



UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Uso de marcadores moleculares de ADN asociados con la resistencia a (*Phytophthora capsici*) en el cultivo del chile

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

JOSÉ IGNACIO GARCÍA GONZÁLEZ

ASESOR INTERNO

DRA. DIANA ELINOS CALDERON

ASESOR EXTERNO

DR. REINALDO MÉNDEZ AGUILAR



Agradecimientos

A todos aquellos que hicieron posible la creación de una Institución tan noble y verdadera como la Universidad abierta y a Distancia de México (UnADM) así como todos los docentes que hicieron posible el desarrollo de mi educación.

Al Dr. Reinaldo Méndez Aguilar del Campo Experimental las Huastecas, quien me apoyo en el desarrollo de este Proyecto Terminal, a la Bióloga Adriana Guadalupe García Andrio quien fue parte fundamental en el aprendizaje de laboratorio, al Ing. José Luis del Ángel Ruiz quien fue de ayuda imprescindible en curso de mi carrera.

Dedicados a mi esposa Alma, hijos Simcha y Amlí que son el pilar de mis fuerzas y deseos para salir adelante, su paciencia y apoyo incondicional. También dedico a mi familia hermosa, mi madre Celia, padre Jaime, mis hermanos Miguel, Luis y Jaime. De manera especial a mi padre que su nombre sea recordado como un ser lleno de verdad y a mi tía María Fidela quien siempre me alentó a ser un hombre de principios, así como a mi amigo Rubén Mata Acero que su nombre sea recordado por todos aquellos que lo conocimos, inspiración de lucha y esperanza.

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Propiedades Nutricionales del chile.....	5
Cuadro 2. Clasificación de Taxonomía para Capsicum.....	6
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de P. capsici.	8
Cuadro 4. Oligonucleótidos de genes de resistencia a P. capsici.	17

Índice de Figuras

Figura 1. Phytophthora capsici esporangio en forma de limón.....	8
Figura 2. Pudrición de la raíz por P. capsici.	11
Figura 3. Marchitez de la planta.	12
Figura 4. Ciclo de vida de Phytophthora capsici.....	13
Figura 5. Marcador SCAR OpD04.717 ligado el QTL Phyto 5.2 que confiere resistencia a P. capsici.....	20
Figura 6. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular OpD04.717 en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.	30
Figura 7. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular OpD04.717 en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.	31
Figura 8. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular OpD04.717 en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.	32
Figura 9. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular PR-1 en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.	32
Figura 10. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular PR-1 en diversas accesiones de chile jalapeño.	33
Figura 11. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular PR-1 en diversas accesiones de chile jalapeño y el CM334 testigo resistente.	34
Figura 12. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular EAS en diversas accesiones de chile jalapeño y el CM334 testigo resistente	34



Índice de Diagrama

Diagrama 1. Protocolo para el uso de marcadores moleculares de DNA	29
--	----

Índice de Tablas

Tabla 1. Volumen de uso de ADN y Agua en el MIX para PCR.	25
Tabla 2. Comparativo de genes de resistencia..	35

Índice

I. Resumen	1
II. Justificación	2
III. Marco Teórico.....	3
1. Importancia en producción económica.....	3
2. Uso y propiedades nutricionales del chile	4
2.1. Uso culinario	4
2.2. Propiedades nutricionales	4
3. Taxonomía del género	5
4. Morfología General.....	6
5. Características generales del genero <i>Phytophthora</i>	7
5.1. Taxonomía	7



5.2.	Morfología de <i>Phytophthora capsici</i>	8
6.	Enfermedades y síntomas del Chile.....	9
6.1.	Mancha bacteriana.....	9
6.2.	Virus.....	10
6.3.	Pudriciones de raíz.....	10
6.4.	Síntomas.....	11
7.	Condiciones de reproducción.....	12
8.	Esquema de reproducción de <i>Phytophthora capsici</i>	13
9.	Líneas de Chile reportadas como resistentes a <i>Phytophthora capsici</i>	14
10.	Manejo de la enfermedad.....	14
10.1.	Aplicaciones agroquímicas.....	14
10.2.	Mejoramiento genético tradicional.....	15
11.	Uso de Marcadores Moleculares de ADN.....	15
11.1.	¿Qué es un marcador molecular?.....	16
11.2.	Ventajas de los marcadores moleculares de ADN.....	16
11.3.	Genes /QTL de resistencia a <i>Phytophthora capsici</i>	17
11.3.1.	Genes mayores de resistencia.....	17
11.3.2.	Genes menores de resistencia.....	18
IV.	Hipótesis.....	21
V.	Objetivos.....	21
VI.	Metodología.....	22
13.	Recolecta de material vegetal.....	23
14.	Extracción de ADN vegetal.....	23



15.	Preparación de gel Agarosa al 1%.....	24
16.	Condiciones generales de preparación de reactivos, Oligos y marcador de peso molecular.....	24
16.1.	Preparación de Oligo liofilizado.....	24
16.2.	Preparación de Reactivos para MIX de PCR.....	24
16.3.	Preparación de marcador molecular de pb.....	26
17.	Uso de marcador molecular (Oligos) SCAR <i>OpD04.717</i>	26
17.1.	Condiciones de PCR.....	26
18.	Uso de marcador molecular (Oligos) <i>PR-1</i>	27
18.1.	Condiciones de PCR.....	27
19.	Uso de marcador molecular (Oligos) <i>EAS</i>	27
19.1.	Condiciones de PCR.....	27
VII.	Resultados.....	30
VIII.	Análisis de resultados.....	36
IX.	Conclusiones.....	38
X.	Cronograma.....	39
XI.	Referencias.....	40

I. Resumen

Phytophthora capsici es un hongo conocido como secadora de raíz esta enfermedad afecta significativamente al cultivo del chile, ocasionando pérdidas en la calidad del fruto y rendimiento del cultivo del chile (*Capsicum* spp.), principalmente en lugares muy húmedos y con altas temperaturas. El uso de marcadores moleculares es una importante herramienta de la biotecnología para programas de mejoramiento genético, como lo es en la identificación de genotipos de chile que contienen genes asociados con la resistencia al patógeno. El objetivo del presente proyecto fue buscar genes asociados con la resistencia a *P. capsici* en accesiones de chiles jalapeños que puedan ser utilizados en programas de mejoramiento genético tradicional o mediante selección asistida por marcadores moleculares de ADN (MAS). El experimento se realizó en el CEHUAS (Campo Experimental Las Huastecas)-INIFAP durante el periodo agosto 2018-mayo 2019. Como material genético se utilizaron 22 accesiones de chile jalapeño y un testigo resistente CM334. La extracción de ADN se hizo mediante el Kit comercial Wizard Genomic (Promega®). Los marcadores moleculares SCAR *OpD04.717*, *PR-1* y *EAS* no permitieron discriminar entre genotipos susceptibles de los resistentes. El tamaño de banda del marcador *OpD04.717* fue aproximado a 700 pb, el cual se mostró como marcador polimórfico, el marcador *PR-1* presentó una banda de 301 pb el cual se mostró como marcador monomórfico y por último el marcador *EAS* el cual mostró una banda de 200 pb presentándose como un marcador monomórfico. Por lo tanto, no se logró identificar nuevos materiales de chile resistentes que sean capaces de ser utilizados en programas de mejoramiento genético por vía tradicional o mediante (MAS).

Palabras clave: Marcador molecular, Chile, Genes, Resistencia



II. Justificación

Es necesario buscar nuevas formas para disminuir las pérdidas causadas por pudriciones de la raíz (*P. capsici*) para incrementar la producción y disminuir la aplicación de agroquímicos. Una alternativa es el mejoramiento genético para la generación de mejores o nuevos materiales. Es por ello de suma importancia identificar genotipos con resistencia a dicha enfermedad. En nuestro país se han descubierto 19 criollos originarios de Morelos resistentes a *P. capsici* que pueden ser utilizados para obtener variedades o híbridos resistentes a este patógeno (Gil-Ortega, 1991), sin embargo, existe un gran número de accesiones de chile tipo jalapeño, serrano, entre otros, que no han sido caracterizadas para estos fines y que pueden ser fuente importante de resistencia a *P. capsici*. En la actualidad se están utilizando los marcadores moleculares de ADN para identificar accesiones con resistencia a enfermedades ya que no son afectados por el ambiente y se puede realizar en etapas tempranas de la planta, reduciendo con esto costos y tiempo. La importancia de la identificación de fuentes de resistencia/tolerancia a enfermedades es que estas pueden ser incluidas en programas de mejoramiento genético, ya sea tradicional o por selección asistida mediante marcadores moleculares ADN (MAS) para la obtención de variedades o híbridos que impacten en el mercado nacional e internacional.



