Universidad de Guadalajara
Escuela de Agricultura

AISLAMIENTO Y DESCRIPCION DEL PATOGENO CAUSANTE DE LA MARCHITEZ DEL CHILE EN CINCO MUNICIPIOS DEL ESTADO DE JALISCO

Tesis:

Que para obtener el título de

Ingeniero Agrónomo

Presenta

ADAUCO MEJIA PEREZ

Guadalajara, Jal. 1981

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

EXPEDIENTE .....

NUMERO ...1301.....

Escuela de Agricultura 14 de Mayo de 1981

C. PROFESORES:

ING. JOSE ANTONIO SANDOVAL MADRIGAL
ING. ANDRES RODRIGUEZ GARCIA
ING. SALVADOR MENA MUNGUIA

De la manera más atenta me permito comunicar a ustedes que he tenido a bien nombrarlos miembros del Jurado que ha de dictaminar sobre el Trabajo de Tesis denominado:

" AISLAMIENTO Y DESCRIPCION DEL PATOGENO CAUSANTE DE LA MARCHITEZ DEL CHILE EN 5 MUNICIPIOS DEL ESTADO DE JALISCO."

presentado por el Pasante ADAUCO MEJIA PEREZ

Como base en el Artículo 40, Capítulo IV, Título Octavo del Reglamento de la Ley Orgánica, " No podrá verificarse ningún Examen si la tesis no hubiese sido admitida por lo menos por la mayoría de los miembros del Jurado".

Con objeto de convocar al Examen correspondiente, suplicamos a ustedes se sirvan emitir su dictamen haciendo saber si el presente trabajo puede ser admitido para Examen posterior. En caso contrario, rogamos consignen las razones correspondientes.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
EL DIRECTOR

ING. LEONEL GONZALEZ JAUREGUI

RESULTADO _____ es de admitirse

FIRMA _____

LAS AGUJAS, MPIO DE ZAPOPAN, JAL. APARTADO POSTAL No. 128

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Escuela de Agricultura

EXPEDIENTE .....

NUMERO .....1303.....

10 de Junio de 1981

C. PROFESORES:

DR. ALBERTO [illegible], Director
ING. [illegible], Asesor
CPN. VERONICA [illegible] MENDOZA, Asesor

Con toda atención me permito hacer de su conocimiento que habiendo sido aprobado el Tema de Tesis:

" [illegible] ASEGURAMIENTO Y RECORRIDOS DEL MAGUEY CRUDO DE LA [illegible] DEL CHILE EN 5 MUNICIPIOS DEL ESTADO DE JALISCO."

presentado por el Pasante [illegible]
han sido ustedes designados Director y Asesores respectivamente para el desarrollo de la misma.

Ruego a ustedes que sirvan hacer del conocimiento de esta Dirección su Dictamen en la revisión de la mencionada tesis. Entre tanto me es grato reiterarle las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
EL SECRETARIO

ING. JULIAN SANCHEZ GONZALEZ

JSG/ml.

LAS AGUJAS, MPIO DE ZAPOPAN, JAL. APARTADO POSTAL No. 129

Las Agujas, Mpio. de Zapopan, Jal. 16 de Junio 1981

C. ING. LEONEL GONZALEZ JAUREGUI
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE AGRICULTURA
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

Habiendo sido revisada la Tesis del PASANTE_____

ADAUCO MEJIA PEREZ _____ Titulada:

"AISLAMIENTO Y DESCRIPCION DEL PATOGENO CAUSANTE DE LA MARCHITEZ DEL CHILE EN 5 MUNICIPIOS DEL ESTADO DE JALISCO."

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma

DIRECTOR

DR. ALBERTO BETANCOURT VALLEJO

ASESOR

ING. CARLOS SIMENTAL GARCIA

ASESOR

QFB. VERONICA NAVARRO HIDALGO

srd.

EL PRESENTE TRABAJO ESTA DEDICADO:

A MIS PADRES:

DOÑA CHUY
DON PANCHO

A MI HERMANO:

ABEL

A:

CARMEN PEREZ

AL CAMARADA:

MANUEL RODRIGUEZ

A LOS ESTIMADOS AMIGOS:

FERNANDO
JOSE LUIS

A LOS COMPAÑEROS:

CAMPESINOS EXPLOTADOS - Y MARGINADOS QUE VIVEN- CON LA ESPERANZA DE JUSTICIA.

AISLAMIENTO Y DESCRIPCION DEL PATOGENO CAUSANTE DE LA MARCHITEZ DEL CHILE EN CINCO MUNICIPIOS DEL ESTADO DE JALISCO.

ESCUELA DE AGRICULTURA

AGRADECIMIENTO

Gracias por sus valiosas y sabias recomendaciones al director de tesis:

Dr. ALBERTO BETANCOURT VALLEJO

Un sincero agradecimiento a mis maestros y asesores:

Q.F.B. VERONICA NAVARRO HIDALGO
ING. CARLOS SIMENTAL SANCHEZ

Gracias por la facilidad prestada para la realizacion de la presente investigación al maestro y Director de la Escuela de Agricultura:

ING. MC. LEONEL GONZALEZ JAUREGUI

Agradezco al personal del Instituto de Madera, Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara, que hizo posible la toma de las microfotos que ilustran este trabajo.

Gracias por la ayuda prestada durante la ejecución del presente trabajo al compañero:

ING. ISAURO SANCHEZ ISLAS

Fotografías:

SR. JOSE SANDOVAL (PECHE)
ADAUCO MEJIA PEREZ.

C O N T E N I D O

		PAGINA
1.-	INTRODUCCION	1
1.1.-	Localización e importancia en la producción de chile en la zona en estudio	1
2.-	HIPOTESIS	5
3.-	OBJETIVOS.....	6
4.-	REVISION DE LITERATURA	7
4.1.-	Agentes causales de la marchitez del chile	7
4.2.-	Síntomatología y características morfológicas de *Phytophthora capsici*	8
4.3.-	Medidas de control de la marchitez del chile.....	9
5.-	MATERIALES Y METODOS.....	11
5.1.-	Colección de material infectado y métodos de aislamiento usados	11
5.2.-	Método de aislamiento selectivo de microorganismos del suelo a través de los medios de cultivo diferenciales	11
5.2.1.-	Preparación de los medios de cultivo	11
5.2.2.-	Preparación y siembra de los microorganismos.....	13
5.3.-	Método del tejido plantado.....	14
5.4.-	Resultados del primer aislamiento.....	15
5.5.-	Identificación de una enfermedad desconocida, Postulados de Koch.....	15
5.5.1.-	Inoculación de plantas sanas	22
5.5.2.-	Síntomas presentados por las plantas inoculadas...	22
5.5.3.-	Reaislamiento del patógeno.....	23
6.-	RESULTADOS	32
7.-	DISCUSION.....	41
8.-	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
9.-	BIBLIOGRAFIA	45

1.- INTRODUCCION.

1.1 Localización e importancia en la producción de chile de la zona en estudio.

En la parte oeste de la "Región de los Altos" en el Estado de Jalisco, justo en los límites con el Estado de Zacatecas, se encuentra una área que en la última década se ha distinguido por producir chile seco variedad de árbol (*Capsicum frutesens*) Fig. 1.

Más específicamente el área chilera se encuentra en los lugares que se riegan con el agua de las presas de Yahualica, Mexticacán, La Cuña y Nochistlán, en las márgenes del Río Verde, sobre otros arroyos y pequeños bordos. (Fig. 2).

En esta región, por su importancia en la producción de chile destacan los municipios de Yahualica, Mexticacán, Teocaltiche, Villa Obregón y Nochistlán, (este último pertenece al Estado de Zacatecas) otros municipios que producen esta hortaliza pero en menor escala son Jalostotitlán y Villa Hidalgo.

De acuerdo al Programa de Producción Agrícola 1980 en el Estado de Jalisco (S.A.R.H.) y al Concentrado de Cosechas del Ciclo Primavera-Verano 1980 al 28 de febrero de 1981; en el año 1980 se obtuvo una producción de 6,287 toneladas de chile seco de un total de 7,813 ton. programadas en el Estado.

Con respecto al área en estudio que se encuentra dentro de los Distritos número 13 de Riego y II de Temporal, dentro de ella también funcionan las Unidades de Riego para el Desarrollo Rural (U.R.D.E.R.A.L.), se tienen los siguientes datos del ciclo antes citado, en chile seco se obtuvieron 3,951 ton. de un total de 6,948 ton. programadas que representa el 63% de la producción total en el Estado.

En este mismo ciclo fueron programadas dentro del área 4 704 hectáreas para la producción de chile seco variedad de árbol que es el 85% de la superficie programada en el Estado de Jalisco.

En realidad la superficie plantada fue de 3,611 has. que representan el 66% de la superficie plantada en el Estado, la superficie perdida fue de 324 has., el rendimiento medio fue de 1,341 Kg/ha., el precio medio rural $ 68,650, dando una pérdida económica total de 29'827,327 pesos.

La causa principal de estas pérdidas se debieron a la enfermedad llamada "marchitez del chile" pues el patógeno llega a atacar gran parte del cultivo cuando existen condiciones favorables para su desarrollo, aunque otros factores como insectos, mal manejo del cultivo, también han ocasionado en parte estas pérdidas. Es también de notar que la precipitación pluvial durante el ciclo fue escasa y el ataque de marchitez no fue tan acentuado como en otras

BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA

ocasiones por lo que las pérdidas reportadas no fueron tan grandes como generalmente ocurre.

Ahora bien, la mayor parte de la población económicamente activa de esta zona, se dedica a las actividades agropecuarias, el chile de árbol genera fuentes de trabajo ya que su cultivo requiere de bastante mano de obra, sobre todo para plantarlo, cosecharlo, secarlo y seleccionarlo.

Esta hortaliza ocupa solamente las tierras que cuentan con riego, por la necesidad de regarlo mientras se inicie el temporal. Lo anterior determina que las tierras de riego generen mayor ingreso a los agricultores ya que la rentabilidad del chile sobrepasa la de frijol o maíz de riego, cultivos tradicionales de la región.

El cultivo del chile de árbol se ha arraigado rápidamente en esta región, como lo estuvo hace tiempo el cultivo de la papa, que desapareció paulatinamente al ser afectada por la destructora enfermedad llamada "tizón tardío" haciendo incosteable su producción.

El cultivo del chile se ve amenazado y probablemente corra la misma suerte que la papa pues la enfermedad llamada "Marchitez o Ardío" del chile (los agricultores aluden así a esta enfermedad por el aspecto marchito de las plantas) es cada vez más destructora y abarca una mayor área. En algunas partes el agricultor ha optado por otros cultivos como la cebolla, algunos frutales, maíz y frijol, debido al bajo rendimiento obtenido de chile.

Así pues, es necesario conocer el agente causal de la marchitez del chile en esta región, para tomar medidas de control adecuadas. También es necesario la identificación del patógeno para posteriormente desarrollar otros estudios en tan importante zona chilera del Estado de Jalisco.

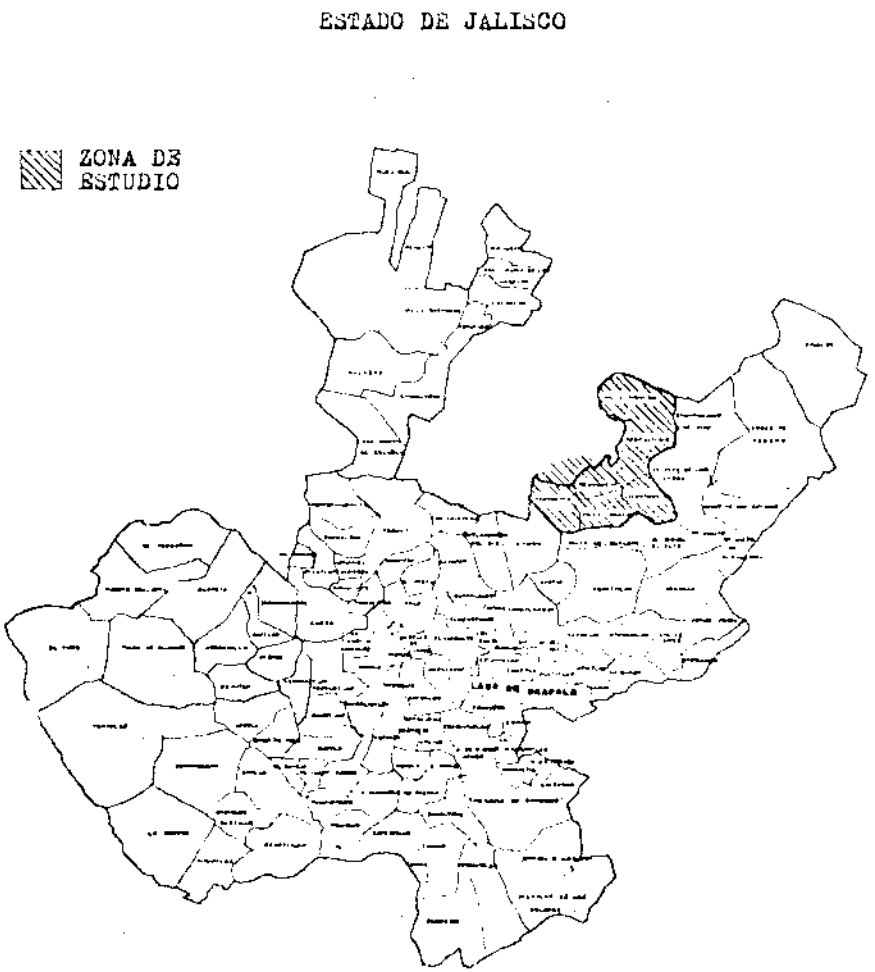


Fig. 1. Localización de la zona de estudio en el Estado de Jalisco, 1980.

