly higher to that of *R. solani* (Figure 5), which in general terms suggests that when both pathogens are combined, the presence of one of them does not alter the presence of the other. To this regard, Alizon *et al.* (2013), pointed out that, when the pathogens are combined, there is a wide range of responses from a determined host that have to do with evolutive and ecological aspects from both parts.

Pathogens-genotype interaction. The symptoms in plants inoculated with pathogens, alone and combined, appeared 15 dai. Plants infected with *P. capsici* showed looseness on the aerial part, necrotic lesions on the internal and external part of the stem crown, and necrotic radicle. Seedlings infected with *R. solani* showed chlorosis on the aerial part and necrotic roots; when the damage was severe, there was radicle strangulation; González (2008) mentioned non-compact rot with epidermis detachment. Seedlings inoculated with *F. oxysporum* showed chlorosis and, sometimes, curly foliage and necrotic radicle. Seedlings inoculated with *F. oxysporum* + *P. capsici* showed

la necrótica. Plántulas con daño por *R. solani* presentaron clorosis en la parte aérea y necrosis en raíz; en daño más avanzado la radícula presentó estrangulamiento, González (2008), menciona una pudrición no compacta con desprendimiento de epidermis. Las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron clorosis y en ocasiones rizados en el follaje y necrosis de la radícula. Las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P.capsici* mostraron clorosis foliar y marchitez, así como necrosis en corona del tallo y radícula.

En plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* se observó clorosis en hojas, corona del tallo y radícula necróticas. De acuerdo a Velásquez-Valle *et al.* (2001) el síntoma inicial más evidente es una ligera flacidez foliar, que es más notable al avanzar el día, así como un ligero amarillamiento del follaje. Estos síntomas se asociaron con la podredumbre de la raíz y ablandamiento de las puntas de las raíces, lesiones de la raíz que varían en tamaño y color, de rojizo a marrón y negro, recorte de la raíz y pudrición (Hamon *et al.*, 2011). En daño por *F. oxysporum* se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre genotipos, con variación del 0 a 70 % entre el menor y el mayor valor respectivamente, donde el genotipo M8 mostró resistencia y el genotipo M9 tolerancia a dicho patógeno (Cuadro 2). En plántulas inoculadas con *R. solani* se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), con valores mínimo de 0 % en M8 y máximo de 76 % en M15. En inoculación con *P. capsici* hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con variación en la susceptibilidad del 81 al 95 % entre M8 y M7 respectivamente. En las combinaciones de patógenos, los intervalos entre valores máximo y mínimo disminuyeron. En la combinación *F. oxysporum* + *P.capsici* con diferencias significativas ($P \leq 0.05$), los valores máximo y mínimo fueron de 67 % en M8 y 93 % en M2; y en la combinación *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R.*

foliar chlorosis and wilt, as well as necrotic stem and radicle.

Seedlings inoculated with *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* showed chlorotic leaves and stem crown, and necrotic radicle. According to Velásquez-Valle *et al.* (2001), the earliest evident symptom was a slight foliar looseness that was more visible as the day went on, as well as a slight yellowing of foliage. These symptoms were associated with root rot, softening of roots tip, root lesions that varied in size and color (from reddish to brown and black) and short and rotten root (Hamon *et al.*, 2011).

In infections caused by *F. oxysporum*, there were highly significant differences ($P \leq 0.01$) between genotypes with 0-70% variation between the lowest and the highest value, respectively, where the M8 genotype showed resistance, and the M9 genotype showed tolerance to the pathogen (Table 2). In seedlings inoculated with *R. solani* there were highly significant differences ($P \leq 0.01$), with minimum values of 0 % for M8 and maximum values of 76 % for M15. When inoculated with *P. capsici*, significant differences ($P \leq 0.05$) were observed, with 81-95 % variation in susceptibility between M8 and M7, respectively. In pathogen combinations, the intervals between maximum and minimum values were lower. In combinations of *F. oxysporum* + *P.capsici* with significant differences ($P \leq 0.05$), the maximum and minimum values were 67 % for M8 and 93% for M2; and the combination *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* with highly significant differences ($P \leq 0.01$), the minimum and maximum values were 41% for M8 and 95% for nine genotypes (Table 2). The M8 genotype had the lowest level of wilt susceptibility and also showed other distinctive phenotypic differences compared to the rest of the genotypes analyzed (non-reported data), such as dense ramification and small fruits that are characteristic of rustic materials.