III. Marco Teórico

Capsicum annuum L.

1. Importancia en producción económica

La producción de chile (*Capsicum* spp.) es la actividad hortícola más importante de México (González-Pérez *et al.*, 2004). Además de un producto con presencia mundial, éste es un cultivo originario de nuestro país y parte simbólica del imaginario culinario y cultural. La riqueza genética del chile en México se debe en gran parte a la diversidad de climas y suelos (SIAP, 2013).

Desde décadas pasadas la producción de esta gran e importante hortaliza ha generado un significativo aumento en la economía mexicana. En el 2007 la producción mundial de chile (*Capsicum* spp.) fue poco más de 30 millones de toneladas. México aportó 6.8 % del total y se usó 27.5 % de la superficie destinada al cultivo de hortalizas, generando más de \$ 5 000 millones de pesos, que representó 23 % de la producción hortícola nacional (García-Rodríguez *et al.*, 2010).

Para el el año 2015 se sembraron 512,000 ha de este grupo hortícola con una producción de 2 millones 177 mil toneladas, con un valor de 14 mil 268 millones de pesos. Al respecto de su producción, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) informa que en 2016 se cultivaron 173,146 hectáreas de este producto en México, en las cuales se produjo 135,720 toneladas de chile seco y 2 millones 601,308 toneladas de chile verde, que rebasa los 22 mil 500 millones de pesos (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015; SAGARPA, 2016).

El valor de la exportación de enero-agosto de 2016, fue de 789 millones de dólares lo que representa un aumento de 31.6%. Así mismo ubicándose como el



segundo productor de Chile a nivel mundial, donde sus principales destinos son EUA, Canadá y España, entre otros. Destaca que 92% de la producción de Chile verde en el país correspondió a los chiles jalapeño, morrón, poblano, serrano, chilaca y Anaheim (SAGARPA, 2016; SIAP, 2017).

2. Uso y propiedades nutricionales del Chile

2.1. Uso culinario

Dentro del proceso de comercialización, los chiles ya sea (Jalapeño, Serrano, Ancho y Guajillo, otros de menor importancia son Pasilla, Carricillo, de Árbol y Mirador) se clasifican en varios tipos dependiendo del grado de madurez del fruto, que serían los tipos verdes y secos; en cambio por su contenido de picor se les denomina, picosos y dulces (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Por su parte, el término genérico “secos”, se utiliza para un gran número de chiles que se dejan madurar y secar o deshidratar, los cuales ya secos son muy utilizados en la cocina mexicana, principalmente se destinan a la industria artesanal de mole; algunos otros chiles además de secos son ahumados como el Chile chipotle y morita (Bosland, 1996; Fonnegra y Jiménez, 2007; Castro-Rocha *et al.*, 2012).

2.2. Propiedades nutricionales

El consumo y cultivo del Chile se han incrementado debido a que es rico en vitaminas y minerales (Cuadro 1). (Heiser y Smith, 1953; Marín *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2011; Pérez-Castañeda *et al.*, 2015).



Propiedades nutricionales

Nutrimiento	Calidad
Vitamina A	1000UI
Vitamina B1	0.03mg
Vitamina B2	0.05mg
Vitamina B5	0.20mg
Vitamina B12	0.45mg
Vitamina C	120mg
Hierro	0.5mg
Potasio	234mg
Magnesio	11mg
Fósforo	23mg
Sodio	58mg

Cuadro 1. Propiedades Nutricionales del chile. Extraído de (SIAP, 2010)

3. Taxonomía del género

El género *Capsicum* es miembro de la familia Solanaceae el cual se clasifica (Cuadro 2). El género *Capsicum* consiste en aproximadamente de 31 especies silvestres y cinco especies domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*. De estas. *C. annuum* es la más comúnmente cultivada a nivel mundial, seguido de *C. frutescens*. (Bosland y Votava, 2003; Wang y Bosland, 2006; Castañón-Nájera *et al.*, 2008).

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionita

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solonales

Familia: Solonaceae

Género: *Capsicum* L.

Especie: *C. annuum* L.

Especie: *C. chinense* Jacq

Especie: *C. pubescens* Ruiz

Variedad: *C. annuum* var. *annuum* L.

Variedad: *C. annuum* var. *glabriusculum*

Variedad: *C. baccatum* var. *baccatum* L.

Variedad: *C. baccatum* var. *pendulum*

Cuadro 2. Clasificación de Taxonomía para *Capsicum*.

Extraído de (Pérez *et al.*, 2015)

4. Morfología General

Es una planta cultivada generalmente como anual, aunque en condiciones específicas puede ser bianual, en condiciones de invernadero suele crecer hasta 2 m de altura, es un arbusto perene de tamaños diferentes, desde rastreros hasta arbustivos, aunque la mayoría de ellos viven menos del año, algunos cultivares duran varios años y llegan a ser arbustos leñosos normalmente de 1.50 m de altura dependiendo de la variedad y de las condiciones climáticas. Su raíz está formada por una raíz principal de gran vigor rodeada por raíces laterales, es muy ramificada y vellosa, la mayoría de sus raíces se localizan a una profundidad de 5 a 40 cm y sus raíces laterales pueden llegar a una profundidad de 1.20 cm. Sus



tallos son ramosos, la ramificación, varía de acuerdo con el genotipo y son de color verde oscuro. Sus flores solitarias son de color blanco o azul. La hoja es de forma oval, elíptica o lanceolada, de margen entero, glabra normalmente de color verde. Sus frutos son tipo baya inmaduros de color verde y rojos cuando maduran pueden alcanzar 20 cm de longitud. Y por último la semilla es de color amarillo brillante, claro o café con una longitud de 3 a 5 mm (León,1987; Cortez, 1992; CATIE, 1993; FAO, 2002; Moreno, 2003; Fonnegra y Jiménez, 2007; Anguiano, 2010; FAO, 2010).

Phytophthora capsici

5. Características generales del genero *Phytophthora*

5.1. Taxonomía

Antón de Bary fue el primero en acuñar el nombre de *Phytophthora* (destructor de plantas) en 1876 cuando describió el tizón tardío de la papa, *Phytophthora infestans* una especie para un nuevo género (Erwin *et al.*, 1983). Hay más de 60 especies del género *Phytophthora* (Cuadro 3) y muchos son patógenos destructivos de plantas. Esfuerzos extensivos son dirigidos al control de *Phytophthora* cada año, los cuales causan serias pérdidas en los cultivos (Goodwin, 1997).

Dominio: Eukaryota
Reino: Straminipila
Phylum: Oomycota
Clase: Oomycetes
Orden: Phythiales
Familia: Pythiaceae
Género: <i>Phytohphthora</i>
Especie: <i>capsici</i>

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *P. capsici*. Extraído de (Kirk *et al.*, 2001)

5.2. Morfología de *Phytohphthora capsici*

P. capsici produce esporangios en simpodio simple, esporangios de forma ovoide, elongada, elipsoidal, (Figura 1). (Leonian, 1922).

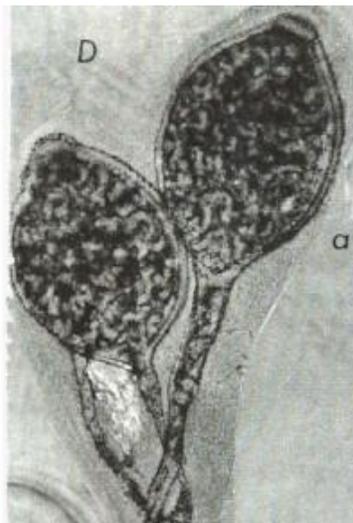


Figura 1. *Phytohphthora capsici* esporangio en forma de limón
 Extraído de (Cruz-Alcalá *et al.*, 2000)



6. Enfermedades y síntomas del Chile

En 1922 Leonian describió a *Phytophthora capsici* como responsable de la marchitez del chile en Nuevo México, enfermedad policíclica, altamente destructiva que provoca pérdidas del 60 % o más. El proceso de producción del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) está determinado por una serie de factores que favorecen o limitan el desarrollo de esta hortaliza. De los factores que afectan en mayor medida la producción del cultivo son las enfermedades causadas por oomicetes/hongos, bacterias y virus (Muñoz-Villalobos *et al.*, 2013; Palmar-Martínez *et al.*, 2017).