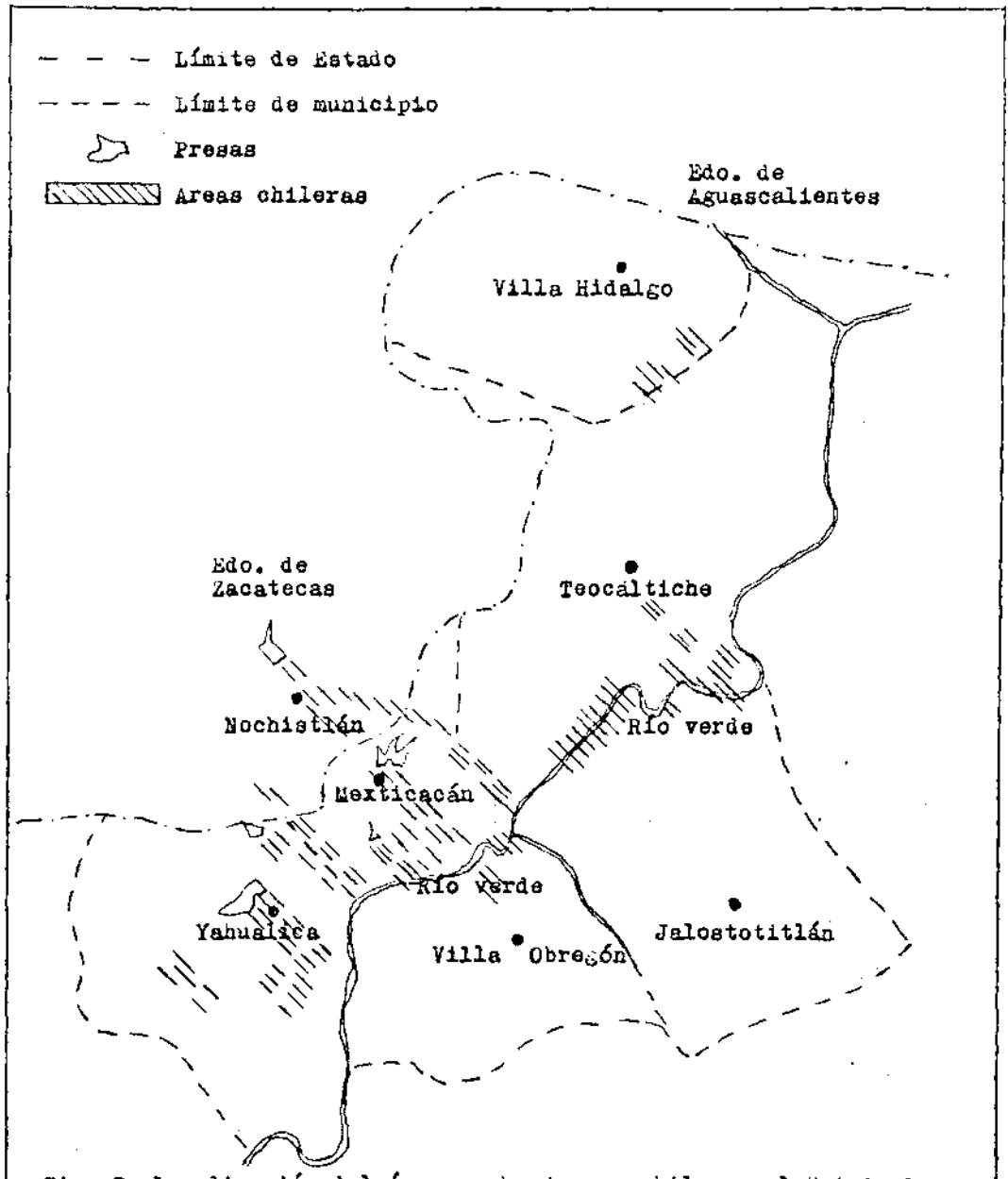


Fig. 2. Localización del área sembrada con chile en el Estado de Jalisco, 1980

2.- HIPOTESIS

Ho: La marchitez del chile de árbol (*Capsicum frutesens*) es causada por *Phytophthora capsici*.

Ha: El agente causal corresponde a otro género y especie.

3.- OBJETIVOS

a) Aislar e identificar el agente causal de la marchitez del chile de árbol en el área sembrada con este cultivo en el Estado de Jalisco.

b) Describir la sintomatología del patógeno durante el ciclo vegetativo del cultivo y obtener una posible estimación en pérdidas económicas.

c) Establecer las bases para llevar a cabo otros estudios sobre control químico, adaptación y resistencia genética.

d) Obtener información sobre la metodología en el aislamiento -- del patógeno en medios de cultivo.

4.- REVISION DE LITERATURA.

4.1. Agentes causales de la marchitez del chile.

Posiblemente el agente causal de la marchitez del chile de árbol sea el hongo *Phytophthora capsici* pero la literatura menciona otros patógenos que son capaces de producir esta enfermedad.

El Hongo *Phytophthora capsici* fue identificado y clasificado por Leonali en 1922 como una nueva especie, que fue aislado de chiles cultivados en Nuevo México, E.U.A.

Weber (1925) aisló en Florida a este patógeno de cultivos de chile que presentaban marchitez.

Trotter (1927) determinó a *Phytophthora* sp. como el agente que ataca a las plantas de chile produciendo un estrangulamiento en la región basal de la planta.

En Italia, Curzi (1927) al ocuparse de la "cangrena pedale" de *Capsicum annum*, atribuye esta enfermedad a una especie que él describió con el nombre de *Phytophthora hydrophila*.

Tucker (1928) en Puerto Rico aisló de plantas de chile enfermas un patógeno, que comparado con los aislamientos obtenidos por Weber en Florida le permitió constatar que se trataba de P. *capsici*.

La primera noticia de *Phytophthora capsici* en México fue dada por el Servicio de Cuarentena de E.U.A. en 1944 al aislar el hongo de materiales de chile procedentes de México (anónimo).

Galindo (1958) determinó al hongo *Phytophthora capsici* como el agente causal de la marchitez del chile en México.

Bazán (1958) en Perú aisló al hongo *Phytophthora citrophthora* de cultivares de chile afectados por marchitamiento.

Doolittle (1963) encontró que en general las enfermedades de marchitamiento debidas a bacterias y hongos son comunes en los chiles y a menudo causan grandes pérdidas siendo característico la descomposición del tallo.

El mismo autor menciona como causantes de la marchitez del chile además de P. *capsici* a los siguientes géneros y especies:

Sclerotium rolfii que ataca al chile en el cuello de la planta y causa podredumbre de los tejidos, lo que produce marchitamiento y amarillamiento de las hojas.

Fusarium annum ataca las raíces y el cuello del chile produciendo marchitamiento y muerte a la planta, debido a los daños cau

sados a la raíz y al tallo.

También señala a la bacteria *Pseudomonas solanacearum* como causa de marchitamiento y muerte en chile, jitomate y berenjena, si se corta el tallo a la altura del cuello los tejidos tienen un aspecto oscuro y saturado de agua.

Urquijo (1971) señala al hongo *Phytophthora cactorum* como causante de la podredumbre del cuello del chile y berenjena, esta enfermedad produce un marchitamiento general en la planta, luego sobreviene la muerte del hospedero.

El mismo Urquijo señala al *Verticillium tracheiphilum* como causante de la marchitez del chile y de la berenjena que causan muerte rápida de la planta. El patógeno ataca los vasos leñosos del hospedero.

Fernández (1978) indica a *P. capsici* como una especie poco polífaga pero que además del chile ataca al jitomate, pepino, berenjena y calabaza.

El mismo autor señala a los hongos *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* como agentes causales de la marchitez del chile.

4.2 Sintomatología y características morfológicas de *Phytophthora capsici*.

Tucker (1928) reportó que las colonias de *Phytophthora capsici* son de aspecto compacto, producen regular cantidad de micelio y se desarrolla mejor en medios nutritivos de origen natural (papa, avena, arroz, etc.) que en medios sintéticos. La temperatura mínima para su desarrollo es a los 8°C, la óptima entre los 30-32°C y detiene su crecimiento a los 37°C.

Frezzi (1950) señala a *P. capsici* como sinónimo de *Phytophthora hydrophila* y como causante del "Tizón" del chile, provoca podredumbre de los frutos y necrosis en las ramas, ocasionando la muerte de las plantas, también señala como huéspedes de este hongo al pepino, calabaza, jitomate, berenjena y patola. En cuanto a su morfología indica: micelio muy ramificado cuando joven, más alisado al envejecer. Zoosporangios; su producción puede ser abundante o escasa de forma muy variable ovides, elípticos, alargados, globosos, con una vacuola en el centro, hialinos o amarillo limón, presentan prominente papila, a veces desviada y con frecuencia dos en un zoosporangio. Zoosporangióforo simple o ramificado, gruesos y robustos. Produce zoosporas biciliadas. No produce Clamidosporas. Los órganos sexuales se observan a los dos o tres meses de cultivado.

Gilman (1963) describe a este patógeno con micelio ramificado,

con hifas hialinas, esporangiósporos solitarios o escasamente ramificados, esporangios en forma de huevo o limón con papilas apicales y producción de zoosporas ovales y biflageladas.

Dolittle (1963) indica que *P. capsici* ataca tallos, hojas y frutos del chile, el cuello muestra una banda oscura y saturada de agua que puede circundarlo, marchitándose y muriendo la planta; el hongo infecta el suelo y puede trasportarse en la semilla.

Rodríguez (1969) reportó que las plantas enfermas presentan una marchitez total o parcial; en el cuello aparece una lesión café oscura, las hojas presentan lesiones rómbicas color verde pálido las que cambian a café claro. En los frutos se observan áreas decoloradas y en el interior se observa gran cantidad de micelio. Los tejidos epidérmicos y corticales están desorganizados.

Urquijo (1971) al describir este patógeno indica que generalmente el primer síntoma del "tizón, mildew o gangrena basal" del chile causada por *P. capsici* es un marchitamiento de las hojas pero la causa reside en el tallo que se oscurece y se descompone loque causa la muerte de la planta.

Fernández (1978) encontró que la enfermedad del "tizón o mildew" del chile ataca tallos, ramas y frutos; los dos primeros se ven circundados por manchas pardo verdosas. El agente causal es el hongo *Phytophthora capsici* que produce micelio hialino, liso, conprotoplasma granuloso y ramificado. No produce clamidosporas. Los zoosporangios generalmente son ovoides. Produce zoosporas capaces de penetrar por los estomas de las hojas.

García (1979) reporta que las plantas de chile enfermas por "tizón" se observan ceñidas al cuello por una banda acuosa verde, en estas condiciones la planta se marchita hasta morir, los frutos presentan manchas acuosas oscuras, es frecuente al abrirlos observar un filamento fungoso cubriendo las semillas podridas de color oscuro.

Steekenlenburg (1980) observó que las plantas de chile con "pudrición de la raíz" causada por *Phytophthora capsici* presentan en el tallo una mancha que va de color verde oscuro a gris aproximadamente en los primeros diez centímetros de la superficie del suelo, seguida por una pudrición suave y acuosa. Generalmente el sistema vascular presenta un color café cercano a la lesión, las raíces se encuentran completamente podridas, finalmente la planta se marchita y muere.