Cuadro 2. Susceptibilidad de 16 genotipos de chile manzano a daño por marchitez.
Table 2. Susceptibility to wilt damage in 16 manzano pepper genotypes.

Genotipos	Susceptibilidad ^x				
	F	P	R	F*P	F*P*R
M8	0 a	81 a	0 a	67 a	41 a
M9	29 b	91 b	38 b	90 b	81 bc
M16	48 c	95 b	48 bc	90 b	95 c
M15	48 c	95 b	76 e	90 b	95 c
M11	48 c	93 b	48 bc	91 b	95 c
M12	48 c	95 b	67 cde	85 b	83 bc
M10	48 c	95 b	48 bc	90 b	95 c
M3	48 c	93 b	48 bc	90 b	95 c
M4	48 c	95 b	48 bc	90 b	75 b
M5	48 c	95 b	48 bcde	90 b	93 c
M6	48 c	95 b	73 e	85 b	90 bc
M7	48 c	95 b	52 bcd	90 b	95 c
M13	57 c	95 b	61 cde	90 b	95 c
M2	57 c	95 b	69 de	93 b	95 c
M14	70 d	95 b	70 de	90 b	95 c
M1	70 d	93 b	66 cde	90 b	95 c
p-valor ^z	0.0001	0.0329	0.0001	0.0300	0.001

^xF= *Fusarium oxysporum*; P= *Phytophthora capsici*; R= *Rhizoctonia solani*; F*P= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*; F*P*R= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*+ *Rhizoctonia solani*. Medias con letras distintas son significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). ^zProbabilidad estadística / ^xF= *Fusarium oxysporum*; P= *Phytophthora capsici*; R= *Rhizoctonia solani*; F*P= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*; F*P*R= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*+ *Rhizoctonia solani*. Medians with different letters are significantly different, according to Duncan's test $P \leq 0.05$). ^zStatistical probability.

solani, con diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), los valores mínimo y máximo fueron de 41 % en M8 y 95 % en nueve genotipos (Cuadro 2). El genotipo M8 que fue el que mostró menor susceptibilidad al daño por marchitez, también muestra otras diferencias fenotípicas distintivas de los demás genotipos analizados (datos no reportados), como ramificación densa y frutos pequeños, característicos de materiales rústicos.

El genotipo M8 y potencialmente el M9, ambos como los menos susceptibles a los daños por marchitez representan una potencial alternativa para introducir la resistencia observada en esta investigación a genotipos comerciales como el M3, el cual es el más cultivado en la región. Además, la respuesta diferencial de algunos de los genotipos de

The M8 genotype, and likely, the M9 genotype, were both the least susceptible to wilt damage and can be a potential alternative for introducing the observed resistance in this study to commercial genotypes, such as M3, the most cultivated in the region. Moreover, the differential response of *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* to some of the *C. pubescens* genotypes analyzed suggests the existence of different resistance mechanisms (Anaya-López, 2011).

CONCLUSIONS

Three organisms were detected that cause manzano pepper wilt in the southern zone of the

C. pubescens analizados a *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* y sus combinaciones, sugieren variación en los mecanismos de defensa (Anaya-López, 2011).

CONCLUSIONES

Se detectaron tres organismos causales de la marchitez de chile manzano del sur de México; de ellos *Fusarium oxysporum* fue el más frecuente, seguido por *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

La identificación molecular permitió identidad de 88 % de los fragmentos amplificados de *F. oxysporum* con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2. *P. capsici* tuvo identidad de 83 % con *P. capsici* LT1534, versión 11, y *R. solani* alcanzó identidad de 90% con el grupo anatómico 3 (AG-3).

De los tres patógenos encontrados, *Phytophthora capsici* es el que causa la mayor severidad en daño por marchitez en la región sur del Estado de México, aunque *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* también causan daños en la planta.

El genotipo M8 fue resistente a *F. oxysporum* y *R. solani*, y el genotipo M9 podría ser tolerante a *F. oxysporum*. El genotipo M8 fue tolerante a *P. capsici* y a la inoculación individual y en mezcla de los tres patógenos, por lo que podría representar un genotipo potencial para estudios sobre fuentes de genes de tolerancia útiles en programas de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), por la beca escolar otorgada a Alma Janeth Vallejo Gutiérrez para estudios de maestría.