En plantas de chile los patógenos vasculares como *Phytophthora* spp. interrumpen el suministro de agua por medio del xilema, y provocan la aparición de síntomas como la marchitez y defoliación del chile. Una de las limitantes del sistema de producción es esta enfermedad patógena que puede causar pérdidas del 40 al 60 o hasta el 100% en caso extremos (Guillen-Cruz *et al.*, 2006; Velázquez-Valle y Revele-Torres, 2017).

En la región noreste, entre las enfermedades más importantes se encuentran:

6.1. Mancha bacteriana

El agente causal es la bacteria *Xanthomonas campestris*, cual se manifiesta tanto en plántulas como en plantas adultas. En plántulas, la infección puede ocasionar una defoliación severa. Las lesiones se presentan en las partes de la hoja, frutos, péndulo y cáliz. Los tallos también son susceptibles, pero generalmente el follaje es infectado en mayor grado (Bashan y Okon, 1986). Afectando con esto el rendimiento y la calidad del fruto de esta hortaliza, principalmente en regiones tropicales (Hong *et al.*, 2011).



6.2. Virus

Los virus son entidades infectivas, submicroscópicas, que sólo se multiplican intracelularmente y son potencialmente patógenas (Francki *et al.*, 1985). En México se reportan las enfermedades virales desde 1966 en la región de las Huastecas. En la actualidad, afectan calidad del fruto (ciclo vegetativo más corto, síntomas como enanismo, necrosis, clorosis y deformaciones) y rendimiento en todas las áreas productoras del país, con niveles de infección que varían de 20 a 100% de daño (Urías y Alejandre, 1999; González-Franco *et al.*, 2014). Entre los virus más frecuentes en el cultivo del chile se encuentran: Virus del Mosaico del Pepino (CMV), El Virus Y de la Papa (PVY), Virus Mosaico del Tabaco (TMV), Virus del Mosaico del Tomate (ToMV), Virus del Moteado del chile (PepMoV), Virus del Moteado suave del Chile (PMMoV), Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (TSVW), Virus del Mosaico Dorado del Chile (PepGMV), Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) (González-Franco *et al.*, 2014).

6.3. Pudriciones de raíz

Esta enfermedad se caracteriza por síntomas como marchitez, clorosis, defoliación, pérdida de estructuras reproductivas, necrosis de raíces, entre otras, (Figura 2). Así mismo ha sido asociada a un complejo de hongos entre los que destacan *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phythium* spp. y *Verticillium* spp., los cuales pueden presentarse individualmente o en combinación en plantas (Velásquez y Medina, 2003). Esta enfermedad ha sido reportada en todos los estados productores de nuestro país (Guigón-López y González-González, 2001). Las pérdidas ocasionadas por este hongo a nivel nacional oscilan entre un 10 y un 60%, mientras que en áreas específicas del bajío y puebla pueden alcanzar el 100% (Pérez *et al.*, 2003).

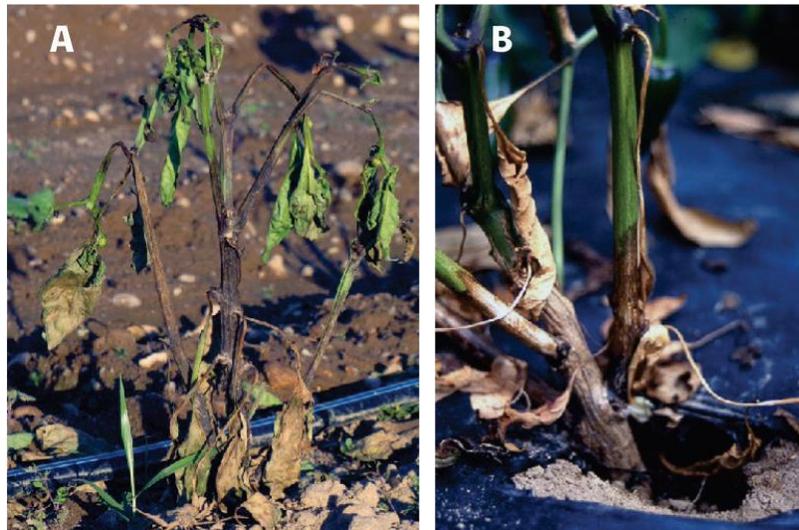


Figura 2. Pudrición de la raíz por *P. capsici*. Extraído de (Pino *et al.*, 2018)

6.4. Síntomas

Cuando se infecta por *P. capsici*, la planta tarda de tres a cuatro días, para marchitarse completamente. En el tallo, en el área del cuello, se observa un necrosamiento muy marcado, cuando se hace un corte a ese nivel, se detecta una coloración café oscuro o mancha marrón verdusca que se ennegrece de acuerdo con el grado de lignificación de la planta (Chew-Madinaveitia *et al.*, 2008).

En condiciones de suelo húmedo, la base del tallo se puede cubrir de micelio y presentar estructuras de fructificación de color blanco o azul verdoso. Las plantas enfermas presentan una banda parda oscura que ciñe el cuello, debido a esto, se marchitan y mueren (CATIE, 1993; Chew-Madinaveitia *et al.*, 2008).

En las hojas y ramas, se presentan lesiones como tizones, además de existir un bloqueo en la xilema e interrumpe el paso del agua el cual causa un color verde amarillento en las hojas y después de color café que es el primer síntoma, que generalmente se observa después de la floración. En los frutos se observan

manchas acuosas de color verde claro cubiertas por el micelio del hongo, también anticipan su cambio a color rojo y se arrugan (Morán-Bañuelos *et al.*, 2010).

Los frutos afectados permanecen adheridos a la planta (Figura 3). Las semillas también son afectadas, al abrir el fruto se detecta micelio sobre las semillas podridas, toman una coloración parda y luego se arrugan, con respecto a la raíz se muestra una pudrición suave, acuosa, inodora. (CATIE, 1993; Chew-Madinaveitia *et al.*, 2008; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010).



Figura 3. Marchitez de la planta. Extraído de
(Velázquez-Valle y Revele-Torres, 2017)

7. Condiciones de reproducción

Bajo condiciones favorables de temperatura (11 – 35°C, óptima de 25 a 28°C) y alta humedad, *P. capsici*, es un hongo sumamente agresivo que puede destruir campos enteros debido a su gran velocidad de crecimiento y abundante esporulación. En época seca, con tiempo soleado e irrigación por surcos favorece una alta producción de esporangios y su posterior invasión de las plantas. (CATIE,

1993; Chew-Madinaveitia *et al.*, 2008; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010). El hongo sobrevive de una estación a otra en los residuos de la cosecha y en la semilla. La marchitez por *Phytophthora* se puede detectar desde la plántula y es más crítico en la etapa de floración, pudiendo causar la muerte de la planta. (Chew-Madinaveitia *et al.*, 2008).

8. Esquema de reproducción de *Phytophthora capsici*

La fase policíclica del desarrollo de la enfermedad se piensa está dirigido principalmente por la dispersión de esporas asexuales (Figura 4) a una escala local (dentro y entre los surcos) (Lamour y Hausbeck, 2000).