4.3. Medidas de control de la marchitez del chile.

Nieto (1961) encontró al probar diferentes fungicidas para el control de *Phytophthora capsici* que los más tóxicos son Manzate D, Caldo Bordeles y Captan, sin embargo ninguno detiene el desarrollo de la enfermedad cuando las condiciones ambientales son propicias-

para el desarrollo del hongo.

Beyries (1971) indica haber obtenido buenos resultados con la adición de fungicidas al agua de riego; los fungicidas probados -- fueron Arazan y Nabam.

Urquijo (1971) recomienda para el control de la enfermedad la desinfección de almácigos, aplicación preventiva de Caldo Bordeles a las plantas antes y después del trasplante, la destrucción con - fuego de las plantas atacadas y rotación de cultivos.

García (1979) recomienda la formación de almácigos en suelos- sin contaminar o bien esterilizarlos, el suelo debe de ser ligero- para evitar excesos de humedad. Dos semanas antes de la siembra -- del almácigo debe desinfectarse con Formol, Vapam o Bromuro de Metilo, desinfectar la semilla con Arazan, Captan, Agrosan, etc., -- aplicación de fungicidas al surco o en el agua de riego y la rotación de cultivos.

Por su parte el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (1979) indica que el control de la enfermedad se logra con la- desinfección del almácigo con Vapam o Bromuro de Metilo, desinfec-- ción de la semilla con Captan o Arazan, evitar excesos de humedad- nivelando perfectamente el terreno y la formación de surcos altos.

Laborde y Guerrero (1981) reportan que en los trabajos de resistencia genética no se han logrado resultados satisfactorios dado que todos los materiales probados han resultado susceptibles a las razas de *Phytophthora capsici* aisladas en México. Algunos materiales han mostrado resistencia pero de herencia recesiva.

En cuanto a razas fisiológicas del patógeno Polanch y Webster (1972) proponen 14 razas del patógeno, Redondo (1974) propone 7, - pero estos estudios sobre razas no son suficientes ni definitivos.

Sin embargo, Guerrero y Laborde en 1978 introdujeron al Pro-- grama de Resistencia a *P. capsici* los "Criollos de Morelos", hasta la fecha las líneas CM 331 y CM 334 derivados de estos criollos -- han resultado 100% resistentes a todos los aislamientos hasta ahora obtenidos, estos aislamientos representan en gran parte al patógeno *P. capsici* que se encuentra distribuido en México.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1. Colección de material infectado y métodos de aislamiento usados.

Se colectaron muestras de suelo en varios terrenos donde se presenta la enfermedad año tras año. De la siguiente manera: Se tomaron cinco muestras al azar por cada terreno muestrado, introduciendo una barrena a una profundidad de 15 cm. y vaciando su contenido en bolsas plásticas, por último se hizo una mezcla común con el contenido de todas las bolsas.

De estas mismas áreas se recogieron al azar restos de plantas que se cultivaron en el ciclo anterior y que posiblemente fueron atacadas por marchitez.

Posteriormente en estos terrenos y en otros más que se encontraron plantados con chile, se recogieron plantas que en pleno desarrollo se encontraban atacadas por merchitez en diferentes estados de avance de la enfermedad.

De los diferentes métodos que se conocen para aislamiento de microorganismos se seleccionaron dos por considerarse apropiados de acuerdo con la metodología propuesta por Toler R.W. (1979) y descrita por Betancourt (1981). No se conocía la naturaleza del patógeno, podía ser un hongo, una bacteria o un actinomiceto, sin embargo el patógeno está presente en el suelo por lo que se usó el Método de Aislamiento Selectivo de Microorganismos del Suelo a través de los Medios de Cultivo Diferenciales.

Ahora bien, el patógeno ataca el sistema vascular de las plantas. Se usó el Método del Tejido Plantado.

5.2. Método de Aislamiento Selectivo de Microorganismos del Suelo a través de los Medios de Cultivo Diferenciales.

Este método indica el uso de cuatro medios de cultivo: Extracto de suelo modificado agar (ESA) para el desarrollo de bacterias, Glicerol asparaginato agar (GAA) para el crecimiento de actinomicetos, Papa dextrosa agar (PDA) para el desarrollo de hongos y Peptona dextrosa agar (PeDxa) para hongos pero con un crecimiento más restringido que en PDA.

5.2.1. Preparación de los medios de cultivo.

Los materiales de uso general fueron:

- Balanza analítica
- Autoclave
- Mecheros, laminillas de asbesto, tripodes.
- 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml.

A) GLICEROL ASPARAGINATO AGAR

Reactivos (por litro)*

15 g. Agar
10 ml. Glicerol
1 g. Asparaginato de sodio (o asparagína)
1 g. K_2HPO_4
3 g. $CaCO_3$ para ajustar la reacción a pH 7

Se colocaron uno a uno los reactivos en un matraz y se aforó a 500 ml. con agua destilada.

B) PEPTONA DEXTROSA AGAR

Reactivos (por litro)*

20 g. Agar
1 g. KH_2PO_4
0.5g. $MgSO_4$
5 g. Peptona
10 g. Dextrosa
1 ml. Rosa Bengala 1:30 000
30 mg. Estreptomicina 0 2 mg. de Aureomicina.

Una vez que los reactivos estuvieron dentro del matraz se preparó la dilución; a 1 g. de Rosa Bengala se le adicionaron 10 ml. de agua; de esta solución se tomó 1 ml. y se agregaron 29 ml. de agua para obtener la dilución 1:30, esta operación se repitió hasta lograr la dilución 1:30 000. Como antibiótico se usó Estreptomicina, ésta debe agregarse cuando el agar esté frío pero aún líquido. El antibiótico impide el desarrollo de bacterias y actinomicetos.

C) EXTRACTO DE SUELO MODIFICADO AGAR

Reactivos (por litro)*

15 g. Agar
0.4g. K_2HPO_4
0:5g. $(NH_4)_2HPO_4$
0.05 g. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.1g. MgCl
0.01 g. $FeCl_3$
0.1g. $CaCl_2$
1 g. Peptona
1 g. Extracto de Levadura
250 ml. Extracto de suelo

El extracto de suelo se preparó con 500 g. de suelo, al que se le agregaron 375 ml. de agua. se colocó en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, para luego filtrar hasta obtener

125 ml. los que se adicionaron a la mezcla de reactivos y se aforó a 500 ml. con agua destilada.

D) PAPA DEXTROSA AGAR

Reactivos (por litro)*

200 g. Papas
20 g. Dextrosa
17 g. Agar
Acido Láctico 50% (se emplea al momento de hacer la siembra).

Se cortaron 100 g. de papas, se cocieron en 250 ml. de agua y se coló el líquido. En otro recipiente se disolvió el agar en 250 ml. de agua luego se añadió la Dextrosa. Se combinó la -- dextrosa agar con la infusión de papas, se aforó a 500 ml. -- con agua destilada.

*En este caso se consideró suficiente la preparación de 500 ml. de cada uno de los medios, utilizándose la mitad de la cantidad indicada de cada reactivo.

Esterilización de los medios de cultivo.

Se colocó un tapón de algodón en cada matraz, se etiquetaron con el nombre del medio y se colocaron en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión para su esterilización. Después con pipeta estéril se trasladaron los medios a tubos de ensayo estériles, 10 ml. por tubo. Esta operación se realizó en un radio no mayor de 15 cm. de la flama del mechero para evitar su contaminación. Ya gelificados los medios se colocaron en refrigeración para su conservación y uso posterior.

5.2.2. Preparación y siembra de los microorganismos.

Se cribó y determinó la humedad de la mezcla común de suelo.- En un matraz estéril de 500 ml. se colocaron 25 g. de la muestra,- se agregó agua estéril hasta completar un volumen de 250 ml. se -- agitó en batidora por 30 minutos. Con pipeta estéril se trasladaron 10 ml. de la suspensión a un matraz conteniendo 90 ml. de agua esterilizada para obtener la dilución 1:10. Agitando brevemente se tomaron 10 ml. de esta dilución y se pasaron a otro matraz conteniendo 90 ml. de agua estéril para lograr la dilución 1:100. Este procedimiento se repitió hasta lograr las diluciones 1: 1 000, -- 1:10 000, 1: 100 000, 1: 1 000 000.

De la tercera dilución (1:1 000), con pipeta estéril se trasfirió 1 ml. a una caja de petri estéril, se repitió la operación - para cada una de las siguientes diluciones. Se usaron 2 cajas por dilución por cada medio de cultivo, de la siguiente manera:

Medio PDA:

Dilución	No. de cajas
1:1 000	2
1:10 000	2
1:100 000	2
1:1 000 000	2
Total	8 por cada uno de los medios

De la misma manera se procedió para los tres medios de cultivo restantes. Utilizándose un total de 32 cajas por este método.

Se agregó una gota de ácido Láctico 50% a las cajas que llevarían PDA. Un pH ácido impide el desarrollo de bacterias y actinomicetos, pero son condiciones excelentes para el crecimiento de hongos.

Se licuaron los medios diferenciales (baño maría) y se dejaron enfriar antes de vaciarlos a las cajas, las cajas se giraron en remolino para obtener una distribución uniforme de microorganismos. Se añadió PDA a las cajas que contenían ácido Láctico, Peptona dextrosa agar a las cajas que contenían las diluciones 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 y 1:1 000 000. Extracto de suelo agar y glicerol asparaginato agar a otras cajas que contenían igual serie de diluciones.

Se etiquetaron las cajas con la fecha que se sembró, nombre del medio y dilución. Se sellaron con cinta adhesiva y se incubaron a 29°C por 15 días.

5.3 Método del tejido plantado

Materiales

Cajas de petri estériles
Bisturí
Medios diferenciales
$HgCl_2$ 1:1 000
Alcohol 95%
Mechero
Tejido enfermo

Se fundieron los medios diferenciales y se vaciaron dentro de las cajas. Mientras gelificaban los medios dentro de las cajas se prepararon los tejidos enfermos de la siguiente manera:

Los tejidos sembrados fueron partes de raíz, cuello y ramas, se lavaron con agua de llave y se desinfectaron sumergiéndolos por 1 minuto en una dilución de $HgCl_2$ 1:1000, inmediatamente después se lavaron perfectamente con agua estéril. El bisturí se esterili-

BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA

zó sumergiéndolo en alcohol y pasándolo por una flama ligeramente, luego se cortó el tejido de tal forma que se expusiera la parte interna, enferma, de la que se tomaron trocitos de 0.5 a 1 cm. de tejido y con aguja flameada se introdujeron 2 trocitos por caja. La anterior operación se hizo cerca de la flama del mechero para evitar contaminaciones.

Se sembraron 10 cajas por cada medio. Las cajas se sellaron con cinta adhesiva, se etiquetaron anotando la fecha, el medio y la parte del tejido. Se incubaron a 29°C por 15 días.

5.4 Resultados del primer aislamiento.

Las observaciones en las cajas de petri se realizaron cada 24 horas.

En el medio de extracto de suelo agar predominaron las colonias de bacterias, algunas estuvieron contaminadas con hongos, donde se plantó tejido fue más frecuente la aparición de hongos, posiblemente el tejido sirve como medio para su desarrollo. Se presentó gran diversidad de bacterias. Fig. 3,4,5.

En el medio glicerol asparaginato agar, los hongos estuvieron contaminando parte de las cajas con tejido plantado, pero en las cajas con diluciones no hubo presencia de hongos predominando un sólo tipo de actinomicetos. Fig. 6,7.

Una caja con papa dextrosa agar estuvo contaminada por bacterias, resultó gran diversidad de hongos sobre todo en las cajas con diluciones. Fig. 8.

Las cajas con peptona dextrosa agar estuvieron exclusivamente pobladas por hongos, se presentó gran variedad de colonias y su desarrollo fue más lento que en PDA. Fig. 9, 10.

En las cajas con diluciones la cantidad de colonias dependió de el número de dilución.

5.5 Identificación de una enfermedad desconocida.
Postulados de Koch.

Los métodos establecidos en fitopatología para determinar la patogenicidad de un microorganismo fueron adaptaciones a los postulados de Roberto Koch (1881).

Fig. 3. Obsérvese los diversos tipos de colonias desarrollados en el Extracto de suelo agar, de tejidos de plantas enfermas.