State of Mexico, from which *Fusarium oxysporum* was the most frequently present, followed by *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*.

The molecular identification showed 88% identity of the amplified fragments of *F. oxysporum* using *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2. *P. capsici* showed 83% identity with *P. capsici* LT1534, version 11, and *R. solani* had 90% identity with the anastomic group 3 (AG-3).

From the three pathogens identified, *Phytophthora capsici* causes the highest level of wilt severity in the southern region of the State of Mexico, although *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* also cause plant damage.

The M8 genotype was resistant to *F. oxysporum* and *R. solani*, and the M9 genotype could be tolerant to *F. oxysporum*. The M8 genotype was tolerant to *P. capsici* and to inoculation with the three pathogens, alone and combined, so it could be a potential genotype for studies about tolerance genes that could be used in genetic improvement programs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) for the scholarship granted to Alma Janeth Vallejo Gutiérrez for her master's studies.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

Abawi SG and Pastor-Corrales CMA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 114p.

- Abdullah AS, Moffat CS, Lopez-Ruiz FJ, Gibber MR, Hamblin J and Zerihun A. 2017. Host-Multi-Pathogen warfare: Pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 8:1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Alizon S, de Roode JC and Michalakis Y. 2013. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters* 16:556-67. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>
- Anaya-López JL, González-Chavira MM, Pineda-Villordo E, Rodríguez-Guerra R, Rodríguez-Martínez R, Guevara-González RG, Guevara-Olvera L, Montero-Tavera V y Torres-Pacheco I. 2011. Selección de genotipos de chiles resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:373-383. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n3/v2n3a6.pdf>
- Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, García-Espinosa R, Osada-Kawasoe S y Valenzuela-Ureta JG. 2001. Comparación de técnicas para evaluar *in vitro* la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:197-202. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219210.pdf>
- Arias AB, Mejía CJ, Estrada MI, Arriaga RM y García VLM. 2017. Caracterización morfológica de híbridos de chile manzano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:825-836. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/2631/263152088006/>
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. *Commonwealt Mycological Institute*. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Carrizo GC, Barfuss HJM, Sehr EM, Barboza GE, Rosabelle S, Eduardo A and Ehrenderfer F. 2016. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany* 118:35-51. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27245634>
- Chesson P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:343-366. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.343>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *The Journal of Agricultural Science* 131(2):245-249. <https://doi.org/10.1017/S0021859698215796>
- Feng B, Li P, Wang H and Zhang X. 2010. Functional analysis of pepme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis* 49:23-31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.03.004>
- Fernández ER, Trapero A y Domínguez J. 2010. Experimentación en agricultura. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla, España. 350 p.
- Galleghy ME and Honh Ch. 2008. *Phytophthora capsici*. In identifying species by morphology and ADN fingerprints. APS PRESS. St. Paul, Minnesota, Estados Unidos de América. 165 p.
- González GM. 2008. Reseña de "Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*". *Fitosanidad* 12:147-159. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209115572003.pdf>
- González-Pérez S, Garces-Claver A, Mallor C, Sáenz de Miera LE, Fayos O, Pomar F, Merino F and Silvar C. 2014. New insights into *Capsicum* spp. relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. *Plos one* 9:e116276. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278865/pdf/pone.0116276.pdf>
- Guigón-López C y González-González PA. 2001. Estudio regional de la enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19:49-56. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219107.pdf>
- Guzmán-Plazola RA, Fajardo-Franco ML, García-Espinosa R and Cadena-Hinojosa MA. 2011. Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México. *Agrociencia* 45:363-378. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n3/v45n3a9.pdf>
- Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, Mcgee RJ, Le Goff IL, L'anthoëne V, Esnault R and Pilet-Nayel ML. 2011. New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple field and controlled environments from France and the United States. *Theoretical and Applied Genetics* 123:261-281. DOI: 10.1007/s00122-011-1582-z
- Herrera I y Laurentin H. 2012. Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*). *Revista Científica UDO Agrícola* 12:639-643. Disponible en línea: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg12072>
- Kannwischer ME and Mitchell DJ. 1978. The Influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Ecology and Epidemiology* 68: 1760-1765. Disponible en línea en: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n12\\_1760.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n12_1760.pdf)
- Kousik ChS, Donahoo RS and Hassell R. 2012. Resistance in watermelon rootstocks to crown rot caused by *Phytophthora capsici*. *Crop Protection*. 39: 18-25. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219412000907>
- Lamour HK, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Leonian LH. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12:401-408. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1972Articles/Phyto62n01\\_20.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1972Articles/Phyto62n01_20.PDF)
- Leslie JF and Sumerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. First edition. State Avenue, Ames, Iowa, USA. Blackwell Publishing. 388 p. Disponible en línea: <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- López AGF. 1984. Manejo de Hongos Fitopatógenos. Departamento de Enseñanza e Investigación en parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp. 106-115.