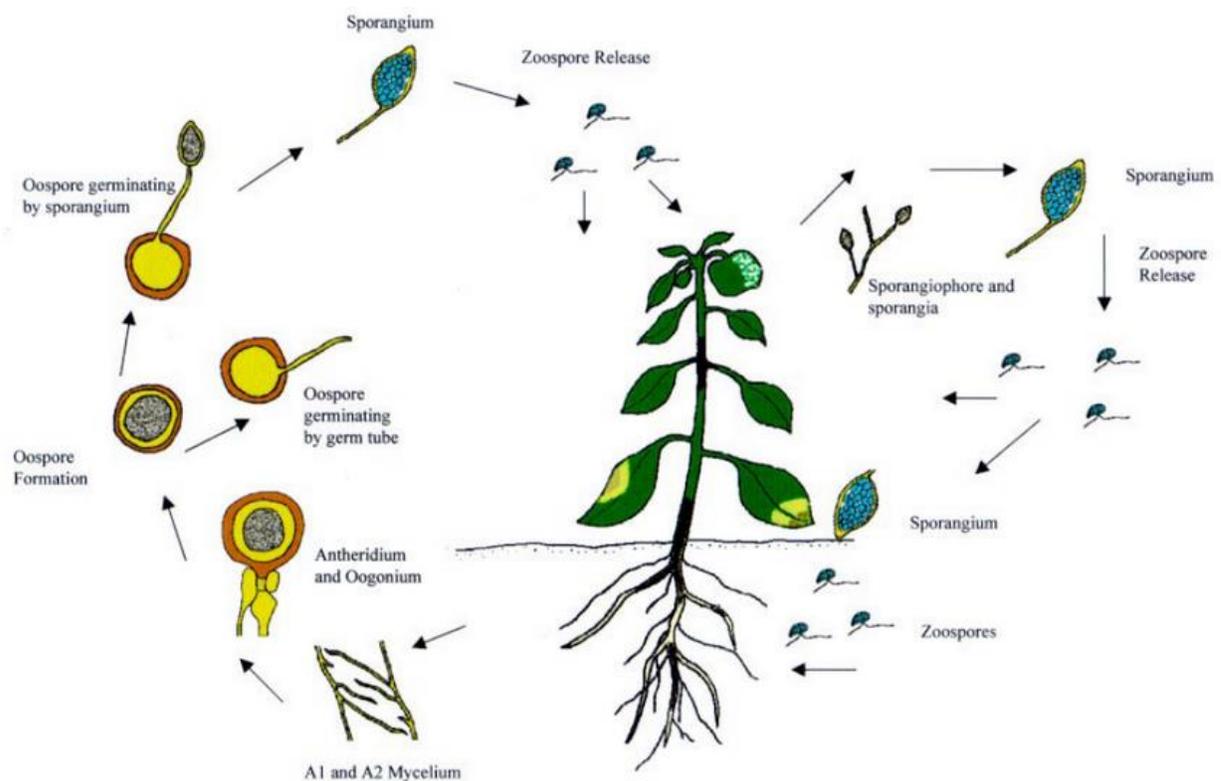


Figura 4. Ciclo de vida de *Phytophthora capsici*.
Extraído de (Ristaino y Johnston, 1999)

9. Líneas de chile reportadas como resistentes a *Phytophthora capsici*

Existen accesiones de chile reportados con cierto nivel de resistencia a *P. capsici*, por ejemplo: “PI 188476”, “PI 201232”, “PI 201234”, “Chile Ancho San Luis”, “Fyuco” y “Línea 29” (Kimble y Grogan, 1960; Walker y Bosland, 1999; Roig *et al.*, 2009; Candole *et al.*, 2010). Algunos chiles del tipo serrano provenientes del estado de Morelos, México han presentado un nivel de resistencia elevado, como es el caso del Criollo de Morelos 334 (CM-334) que se ha utilizado en distintas investigaciones referentes a la genética de la resistencia a *P. capsici* (Gil *et al.*, 1991; Walker y Bosland, 1999). Así mismo los materiales CM-322, CM-323, CM-324 Y CM-337 tienen alta resistencia a *P. capsici*, estos se encuentran bajo estudio en cuanto a sus características agronómicas y de producción en Costa Rica y Guatemala (CATIE, 1993). En los últimos años se han determinado *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) en regiones de los cromosomas 4, 5, 6, 11 y 12 involucradas en la resistencia de CM-334; debido a esto se ha considerado que la resistencia es de tipo cuantitativa (Thabuis *et al.*, 2003; Ogundiwin *et al.*, 2005).

10. Manejo de la enfermedad

10.1. Aplicaciones agroquímicas

Generalmente el manejo y control de la marchitez se lleva a cabo mediante la aplicación de productos biológicos y químicos, sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ocasiona un impacto ambiental, toxicidad al hombre y resistencia de patógenos; además de un incremento en los costos de producción, por lo que diversos trabajos de investigación sugieren un manejo integrado de la enfermedad el cual debe ser eficiente y de bajo costo (Palmar-Martínez *et al.*, 2017).



10.2. Mejoramiento genético tradicional

El control de las enfermedades a través de variedades resistentes es una alternativa para reducir los daños producidos por *P. capsici* (Reifschneider *et al.*, 1992; Castro *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012). Para desarrollar estas variedades es necesario encontrar materiales con características de resistencia como son en muchos casos las poblaciones nativas. Por otro lado, es necesario conocer la herencia de la resistencia al patógeno con el objeto de aplicar una adecuada estrategia de mejoramiento genético (Bartual *et al.*, 1993; Walker y Bosland, 1999; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010). Sin embargo, la resistencia genética es el método más deseable (Kim y Hartmann, 1985). El mejoramiento de chile (*Capsicum annuum*) tradicionalmente se ha realizado mediante esquemas de selección en los cuales, por lo general, se cruzan dos o cuando mucho cuatro progenitores, y la progenie de ellos se somete a endocria y selección continua hasta alcanzar la homocigosis total (Pozo y Ramírez, 1994; 1998). Estos esquemas de selección son conocidos como selección genealógica, método masivo y descendencia de una semilla (Márquez, 1991).

11. Uso de Marcadores Moleculares de ADN

En los últimos años, los rápidos avances en la biología molecular han proporcionado las herramientas necesarias para hacer más eficiente el mejoramiento genético de las plantas. Algunas de estas técnicas son de utilidad para la caracterización del germoplasma y la identificación y ubicación física de características importantes en los cromosomas como es el caso de los marcadores moleculares. La selección asistida por marcadores moleculares de ADN (MAS) está incrementando su importancia como herramienta en los programas modernos de mejoramiento genético (Caranta *et al.*, 1999; Moury *et al.*, 2000; (Yeam *et al.*, 2005).



11.1. ¿Qué es un marcador molecular?

Un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma que permite diferenciar entre un genotipo y otro a nivel de ADN, estos pueden ser genes o segmentos de ADN sin ninguna función o codificación conocida. Además, son puntos de anclaje o etiquetas cuando estos se encuentran unidos o cercanos a las secuencias de los genes. Los marcadores moleculares se han convertido en poderosas herramientas para hacer posible la determinación de las características genéticas de las plantas y seleccionar por el genotipo y no por el fenotipo. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos (Levitus *et al.*, s/f; Miles *et al.*, 1998; Dalla-Rizza *et al.*, 2003; Azofeifa-Delgado, 2006; Álvarez-Gill, 2011).

11.2. Ventajas de los marcadores moleculares de ADN

Las ventajas o características importantes de los marcadores moleculares para su aplicación en plantas son: ilimitados en su número, fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden evaluarse desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son detectables en todas las etapas de desarrollo de la planta, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis (Reynolds *et al.*, 2012; Méndez-Aguilar *et al.*, 2013).

11.3. Genes /QTL de resistencia a *Phytophthora capsici*

11.3.1. Genes mayores de resistencia

La defensa del chile CM334 contra *P. capsici* se ha asociado con la expresión de los genes *PR1/CABPR1*, *PEAS* (Cuadro 4) (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Villar-Luna *et al.*, 2015).

Primer				
Gen	Acceso	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Amplicón
PR1 (CABPR1)	AF053343	PR1FW	GTTGTGCTAGGGTTCGGT GT	301 pb
		PR1RV	CAAGCAATTATTTAAACG ATCCA	
Peroxidasa (CAPO1)	AF442386	POXFW	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG	560 pb
		POXRV	GGATGCGTCGATTGAAGGGTC	
β-1,3-glucanasa (CABGLU)	AF227953	GLUFW	GAGGCTCCAACATTGAAGTTATG	480 pb
		GLURV	CATCTTGTACCACCACATTAGGTGC	
5-epi-aristoloqueno sintasa (PEAS)	AJ005588	EASFW	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG	200 pb
		EASRV	TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	

Cuadro 4. Oligonucleótidos de genes de resistencia a *P. capsici*. Extraído de (Fernández-Herrera *et al.*, 2012)

Marcador SCAR PR-1 o CABPR1. Estas proteínas están involucradas en el engrosamiento de la pared celular y, por tanto, puede ofrecer resistencia a la diseminación de patógenos, así como un efecto toxico directo que retrasa el desarrollo.