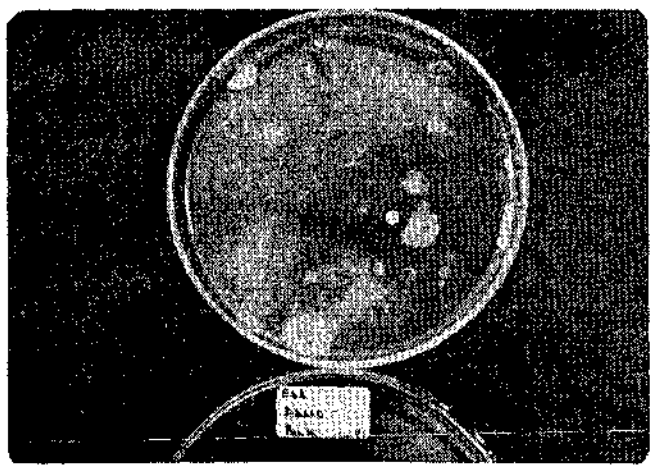
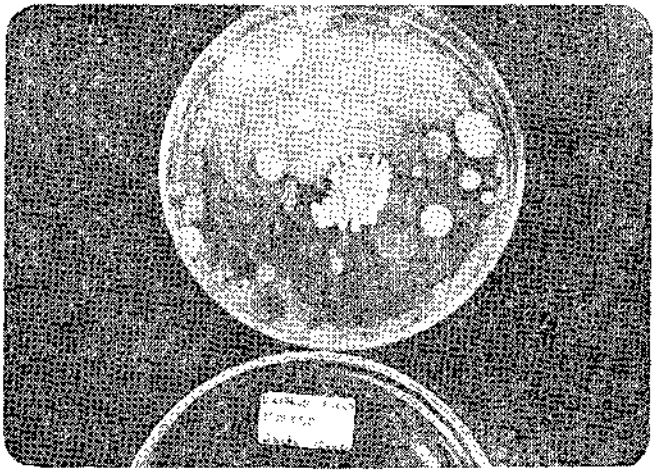


Fig. 4. Una caja con medio ESA contaminada por hongos en la parte inferior.



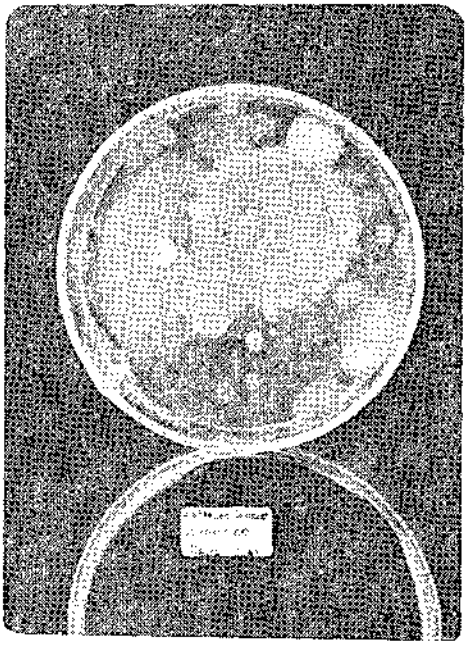


Fig. 5. 2 cajas con diferentes diluciones y tipos de colonias desarrolladas en ESA.

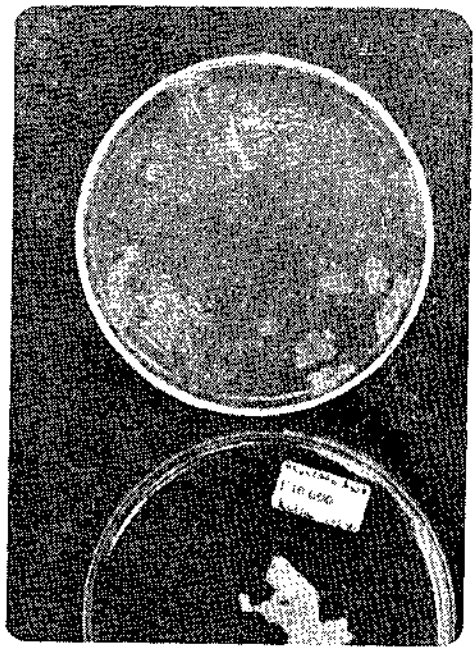


Fig. 6. En medio de cultivo GAA pocas fueron las colonias de actinomicetos.

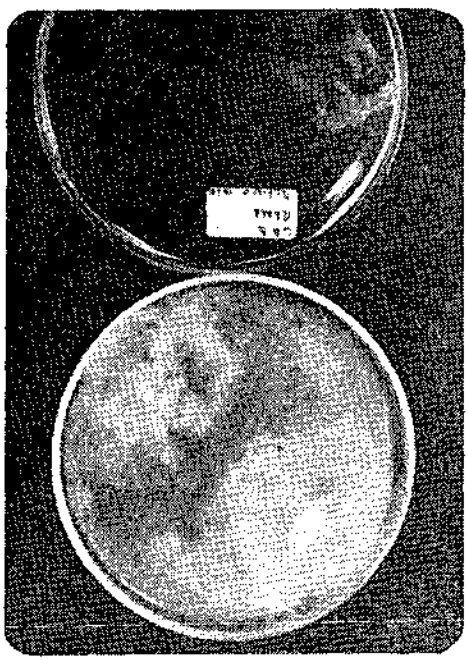


Fig. 7. Una caja contaminada con hongos, el desarrollo fungoso es alrededor del tejido plantado

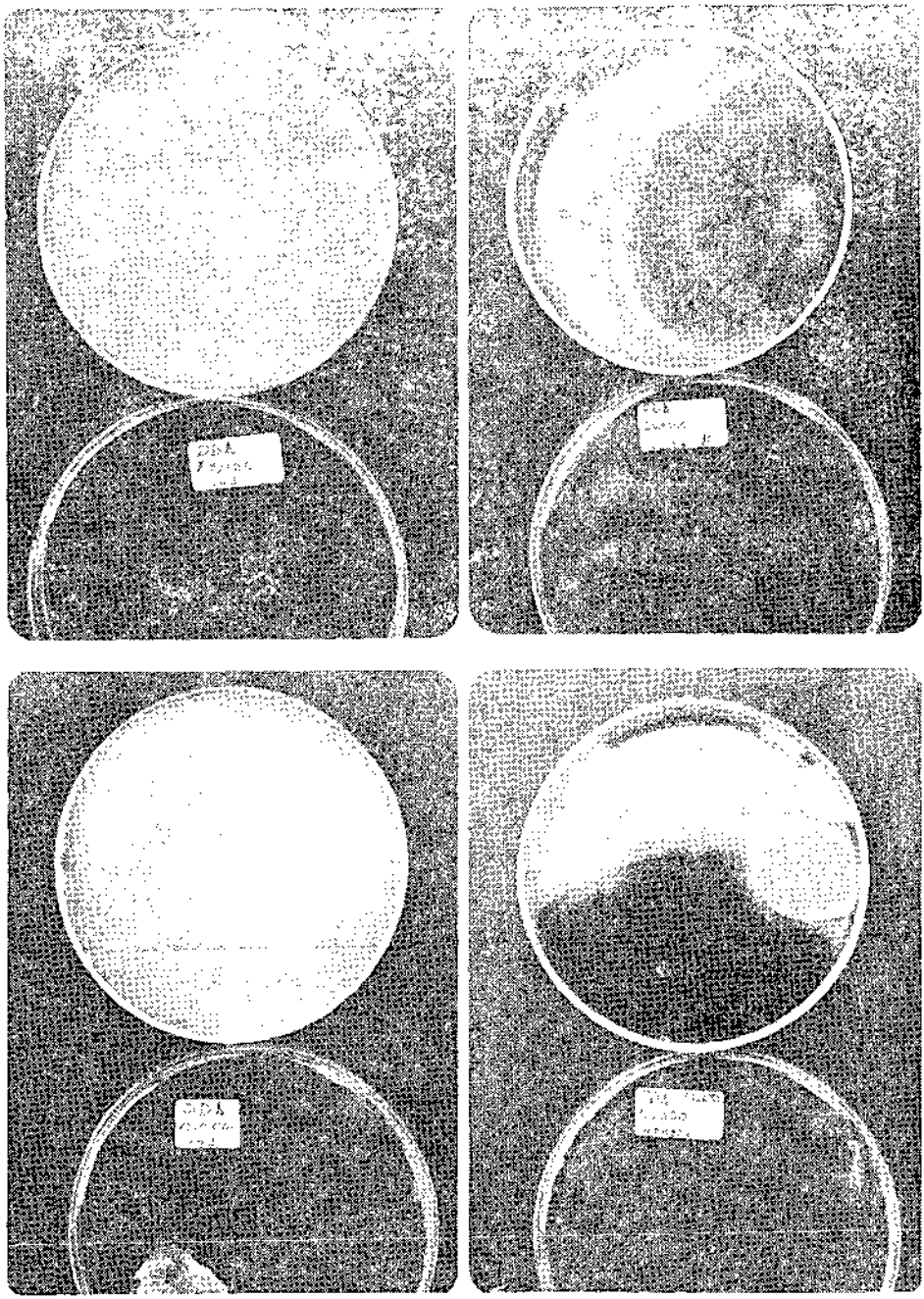


Fig. 5. En el medio PDA se desarrollaron varios tipos de hongos y en algunos casos fue tan rápido su desarrollo que impidió el crecimiento de otros, como se aprecia en las fotos.

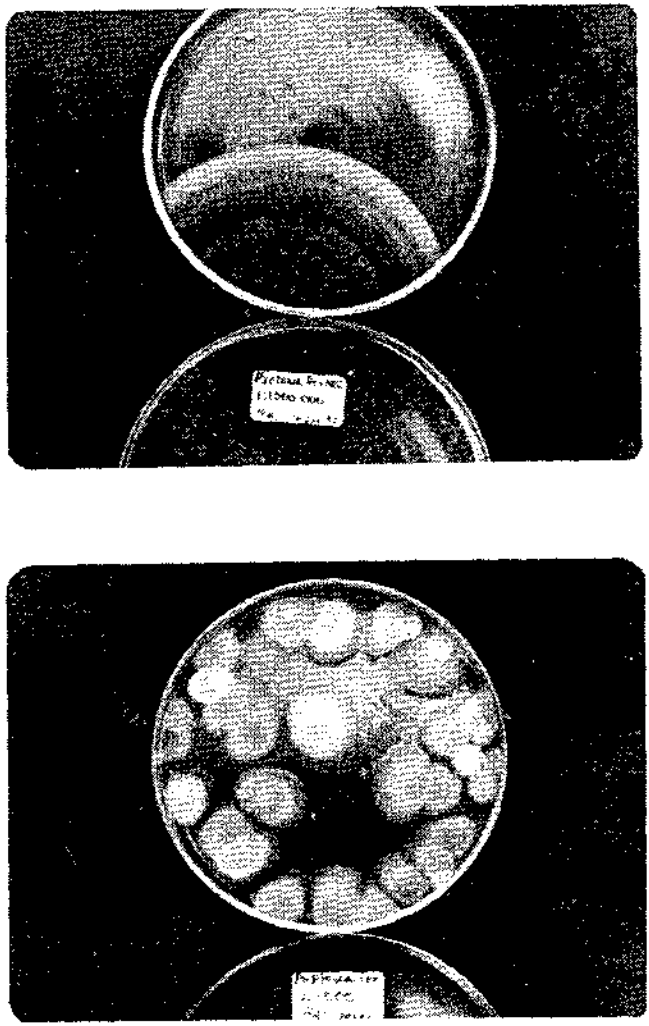


Fig. 9. En estas cajas se usó PeDxA como medio, el número de colonias depende de la dilución como se aprecia en las fotos.