- Lozano AN, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta ME, Aguilar RVH y Ayala EV. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en la Vega de Metztitlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:31-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61240687003.pdf>
- Martínez GE, Albarracín N, Arcia A, Subero L y Albarracín M. 1996. Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Tropical* 46:265-273. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/40647>
- Martínez EI. 2016. Caracterización morfológica y molecular de 15 colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del Estado de México. Tesis de Maestría. Centro Universitario UAEM Tenancingo, México. P.43-56. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/40647>
- Nelson PE, Tousson TA and Marasa WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. Pennsylvania, USA. 193 p.
- Nora S, Albaladejo RG, González MSC, Robledo-Arnuncio JJ y Aparicio A. 2011. Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas* 20:35-45. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54022121004>
- Pickersgill B. 2007. Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100: 925-940. <http://doi:10.1093/aob/mcm193>
- Ruiz de GJI, Prohens J y Tierno R. 2016. Las variedades locales en la mejora genética de plantas. Vitoria-Gasteiz: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. País Vasco, España. 480 p.
- Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI y Zavaleta ME. 2012. Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:66-71. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a6.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Producción nacional de chile alcanza 2.3 millones de toneladas. <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/produccion-nacional-de-chile-alcanza-2-3-millones-de-toneladas> (consulta, junio 2018).
- Segura LS, Zavala RD, Equihua CC, Andrés AJ y Yopez TE. 2009. Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(3): 297-305. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rchsh/v15n3/v15n3a11.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2018. Relación de huertos de chile manzano registrados para exportación del Estado de México a los Estados Unidos de América con tratamiento de irradiación. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/379049/CHILE\\_MANZANO\\_EDO\\_MEX\\_08\\_23\\_\\_2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/379049/CHILE_MANZANO_EDO_MEX_08_23__2018.pdf) (consulta, septiembre 2018).
- Schubert S, Neubert A, Schierholt A, Sümer A and Zörb C. 2009. Development of salt-resistant maize hybrids: The combination of physiological strategies using conventional breeding methods. *Plant Science*. 177(3): 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.011>
- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavia, SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum Annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente Causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27: 134-147. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61212195006>
- Singleton L, Mihail JD and Rush MCh. 1992. Methods for research on soil borne Phytopathogenic Fungi. APS Press. St. Paul, Minesota, USA. 264 p.
- Uc-Arguelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V and Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:263-283. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n2/2007-8080-rmfi-35-02-00263.pdf>
- United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (USDA-ARS). 2011. Grin species records of Capsicum. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory. <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-barc/beltsville-agricultural-research-center/national-germplasm-resources-laboratory/> (consulta, febrero 2018)
- Vásquez LA, Tlapa BB, Yáñez MMJ, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (2): 127 – 134. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61011222007>
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM y Luna-Ruiz JJ. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219207>
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultures fungi and key to species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p. Disponible en línea: <http://www.eagriculture.biz/download/Soil/Pictorial%20Atlas%20of%20Soil%20and%20Seed%20Fungi%20%20Morphologies%20of%20Cultured%20Fungi%20and%20Key%20to%20Species.pdf>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. *PCR Protocols*. Academic Press. San Diego, CA, USA. P 315-322. Disponible en línea: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhang YL, Jia QL, Li DW, Wang JE, Yin YX and Gong H. 2013. Characteristic of the pepper CaRGA2 gene in defense responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 8985-9004. <https://doi.org/10.3390/ijms14058985>