El gen como *PR-1*, está involucrado o interviene en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas como maduración, y desarrollo de frutos, división celular, germinación de semillas etc. (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Villar-Luna *et al.*, 2015).

Marcador EAS/PEAS. La enzima clave en la biosíntesis de la fitoalexinas es la 5-epi-aristoloqueno sintasa, codificada por el gen *EAS*. El capsidiol es la principal



fitoalexina y su acumulación en la zona de infección de las raíces de chile inhibe o restringe el crecimiento de *P. capsici* durante la interacción incompatible (Villar-Luna *et al.*, 2009; Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Castro-Rocha *et al.*, 2012; Villar-Luna *et al.*, 2015).

La resistencia a dichos patógeno se ha asociado con una respuesta hipersensitiva dada por el hospedante. Existe suficiente evidencia experimental que demuestra que tanto las plantas resistentes como las susceptibles a enfermedades poseen mecanismos de defensa, y que la incompatibilidad o compatibilidad patógeno-hospedante está determinada por la velocidad y la magnitud con la que ocurre la expresión de los genes responsables de la manifestación de dichas defensas que restringen el desarrollo de un patógeno potencial (Villar-Luna *et al.*, 2009).

A este tipo de resistencia se le conoce como “Cualitativa” o vertical es fuertemente efectiva y completa, pero, solamente hacia razas o cepas particulares de una especie de patógeno específico. La base genética de la resistencia cualitativa o monogénica descansa en el modelo de gen por gen y se le llama genes mayores (Estrada-Ramos, 2000; López, 2011).

11.3.2. Genes menores de resistencia

Marcador Molecular SCAR *OpD04.717* ligado al QTL de resistencia. Para la identificación de QTL (Loci de Caracteres Cuantitativos) se ha recurrido al uso de marcadores genéticos, especialmente marcadores moleculares basados en PCR, que revelan diferencias genéticas entre organismos, individuos o entre especies. Por lo general, los marcadores no se encuentran dentro del gen de interés, pero si pueden estar cerca y actuar como señales, cuando se encuentran fuertemente ligados a genes o QTL que controlan la resistencia. La identificación de genes de interés agronómico ha sido posible gracias al uso de marcadores moleculares que



se encuentran ligados a ellos y que permiten seleccionar genotipos que expresen rasgos de interés.

En los programas de mejoramiento se conoce como Selección Asistida por Marcadores de ADN (MAS). Los marcadores SCAR son una herramienta de nuevo uso en el estudio de los cromosomas de las plantas en el genoma total (Miles *et al.*, 1998). Entre los nuevos marcadores se encuentran las Secuencias Amplificadas de Regiones Caracterizadas (SCAR).

Los SCAR son marcadores basados en la PCR que representa un fragmente de ADN genómico y que genéticamente define un *loci* los cuales son amplificados por PCR con secuencias de oligonucleótidos específicos (Paran y Michelmore, 1993; McDermott *et al.*, 1994; Bailey *et al.*, 2004).

Este tipo de marcadores amplifica secuencias ligadas a genes de resistencia y que por lo general co-segrega junto al gen de interés, ya que la distancia genética entre la secuencia SCAR y la secuencia del gen de resistencia generalmente no sobrepasa los 5cM “centi Morgan”. (Ruiz-Salazar *et al.*, 2016).

Es importante destacar que diversos estudios han mostrado la presencia de loci de rasgos cuantitativos o QTL en diferentes cromosomas con efectos menores, medios y mayores sobre la resistencia a *P. capsici*. Así mismo se pudo mapear una región relacionada con resistencia a *P. capsici* denominada como Phyto 5.2 ubicada en el cromosoma 5 de *C. annuum* L en la cual se generó un marcador tipo SCAR para la detección de este QTL que confiere resistencia a *P. capsici* se encontró en el material resistente CM334 testigo resistente (Figura 5) (Quirin *et al.*, 2005; Méndez-Aguilar *et al.*, 2015; Pino *et al.*, 2018).

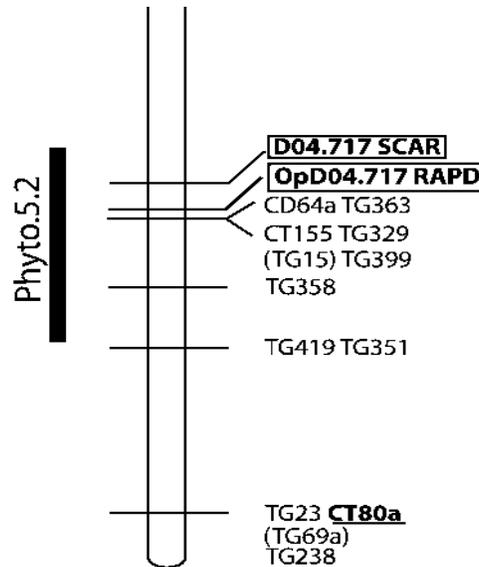


Figura 5. Marcador SCAR *OpD04.717* ligado el QTL Phyto 5.2 que confiere resistencia a *P. capsici*. Extraído de (Quirin *et al.*, 2005)

La resistencia de genética cuantitativa o genes menores, también conocida como resistencia horizontal o poligénica, como su nombre lo indica, está gobernada por varios genes, en donde cada uno de ellos contribuye de manera parcial y particular con un porcentaje de la resistencia total, así mismo esta resistencia es de amplio espectro por cuanto no es específica para una raza o cepa particular de patógeno sino que confiere resistencia a todos los individuos de una especie de patógenos particular (Estrada-Ramos, 2000; López, 2011). Sin embargo, su resistencia no es completa, y muestra diferentes niveles dependiendo tanto del bagaje genético de la planta como de las condiciones ambientales. Dada la compleja base genética de la resistencia cuantitativa, la estrategia para la identificación de las regiones genómicas implicadas en ella se ha basado en la detecciones de QTL de aquí el marcador *OpD04.717* que es un QTL es decir abarca un gran número de genes que dan resistencia a *P.capsici* (Estrada-Ramos, 2000; López, 2011).

IV. Hipótesis

En la colección de materiales genéticos del Banco de Germoplasma de Chile del Campo Experimental Las Huastecas existen fuentes potenciales de resistencia a pudriciones de la raíz (*P. capsici*), y estas pueden ser detectadas mediante marcadores moleculares de ADN.

V. Objetivo

General

Identificar fuentes de resistencia a pudriciones de la raíz (*P. capsici*) en germoplasma de Chile que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético tradicional o mediante selección asistida por marcadores moleculares de ADN (MAS).

Particulares

1. Identificar fuentes de resistencia a *Phytophthora capsici* en accesiones de Chile mediante marcadores moleculares (SCAR OpD04.717, PR-1, EAS) de ADN.



VI. Metodología

La siguiente metodología se realizó en el Campo Experimental las Huastecas del INIFAP, ubicado en Altamira, Tamaulipas, México. El proyecto experimental consistió en usar marcadores moleculares de ADN en genotipos de chile (*Capsicum annuum*) para conocer la resistencia al fitopatógeno *Phytophthora capsici*. Mismo que se cuenta con antecedente de estudios científicos de Instituciones, Investigadores, Organismos Públicos y Privados del País de México y otros países que avalan dichos análisis y resultados. Por lo anterior describiré brevemente las herramientas metodológicas que se desarrollaron en este proyecto como son: recolecta de material vegetal, extracción de ADN, la técnica de PCR, técnica de electroforesis, visualización de ADN.

13. Recolecta de material vegetal

Se recolectó tejido (hojas) de 15 plántulas de cada una de las accesiones de chile jalapeño para la identificación de fuentes de resistencia a nivel molecular a *Phytophthora capsici* en las instalaciones del campo experimental las Huastecas, Villa Cuauhtémoc, Tamaulipas. Posteriormente se envolvieron con papel aluminio previamente etiquetadas y se guardaron en un contenedor con hielo, después se llevaron y se almacenaron en un congelador a una temperatura de -20°C.