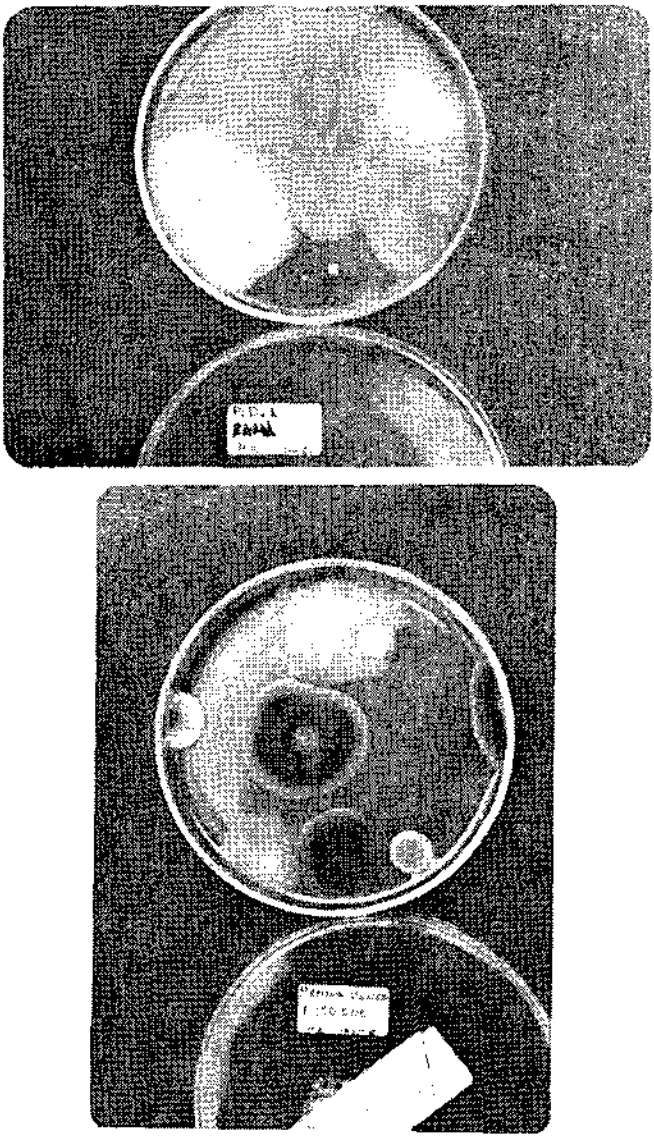


Fig. 10. Medio PeDxA, la caja de arriba con tejido plantado, la de abajo una - dilución y varios tipos de hongos.

1.- El patógeno debe estar siempre asociado con la enfermedad y a su vez la enfermedad no debe aparecer sin que el microorganismo esté o haya estado presente.

2.- El patógeno debe aislarse en cultivo puro y observarse sus características específicas en el medio de cultivo (parásito no obligado) o sobre la planta huésped (parásito obligado).

3.- El patógeno debe inocularse en plantas sanas de la especie o variedad susceptibles, y debe producir los síntomas de la enfermedad.

4.- El patógeno debe reaislarse de la planta huésped inoculada y sus carácterísticas deben ser exactamente como las observadas con anterioridad (paso dos).

Para realizar la prueba de patogenicidad se prepararon con anterioridad 110 macetas con 2 plantas de chile cada una, las plantas se tomaron al azar de almácigos comerciales, previamente desinfectados.

5.5.1 Inoculación de plantas sanas.

La inoculación se efectuó a los 190 días de edad de la planta, cuando se encontraba en plena producción.

Se usaron 2 métodos:

A) se mezcló el medio con la tierra de las macetas
B) Se derramó una solución de medio al follaje

Se usaron 20 macetas de 2 plantas cada una por cada uno de los cuatro medios diferenciales, de estas 20 macetas se inocularon 10 con un método y 10 con otro. A las plantas inoculadas con bacterias se les provocó una herida en la base del tallo ya que las bacterias no penetran directamente al huésped. Hecha la inoculación se regó abundantemente para favorecer las condiciones ambientales al patógeno, posteriormente se mantuvo la humedad en las macetas.

Se incluyó un testigo con 10 macetas.

Todas las macetas se etiquetaron y se llevó un registro de cada una de las plantas.

5.5.2. Síntomas presentados por las plantas inoculadas.

Las plantas inoculadas con los medios que contenía bacterias y actinomicetos no presentaron ningún síntoma de la enfermedad, descartándose que el agente causal fuera de esta naturaleza. Fig.- 11, 12.

Las plantas testigo tampoco presentaron ningún síntoma, si--- guiendo su desarrollo normal. Fig. 13.

Sin embargo, algunas de las plantas inoculadas con hongos presentaron marchitez parcial o total en hojas y ramas, entre los 8 y 15 días después de la inoculación. El marchitamiento parcial luego fue total. Fig. 14, 15.

Las plantas marchitas se encontraban ceñidas al cuello por -- una mancha color café verdoso. Algunas ramas estaban circundadas - por manchas de color que iba del castaño claro hasta en oscuro. -- (fig. 16, 17). Las plantas enfermas presentaban escasas raíces, la corteza de éstas de color café castaño y saturada de agua se des-- prendía fácilmente (fig. 16A). Al abrir los tallos el tejido vascular presentaba un oscurecimiento a lo largo de los vasos. Al observar al microscopio estos tejidos presentaban un desorden en su disposición celular. Raras veces se encontraron raíces rodeadas de micelio blanquecino. De las 80 plantas inoculadas con el hongo el -- 65% presentaron los síntomas de la enfermedad.

5.5.3 Reaislamiento del patógeno.

El reaislamiento se realizó de tallos y raíces. Se usó la técnica del tejido plantado y como medio de cultivo PDA.

Se sembraron 50 cajas con tejidos enfermos en las que se presentaron 4 tipos diferentes de hongos. Se purificaron tomando trocitos de micelio de 1 cm. de diámetro del bordo de las colonias y sembrándose en PDA, este procedimiento se repitió varias veces hasta conseguir los 4 hongos en cultivo puro. Fig. 23.

Nuevamente se inocularon plantas sanas con los 4 tipos de hongos y un grupo de plantas volvió a presentar los síntomas ya des-- critos, dando por un hecho que ese hongo es el agente causal de la marchitez del chile de árbol en la zona de los Altos.

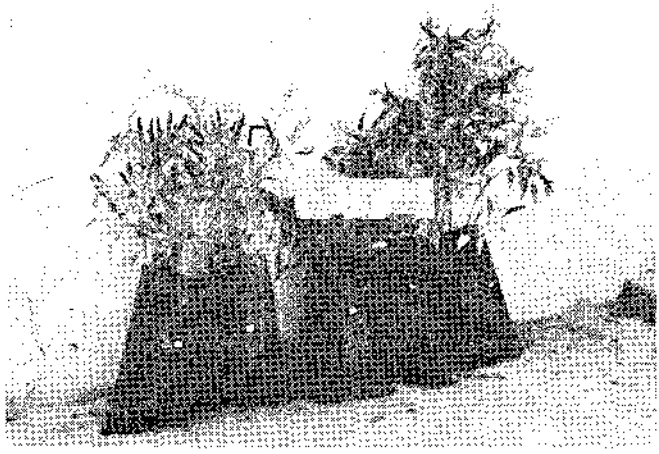


Fig. 11. Las plantas inoculadas con medio que contenía bacterias no presentaron -- ningún síntoma.

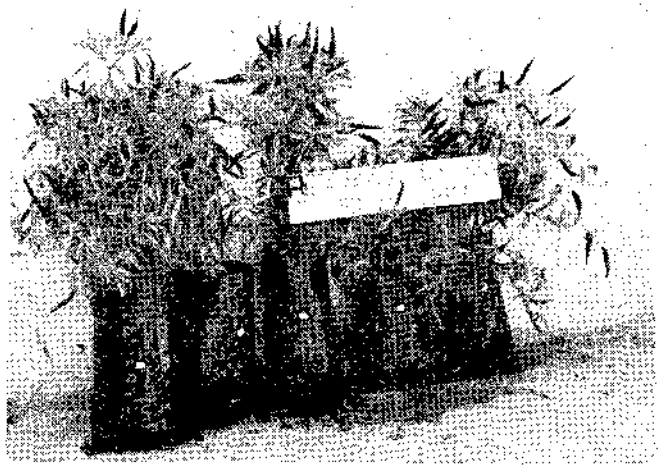


Fig. 12. El inóculo fue actinomicetos. No presentaron síntoma alguno.

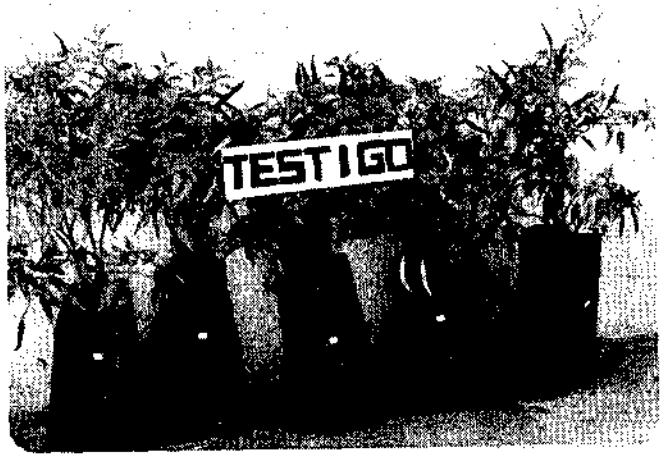


Fig. 13. Las plantas testigo continuaron su desarrollo normal.

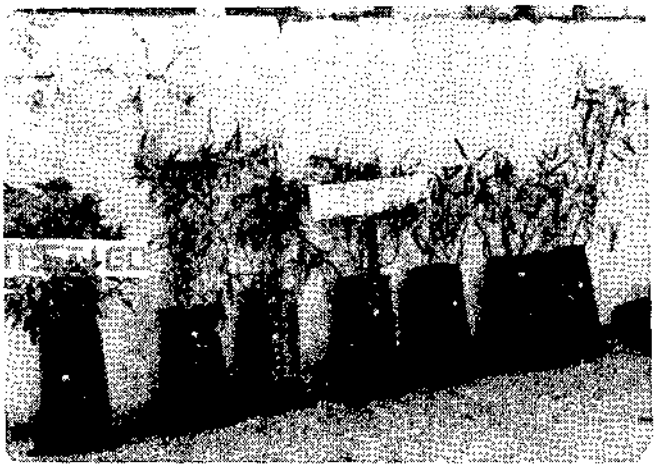


Fig. 14. Plantas inoculadas con hongos desarrollados en PeDxA, obsérvense los diferentes grados de marchitamiento, del testigo hacia la derecha.

Fig. 15. La inoculación se hizo con hongos desarrollados en PDA, a la izquierda de la foto hay una planta testigo, compárese con las plantas enfermas a la derecha.

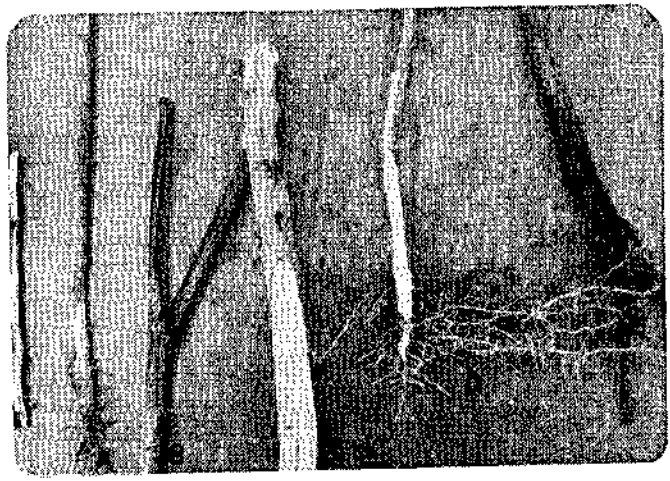


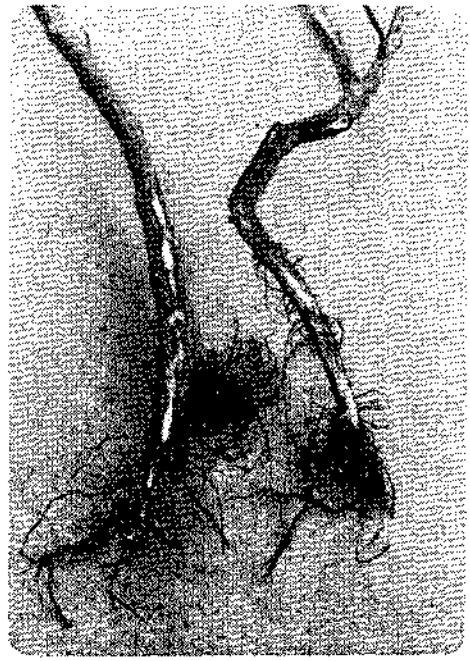
Fig. 16. A,raíz de una planta atacada, compárese con la raíz D que es de una planta sana, B una rama - atacada ceñida por una mancha oscura, C tallo- enfermo y con los vasos oscurecidos, E otra -- raíz atacada.

Fig. 17. Una planta atacada por marchitez, las ramas es tán ceñidas por manchas castaño oscuras.

Un tejido muestra sus células en orden.

Un tejido enfermo presenta un colapso celular

Fig. 18. Las raíces de las plantas enfermas son pocas y la corteza del tallo es oscura y está destruida.



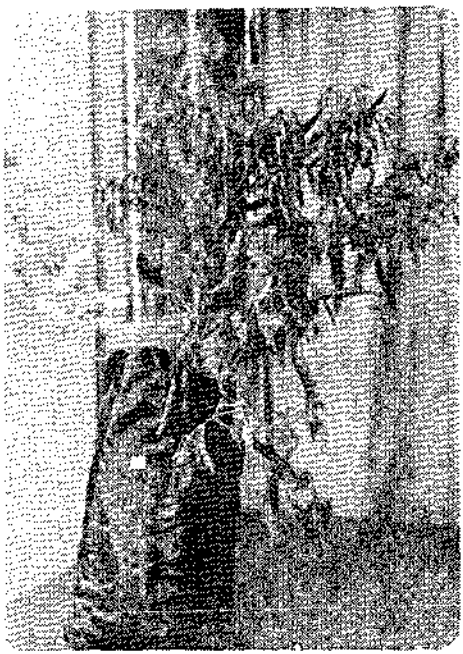


Fig. 19. Esta planta manifiesta los primeros síntomas de la enfermedad un marchitamiento del follaje.

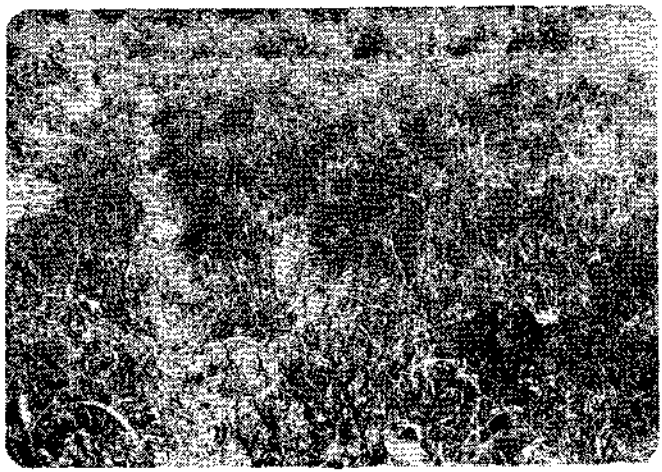


Fig. 20. En condiciones favorables el patógeno puede destruir todo un cultivo, aquí se muestra - un campo atacado que ha sido "abandonado",- al fondo crece la maleza que es una señal - del abandono.

Fig. Este es un campo donde se aplicó todo el paquete tecnológico recomendado para evitar la marchitez, como puede observarse el ataque es menor.

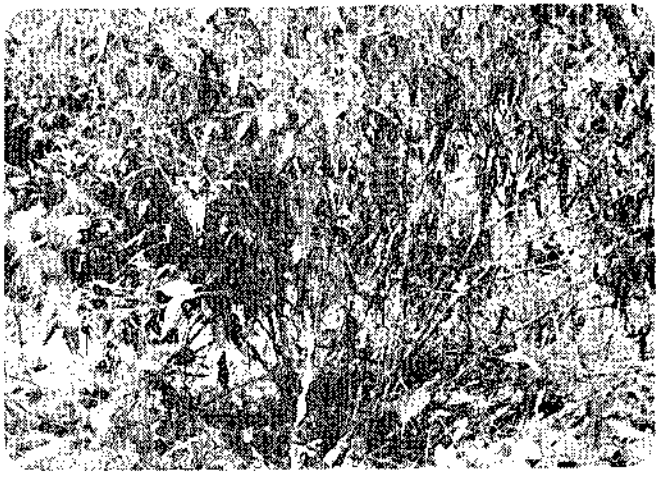


Fig. 22. Es costumbre en la región plantar dos matas de chile juntas a veces una de éstas muere por marchitez y la otra cumple todo su ciclo, quizá exista algún tipo de resistencia o escape, en la parte superior se observa este fenómeno en el campo y abajo en una de las macetas inoculadas.

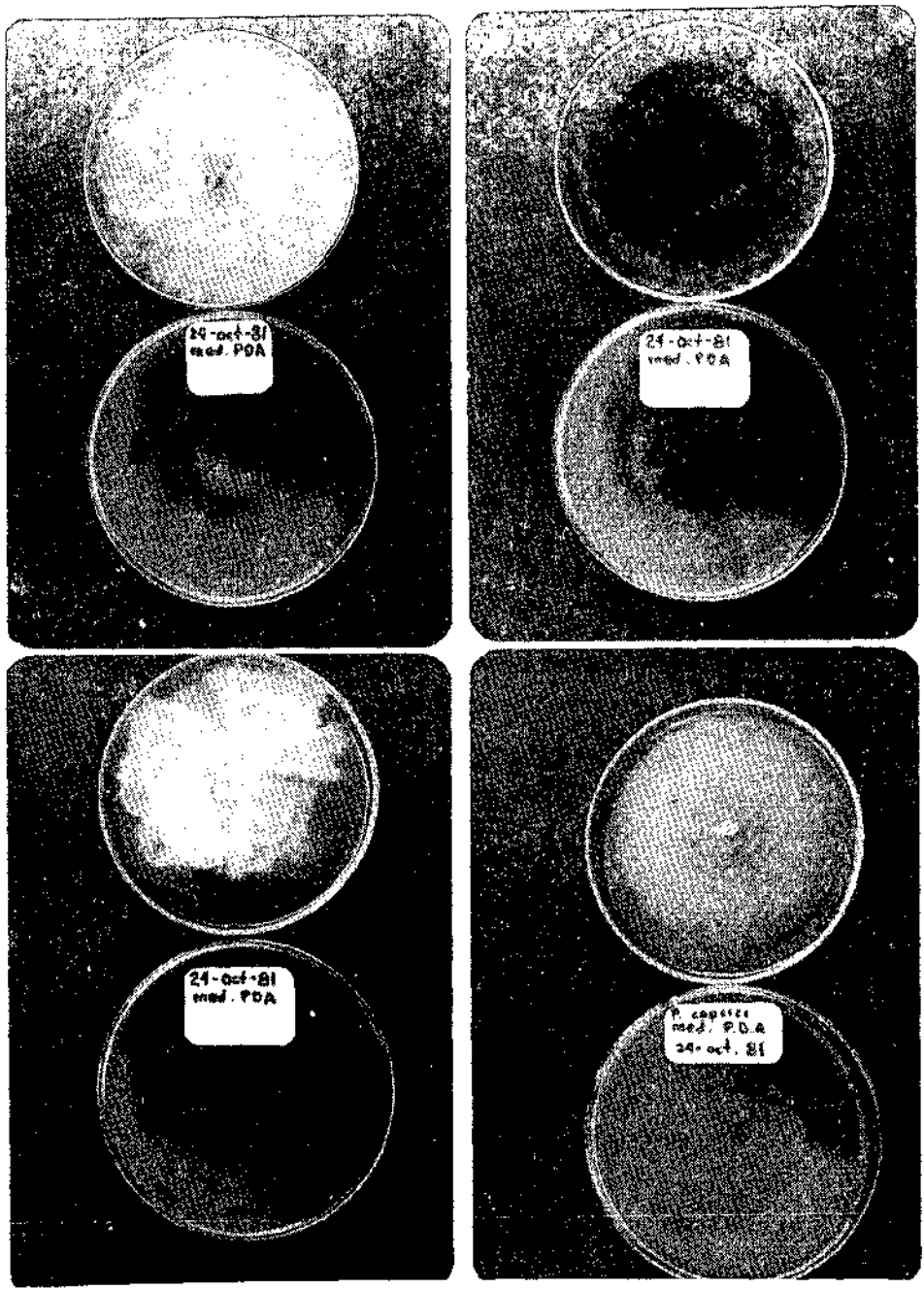


Fig. 23. El reaislamiento se realizó de tallos y raíces y se obtuvieron 4 hongos diferentes en cultivo puro.

6.- RESULTADOS

Características macroscópicas:

En el medio PDA a 29°C las colonias del patógeno presentaron poco micelio aéreo cuando jóvenes, siendo más abundante al pasar el tiempo, color blanco brilloso, de aspecto compacto y pastoso, con una velocidad promedio de crecimiento de .93 cm. cada 24 horas, en 10 días cubre totalmente una caja de petri. Fig. 24.

Características microscópicas:

Micelio transparente (hialino), muy ramificado cuando joven, más alisado al envejecer, bordes granulosos, hifas continuas. Figs. 25-28).

A los 16 días se observaron fructificaciones que resultaron ser zoosporangios, de formas variadas; globosos, alargados, limiformes, etc. Presentan una prominente papila apical o desviada, frecuentemente se observan zoosporangios con dos papilas. Figs. 29, 30, 33.

Zoosporangióforos simples, muy raras veces ramificados, más bien gruesos y cortos. Fig. 31.

Las zoosporas se producen poco después de colocar el hongo en agua destilada, son muy pequeñas de forma un tanto arriñonada, con dos flagelos que las mantienen en constante movimiento. Fig. 33.

No se observaron clamidosporas, tampoco órganos sexuales. Frezzi (1950) los órganos sexuales se producen a los 2 ó 3 meses después de incubados a 18°C.

Las características observadas corresponden a *Phytophthora capsici*.

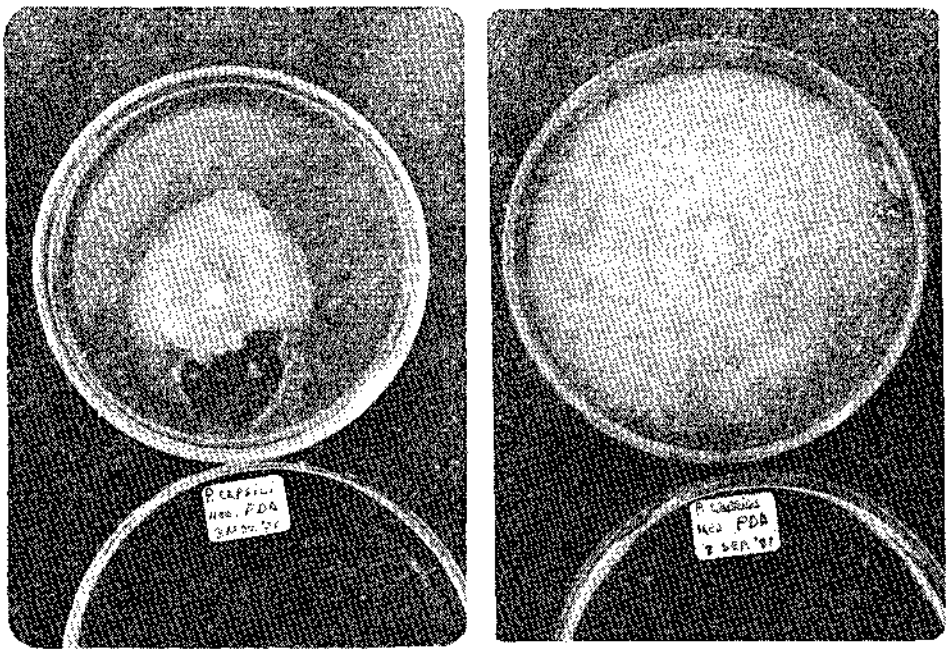


Fig. 24. Dos colonias del patógeno de diferentes edades, la primera a los 4 días de sembrada, la segunda de más de un mes.