14. Extracción de ADN vegetal

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el estuche comercial Wizard® Genomic (Promega®). Para ello se pesó 80 mg tejido de 15 hojas jóvenes de accesiones mismas que se colocaron en un mortero, se adiciono nitrógeno líquido (-196°C) y se molió con un pistilo hasta formar un polvo fino. Dicho polvo se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL que contiene 600 µL de solución de lisis nuclear y se agitó en Vortex por 3 s. La mezcla se incubo en baño maría a 65 °C por 15 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 3 µL de RNasa y se mezclaron por inversión suave (cinco veces). Inmediatamente después, las muestras se incubaron a 37 °C por 15 min y después se enfriaron por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µL de la solución de precipitación de proteínas y se agitaron en Vortex a alta velocidad por 20 s. Enseguida, se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm en una microcentrífuga y cuidadosamente se removió el sobrenadante que contiene el ADN y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, para precipitar el ADN. Inmediatamente se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm. Cuidadosamente se eliminó el sobrenadante y luego se lavó sucesivamente con etanol al 70% usando 600 µL y después se centrifugó por 3 min a 13,000 rpm. Finalmente, el ADN se resuspendido en 40 µL de solución de rehidratación de DNA y se almacenó a -20 °C. Este proceso se realizó en las accesiones de chile jalapeño y el testigo resistente CM334.

15. Preparación de gel Agarosa al 1%

Se colocó en un matraz de 250 mL 1 g de Agarosa grado molecular y se adicionó 100 ml de buffer TAE 1X que se disolvió una temperatura por un minuto en un horno de microondas. Posteriormente se dejó enfriar lo suficiente antes de que se gelificara, y se vació en la caja de electroforesis junto con el peine para formar los pocillos y después se dejó reposar unos 15 a 20 minutos.

16. Condiciones generales de preparación de reactivos, Oligos y marcador de peso molecular

16.1. Preparación de Oligo liofilizado

Para preparar el tubo liofilizado de los Oligos (sentido y anti-sentido) se agregó 100 μ l de TE. 1X y se llevó a Vortex para su homogenización. Esto se hace en todos los Oligos.

16.2. Preparación de Reactivos para MIX de PCR

El volumen de reacción fue de 11.22 μ l para todas las muestras, el cual contuvo en un tubo PCR eppendorf de 0.2ml una mezcla de:

- Buffer Green 4 μ l (Promega)
- Magnesio 2.4 μ l (Bioline)
- dNTPs 0.6 μ l (Bioline)
- Primer F 2 μ l (IDT)
- Primer R 2 μ l (IDT)
- Taq. Polimerasa 0.22 μ l (Bioline)



El agua y ADN vegetal se agregaron según lo señala la siguiente (Tabla 1) donde viene el volumen exacto que fue utilizado para el MIX de PCR. De tal forma que el volumen de reacción final en el equipo de Termociclador fue de 18 µl para todas las muestras.

Genotipo	ADN µl	H ₂ O µl
SCM334	1	5.78
J71	1.8	1.78
J72	1.7	1.88
J100	1.7	1.88
J104	1.8	1.78
J164	2.4	1.18
J44	3.2	2.08
J62	2.4	4.38
J94	2	4.78
J79	5.7	1.08
J81	5.7	1.08
J82	2	4.78
J84	2.2	4.58
J91	2.3	4.48
J92	2.8	2.2
J95	2.2	4.58
J96	2.3	4.48
J125	2.3	2.08
J97	2	1.58
J102	1.9	1.68
J103	2	1.58
J125	4.5	0.92
J146	2.3	1.28

Tabla 1. Volumen de uso de ADN y Agua en el MIX para PCR.

16.3. Preparación de marcador molecular de pb

El marcador de peso molecular fue preparado de acuerdo con los siguientes reactivos y fue igual para todas las muestras.

- Marcador de 100 pb 2.5µl (Bioline)
- TE. 1X 3µl (Se prepara 10ml de 10X TBE TRIS-BURATE-EDTA de Bioline)
- Mango Taq. 3µl (Bioline)
- SyberGel Red 1µl (AppliChem)

El volumen de reacción fue de 9.5 µl.

17. Uso de marcador molecular (Oligos) SCAR *OpD04.717*

17.1. Condiciones de PCR

Se utilizó el marcador molecular SCAR *OpD04.717* asociado con la resistencia a pudriciones de la raíz (Quirin *et al.*, 2005).

Las condiciones óptimas de PCR fueron: 2 min de desnaturalización a 94°C; 32 ciclos de 30 s a 94°C; un alineamiento de 30 s a 45 °C y 1 min a 72 min y una extensión final de 5 min a 72 °C. Se trabajó en un termociclador T100™ marca BioRad.

La secuencia de los iniciadores es (*OpD04.717-F*): 5'CCA TAA GGG TTG GTA AAT TTA CAA AG 3' y (*OpD04.717-R*) 5'TCG AGA GAT AAT TCA GAT AGT ATA ATC 3'. Se corrió en la cámara de electroforesis FisherBiotech a 80 V por 2h. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles agarosa al 1% (Agarose Molecular Grade Bioline). Después fueron visualizados los geles con exposición a la luz UV en un transiluminador BXT-F20.M (Uvitec Cambridge). Posteriormente los geles se fotografiaron, y se procedió con la identificación de accesiones de resistencia a *P. capsici* en base a la presencia de la banda 717 pb.

18. Uso de marcador molecular (Oligos) *PR-1*

18.1. Condiciones de PCR

Se utilizó el marcador molecular *PR-1* asociado con la resistencia a pudriciones de la raíz (Castro-Rocha *et al.*, 2012; Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2013; Villar-Luna *et al.*, 2015).

Las condiciones óptimas de PCR fueron: 4 min de desnaturalización a 94°C; 34 ciclos de 30 s a 94°C; un alineamiento de 30 s a 52.6 °C y 30s a 72 min y una extensión final de 4 min a 72 °C. Se trabajó en un termociclador T100™ marca BioRad.

La secuencia de los iniciadores es (*PR1-F*): 5´GTT GTG CTA GGG TTC GGT GT 3´ y (*PR1-R*) 5´CAA GCA ATT ATT TAA ACG ATC CA 3´. Se corrió en la cámara electroforética (FisherBiotech) a 80 V por 2 h. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles agarosa al 1% (Agarose Molecular Grade Bioline). Después fueron visualizados los geles con exposición a la luz UV en un transiluminador BXT-F20.M (Uvitec Cambridge). Posteriormente los geles se fotografiaron, y se procedió con la identificación de accesiones de resistencia a *P. capsici* en base a la presencia de la banda 301 pb.

19. Uso de marcador molecular (Oligos) *EAS*

19.1. Condiciones de PCR

Se utilizó el marcador molecular *EAS* asociado con la resistencia a pudriciones de la raíz (Castro-Rocha *et al.*, 2012; Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2013; Villar-Luna *et al.*, 2015).

Las condiciones óptimas de PCR fueron: 4 min de desnaturalización a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C; un alineamiento de 30 s a 56 °C y 30s a 72 min y una



extensión final de 4 min a 72 °C. Se trabajó en un termociclador T100™ marca BioRad.

La secuencia de los iniciadores es (*EAS-F*): 5´ GCT CAA GAA ATT GAA CCG CCG AAG 3´ y (*EAS-R*) 5´ TCT TCA TTA TAG ACA TCG CCC TCG 3´. Se corrió en la cámara electroforética (FisherBiotech) a 80 V por 2 h. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles agarosa al 1% (Agarose Molecular Grade Bionline). Después fueron visualizados los geles con exposición a la luz UV en un transiluminador BXT-F20.M (Uvitec Cambridge). Posteriormente los geles se fotografiaron, y se procedió con la identificación de accesiones de resistencia a *P. capsici* en base a la presencia de la banda 200 pb.

La metodología expuesta en esta investigación es para poder desarrollar el proyecto de marcadores moleculares de ADN asociados con la resistencia a (*Phytophthora capsici*) en el cultivo del chile (Diagrama 1).