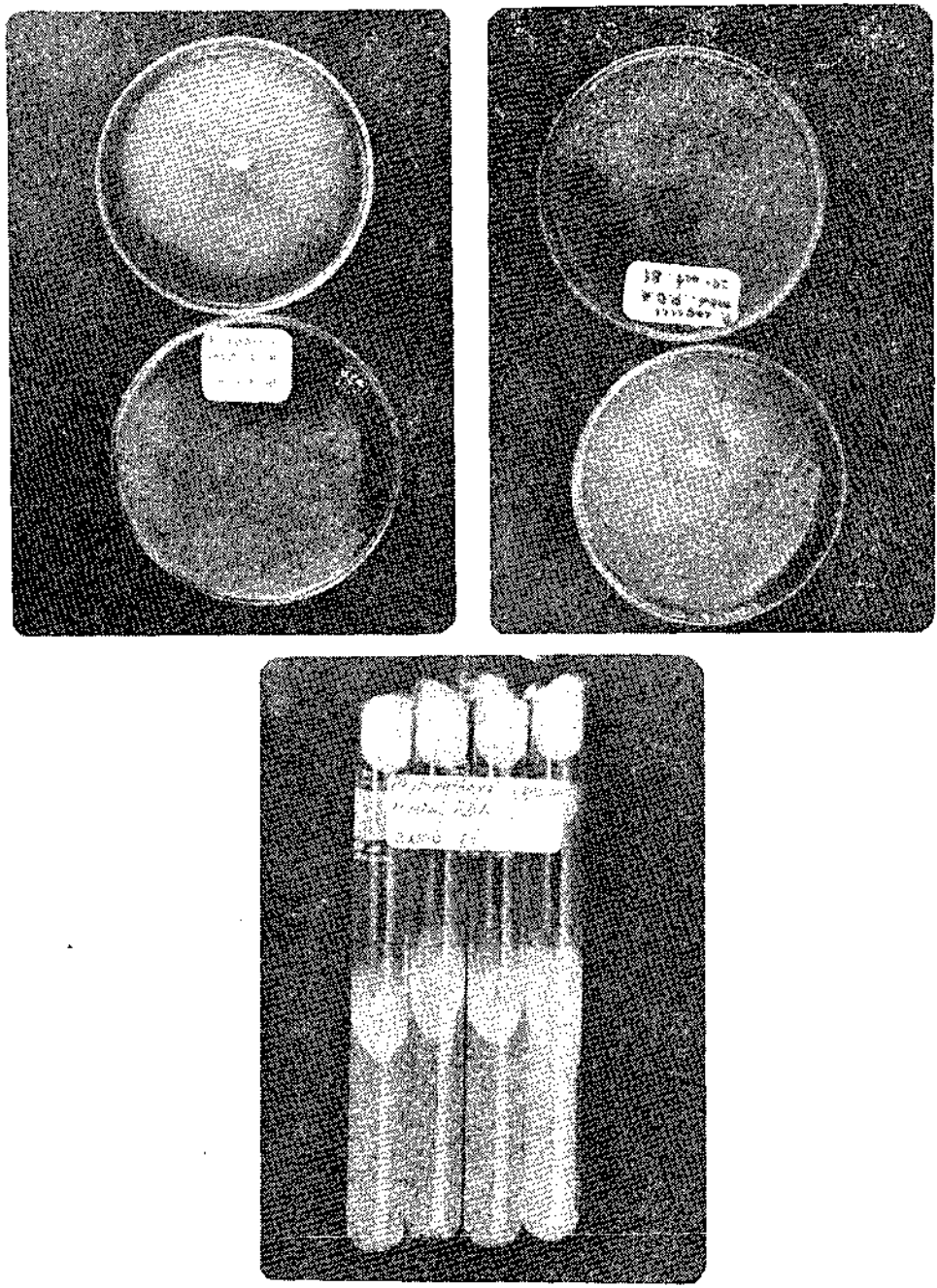


Fig. 24 A. Arriba, dos colonias del patógeno.
24 A. Abajo, Tubos inclinados conteniendo el hongo, se les agregó aceite mineral para su preservación.

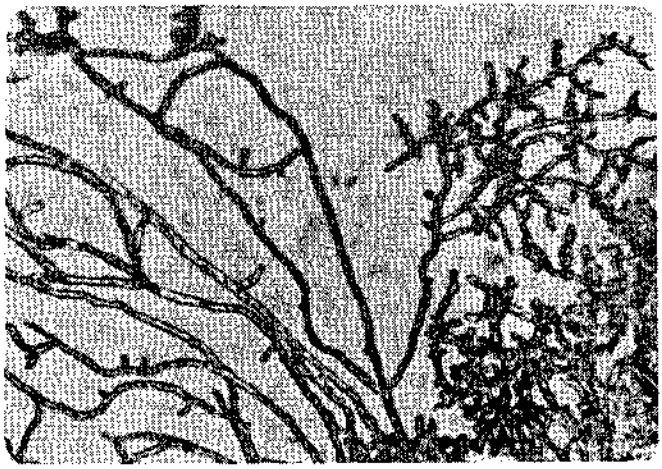


Fig. 25. El micelio del hongo es muy ramificado cuando es joven.

Fig. 26. Con un acercamiento se puede observar un micelio granuloso y transparente (hialino).

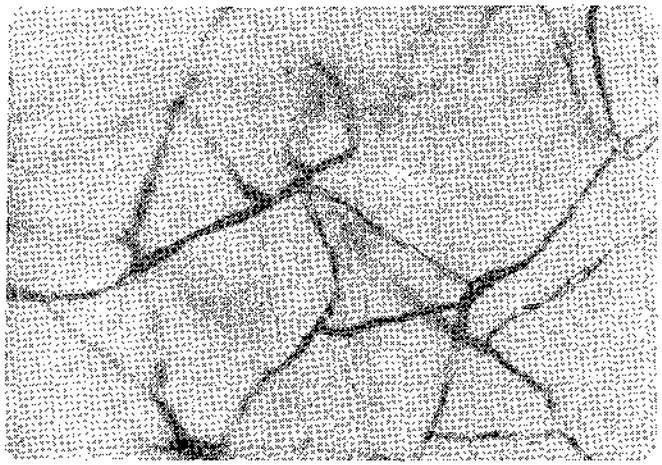


Fig. 27. En esta toma se observa parte del poco ramificado micelio aéreo que produce el patógeno en el medio de cultivo.

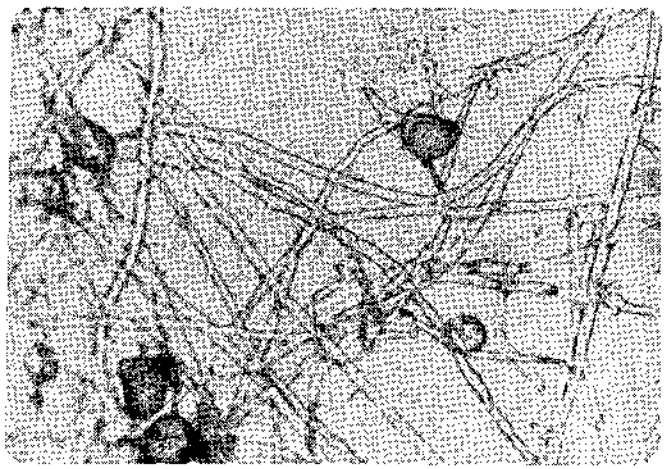
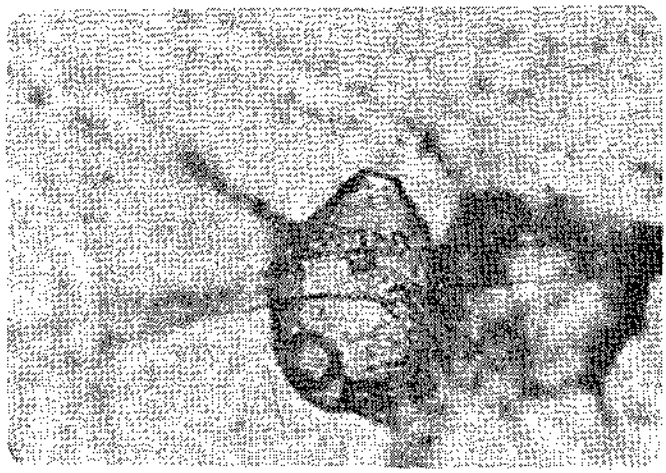


Fig. 28. Al envejecer el micelio se vuelve más alisado, como se puede notar, también se observan algunos frutos.



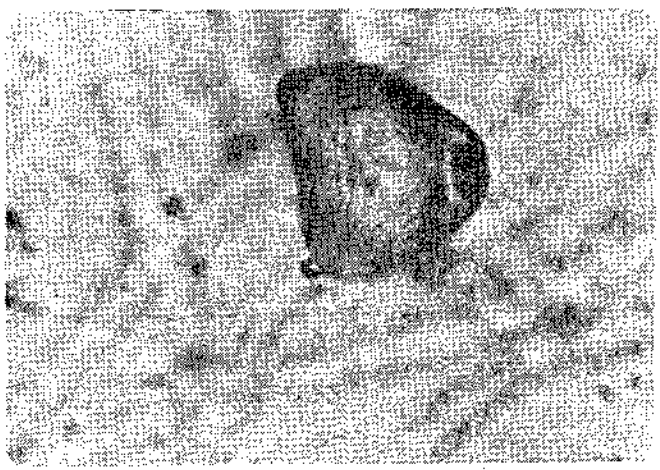


Fig. 29. Foto superior, sobre el fruto se muestra una bifa, nótese la transparencia de ésta, según algunos autores, la mancha redonda que se observa en la parte inferior izquierda del fruto es una vacuola. Foto inferior, un fruto bipapilado.

BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA

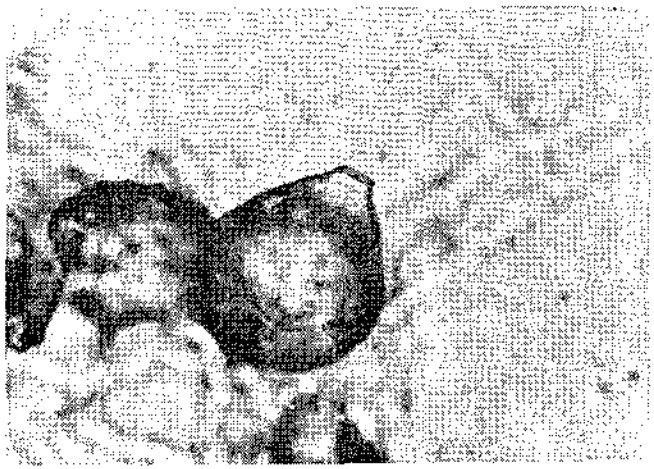


Fig. 30. En un acercamiento se aprecia un zoosporangio globoso y de prominente papila.

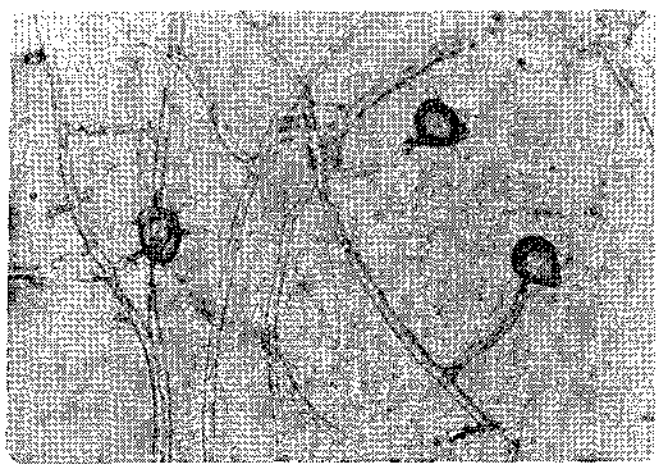


Fig. 31. Los zoosporangióforos son más bien cortos y gruesos como lo muestra esta microfotografía.

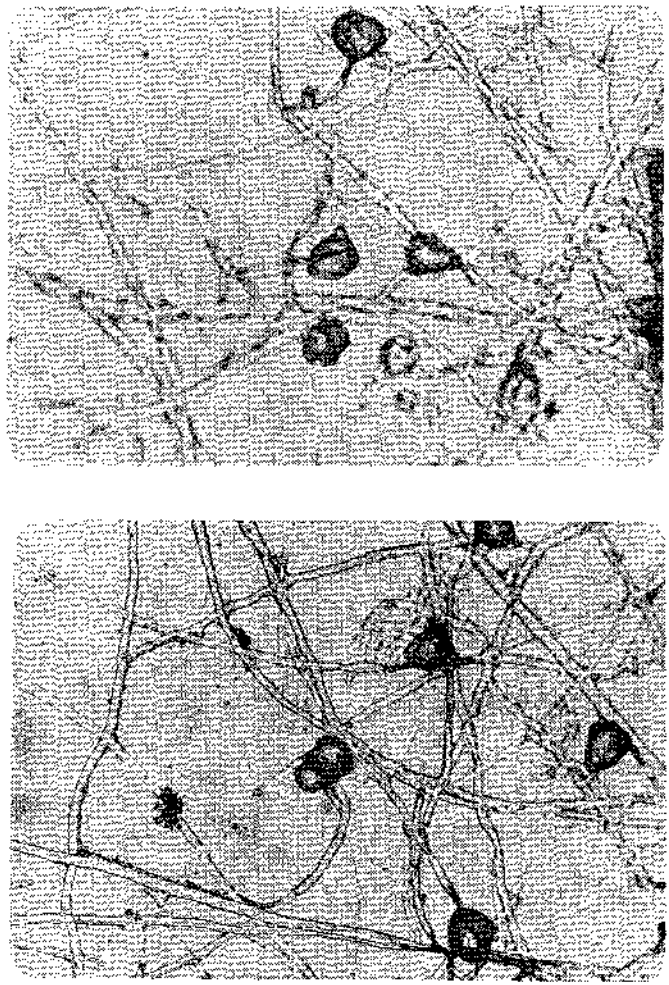


Fig. 32. En el centro de la foto inferior se observa un zoosporangióforo con dos zoosporangios (ramificado).