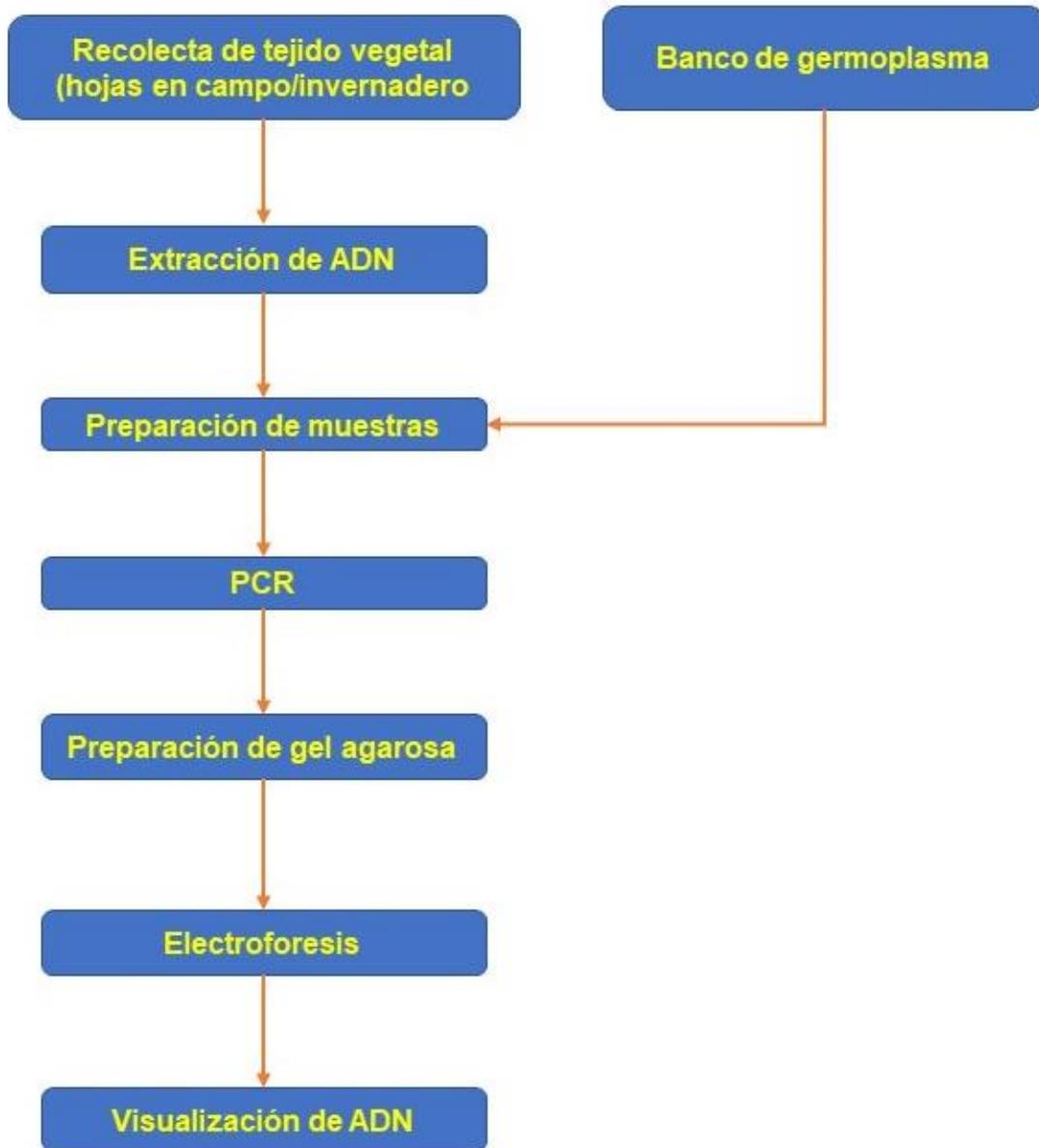


Diagrama 1. Protocolo para el uso de marcadores moleculares de DNA

VII. Resultados

20. Los marcadores moleculares de ADN tipo SCAR *OpD04.717* ligado a QTL de resistencia (Figura 6, 7, 8) y *PR-1*, (Figura 9, 10, 11); *EAS* (Figura 12) no ligados a QTL fueron identificados y presentaron amplificación al QTL de resistencia a *P. capsici* en accesiones de chile.

Marcador molecular SCAR *OpD04.717*

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *OpD04.717* (Figura 6) presentó en el segundo carril en gel de agarosa la amplificación de CM334 testigo resistente para esta investigación, lo que indica una resistencia a *P. capsici*, con una banda aproximada a 700 pb. (señalada con una flecha). Mientras que los carriles con las accesiones de chile jalapeño 3(J71), 4(J72), 5(J100), 6(J104), 7(J164), 8(J44), 9(J62) y 10(J94) no amplificaron al QTL asociado con la resistencia.

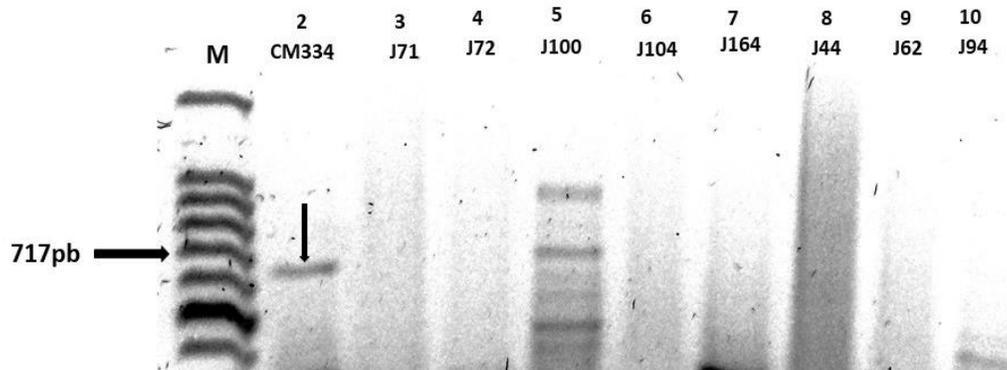


Figura 6. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *OpD04.717* en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *OpD04.717* (Figura 7) presentó en el segundo carril la amplificación de CM334 que es el testigo resistente lo que indica una resistencia a *P. capsici*. (señalada con una flecha).

Mientras que los carriles con las accesiones de chile jalapeño carriles 3(J79), 4(J81), 5(J82), 6(J84), 7(J91), 8(J92), 9(J95), 10(J96) no amplificaron al QTL de resistencia.



Figura 7. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *OpD04.717* en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *OpD04.717* (Figura 8) presentó en el segundo carril la amplificación de CM334 que es el testigo resistente lo que indica una resistencia a *P. capsici* con una banda aproximadamente a 600 pb. (señalada con una flecha). Mientras que los carriles con las accesiones de chile jalapeño 3(J97), 4(J102), 5(J103), 6(J109), 7(J125), 8(J146), 9(J95) no amplificaron al QTL de resistencia.

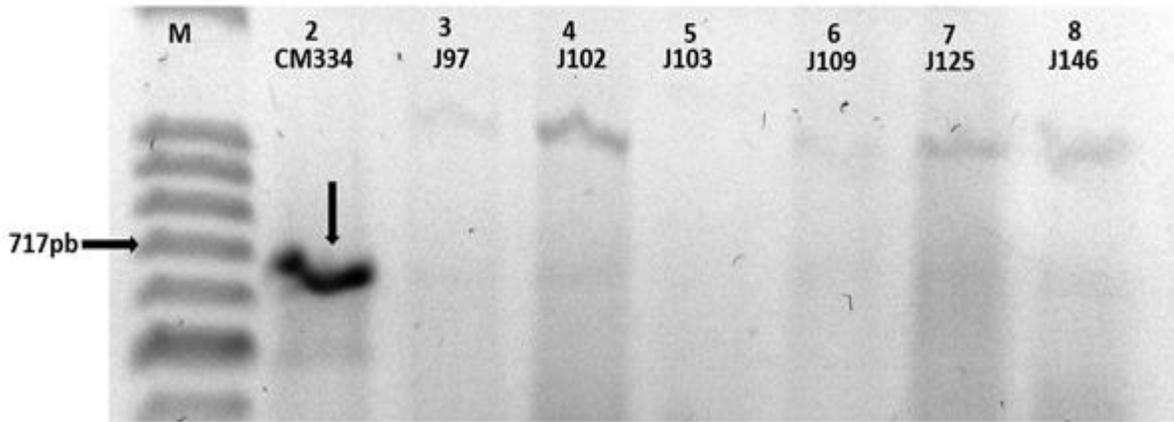


Figura 8. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *OpD04.717* en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.