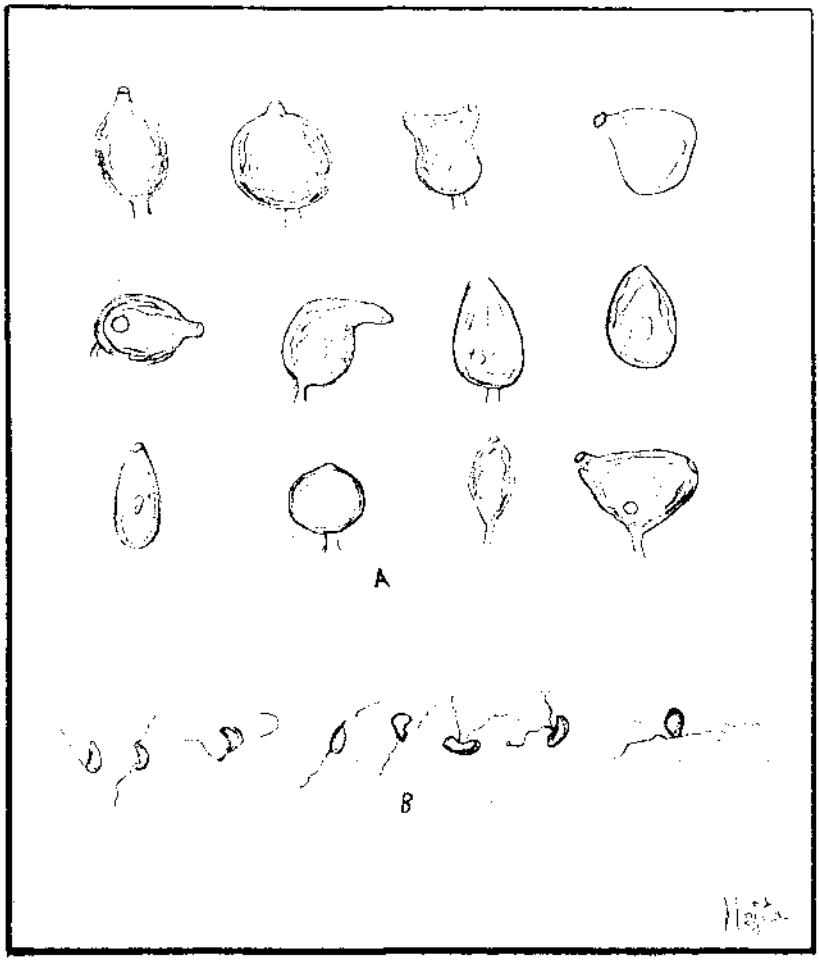


Fig. 34. *Phytophthora capsici*: A, algunas formas de zoosporangios observados, B, zoosporas.

7.- DISCUSION

Para la identificación de un agente causal desconocido que bajo condiciones ambientales favorables y una planta hospedera susceptible determina la presencia de una enfermedad dada, se pueden seguir varias metodologías. La prueba de patogenicidad descrita por Roberto Koch y conocida como los postulados de Koch, Agrios (1978) ha sido útil para determinar la identidad del patógeno, otras técnicas incluyen la observación directa en medios de cultivo y al microscopio de los cuerpos fructíferos del hongo.

Las características morfológicas de *Phytophthora capsici* reportadas por Frezzi (1950), Gilman (1963), Tucker (1928), corresponden a las observadas en el patógeno aislado por la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos.

En la prueba de patogenicidad, la sintomatología observada en las plantas de chile inoculadas corresponde a las observadas en los cultivos comerciales en la región y también por lo general a la descrita por otros investigadores como Doolittle (1953), Rodríguez (1969), Urquijo (1971), Fernández (1978) y García (1979).

Con la excepción de *Phytophthora capsici* la prueba de patogenicidad con otros microorganismos aislados (actinomicetos, bacterias y demás hongos) el resultado fue negativo eliminándose como posibles agentes causales de la "marchitez" del chile de árbol, por lo que se refuerzan las observaciones llevadas a cabo en el PDA (papa dextrosa agar), en otras observaciones detalladas se encontraron las estructuras fructíferas del hongo *Phytophthora capsici* que concuerdan ampliamente con las descritas por investigadores como Tucker (1928) Frezzi (1950) y Gilman (1963).

8.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se acepta la hipótesis:

Ho: La marchitez del chile de árbol (*Capsicum frutesens*) es causada por *Phytophthora capsici*.

Y se rechaza:

Ha: El agente causal corresponde a otro género y especie.

Los medios de cultivo diferenciales pueden usarse en aislamientos cuando se desconoce la naturaleza del microorganismo que se desea aislar (hongo, bacteria, actinomiceto).

Es necesario realizar un mejoramiento genético en las poblaciones criollas para obtener líneas uniformes y con características deseables ya que existe gran variabilidad en la población sobre todo en la forma, tamaño, color y posición del fruto en la planta y sobre todo para detectar posible resistencia genética a la enfermedad.

El cultivo debe manejarse de acuerdo a lo recomendado por las Autoridades Agrícolas dado que se ha observado un mal manejo por parte del agricultor.

Para reducir el efecto dañino de la enfermedad se recomienda:

Desinfección de almácigos con Bromuro de Metilo o Vapám.
Desinfección de semilla con Captan o Arazan.

El terreno donde se va a establecer definitivamente el cultivo debe estar perfectamente nivelado y los surcos deben construirse altos, para evitar excesos y encharcamientos de agua.

Aplicación de fungicidas a la planta en el almácigo y posteriormente en el agua de riego, estos fungicidas pueden ser Captan o Arazan.

Por último se recomienda la rotación de cultivos en terrenos muy infestados por el patógeno, o la introducción de otras variedades con posibilidades de adaptación y resistencia a la enfermedad.

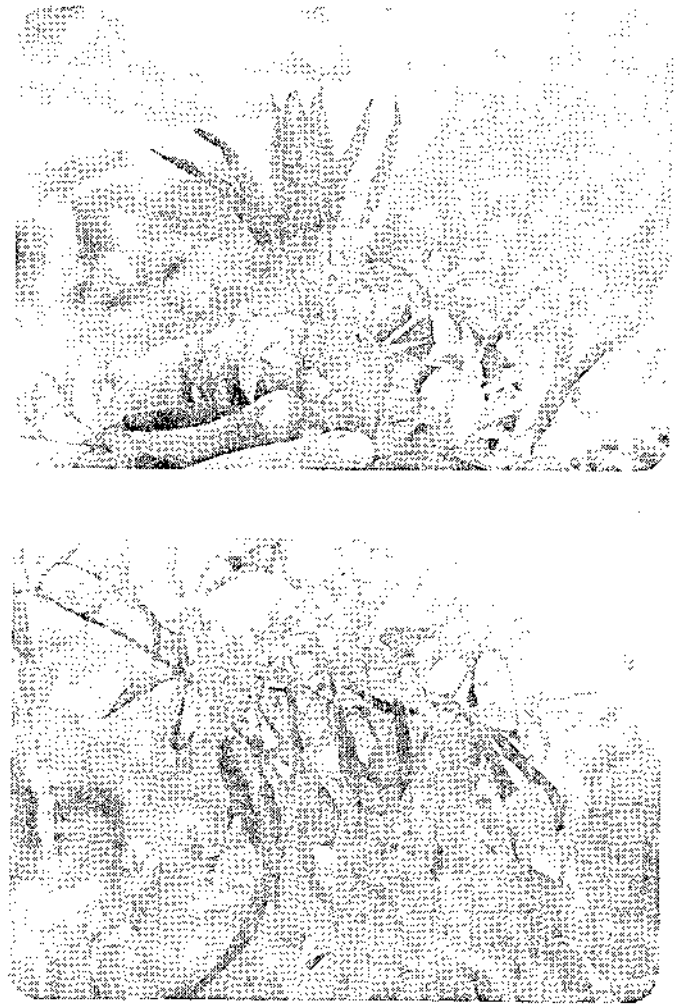


Fig. 34. Por su variabilidad la población del chile de árbol necesita una separación de líneas endogámicas, esta foto muestra diferentes posiciones del fruto en la planta.

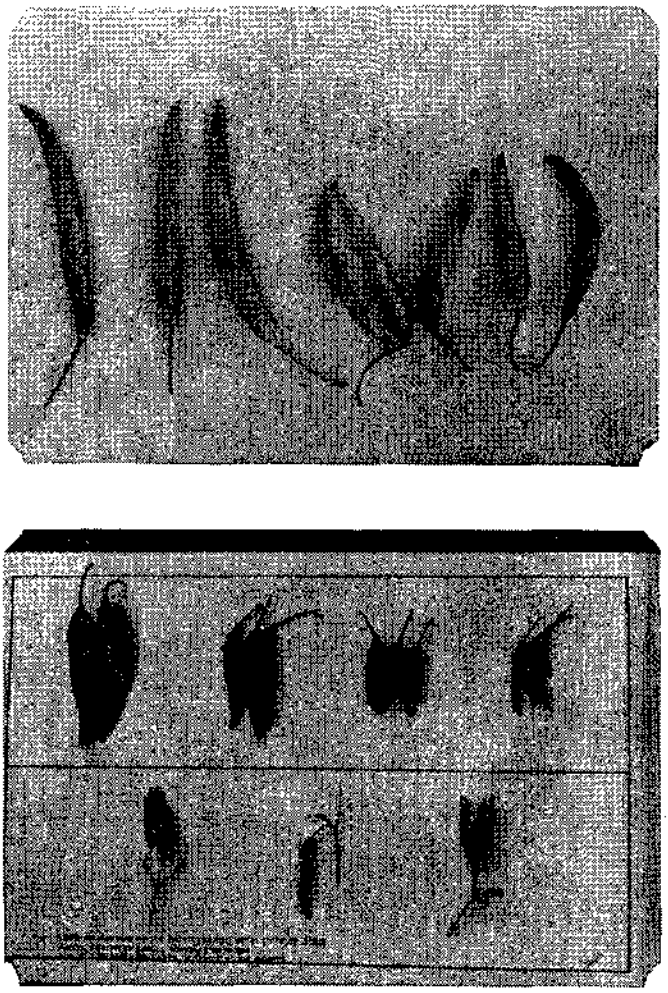


Fig. 35. Diferentes formas, tamaños y posiciones de los frutos del chile de árbol muestran la heterogenidad de la variedad.

9.- BIBLIOGRAFIA

Agrios George N. 1978. Plant Pathology. Academic press. N. York, - S. Francisco, London. p. 27, 213-219.

Betancourt V. A. 1981. Notas del curso de fitopatología. Esc. de - Agricultura, Universidad de Guadalajara, México.

César J. 1942. Estudio sobre la fisiología del *Phytophthora capsici* L. productor del "mildew o tizón" del pimiento en la Argentina.

Departamento de Agricultura E.U.A. 1963. Enfermedades de las plantas. Ed. Herrero. p. 241-242, 540-545.

Fernández V. 1978. Introducción a la fitopatología, vol. III hongos. Ed. Inta. B. Aires, Argentina. p. 222-229

Frezzi N. 1950. Las especies de "Phytophthora" en la Argentina. Dirección General de Investigaciones Agrícolas del Ministerio de - Agricultura y Ganadería. B. Aires, Arg. p. 69-74.

García A. 1979. Patología vegetal práctica, Ed. Limusa, México y - p. 9-12, 129.

Gilman J. 1953. Manual de los hongos del suelo. Ed. CECSA. México-Méx.

Guerrero A. Laborde A. 1981. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in México. INIA. CIAB. Celaya,- Méx.

Nieto L. 1968. Estudios sobre el control químico de la marchitez - del chile *Phytophthora capsici* L. Tesis M.C. Col. Posgraduados. -- Chapingo, Méx.

Redondo J.E. 1974. Estudio preliminar en la obtención de posibles- plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas del hongo *Phytophthora capsici* L.Tesis M.C. Col. Posgraduados. Chapingo, -- Mex.

Rodríguez M. 1969. Estudio sobre el mecanismo de infección y la -- causa de la marchitez de las plantas de chile (*Capsicum annum*) ocasinado por *Phytophthora capsici* L. Tesis profesional, Chapingo, - Méx.

Steekelenburg N.A. Van. 1980. *Phytophthora* root rot of sweet pe-- pper. Institute for plant protection. Netherland J. plant pathology 86. Holanda, p. 259-264.

Toler W.H. 1979. Methods in plant pathology class notes. Texas A&M. University. College station. Texas, U.S.A.

Urquijo P., y otros. 1971.Patología vegetal agrícola. Ed. Mundi--- prensa. Madrid, España. p. 173-174.