Marcador molecular SCAR *PR-1*

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *PR-1* (Figura 9) presentó en el segundo carril con una amplificación de 301 pb al gen de resistencia en el genotipo CM334 que es el testigo resistente (señalada con una flecha). De igual manera los carriles número 3(J71), 4(J72), 5(J100), 6(104), 7(J164), 8(J44), 9(J62) y 10(J94) representan accesiones de chile jalapeño que mostraron bandas de amplificación al gen de resistencia.

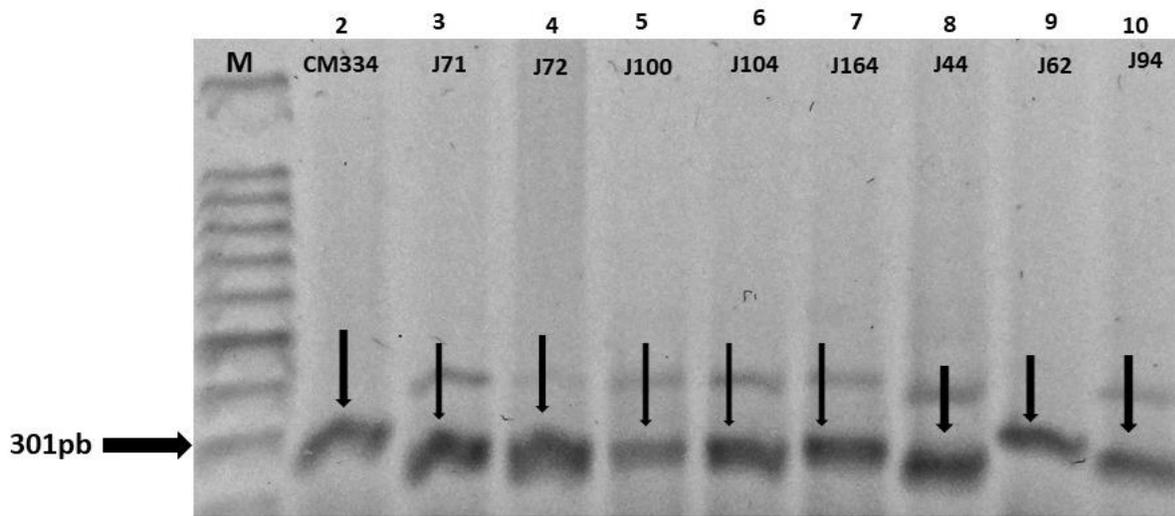


Figura 9. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *PR-1* en diversas accesiones de chile jalapeño y CM334 testigo resistente.

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *PR-1*(Figura 10) presentó amplificación en los carriles 3(J79), 4(J81), 5(J82), 7(J91), 8(J92), 9(J95) y 10(J96) al gen de resistencia en las accesiones de chile jalapeño con una banda aproximada de unos 301 pb (señalada con una flecha).

Por otra parte, el carril 6 no mostró bandeo posiblemente porque no se cargó bien la muestra en el gel de agarosa.

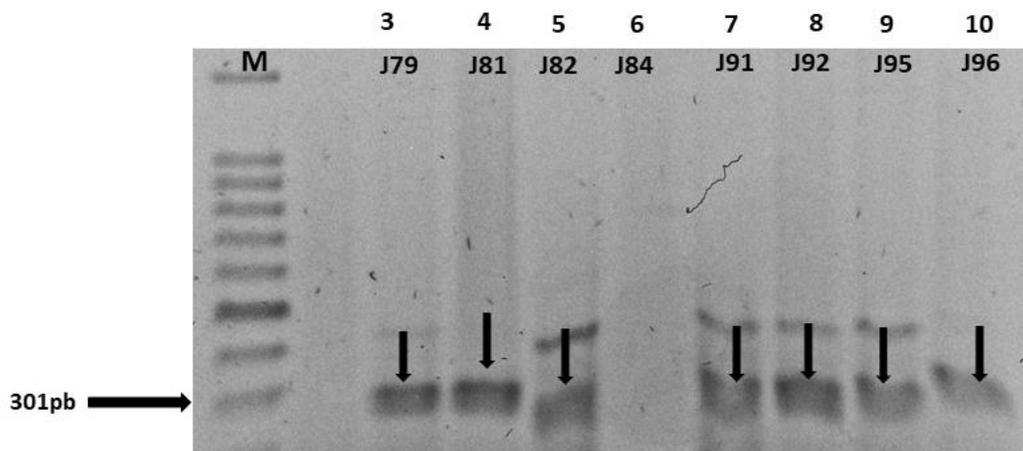


Figura 10. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *PR-1* en diversas accesiones de chile jalapeño.

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *PR-1* (Figura 11) se mostró en los carriles 2(CM334) testigo resistente y en las accesiones de chile jalapeño 3(J97), 4(J102), 5(J103), 6(109), 7(J125) con una amplificación de bandas de aproximadamente de unos 301pb (señalada con una flecha).

El carril 8(J146) no amplificó posiblemente porque no se cargó bien la muestra en el gel de agarosa.

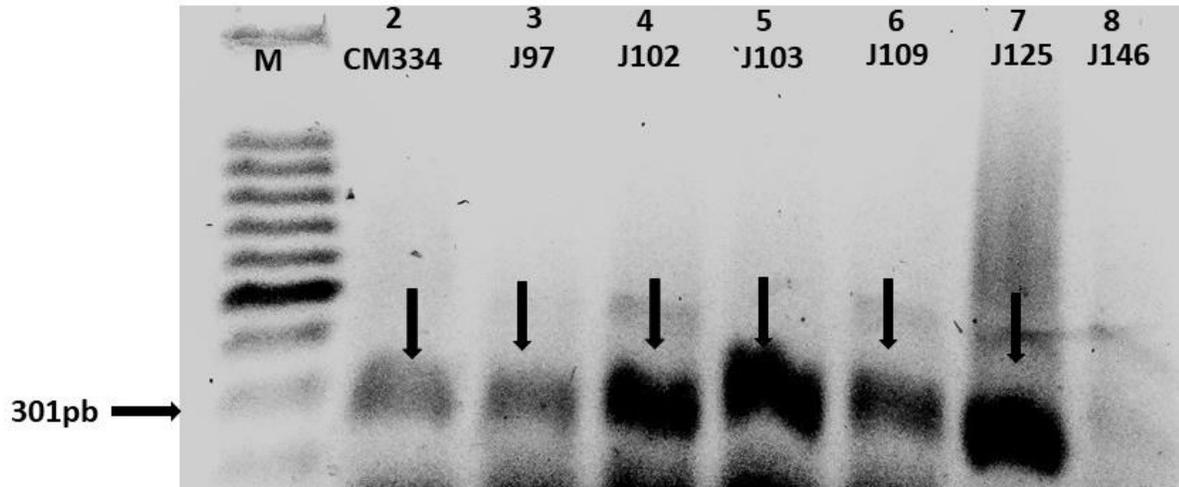


Figura 11. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *PR-1* en diversas accesiones de chile jalapeño y el CM334 testigo resistente.

Marcador molecular SCAR *EAS*

El trabajo de PCR con el marcador molecular de ADN *EAS* (Figura 12) mostró en el carril número 2 y 18 amplificación en el chile CM334 como testigo resistente para esta investigación con una banda aproximadamente de unos 200 pb (señalada con una flecha).

De igual manera los carriles número 3(J71), 4(J72), 5(J100), 6(104), 7(J164), 8(J44), 9(J62), 10(J94), 11(J81), 12(J82), 13(J184), 14(J91), 15(J92), 16(J95), 17(J96), 19(J97), 20(J102), 21(J103), 22(J109), 23(J125), 24(J146), representan accesiones de chile jalapeño que amplificaron al gen de resistencia.

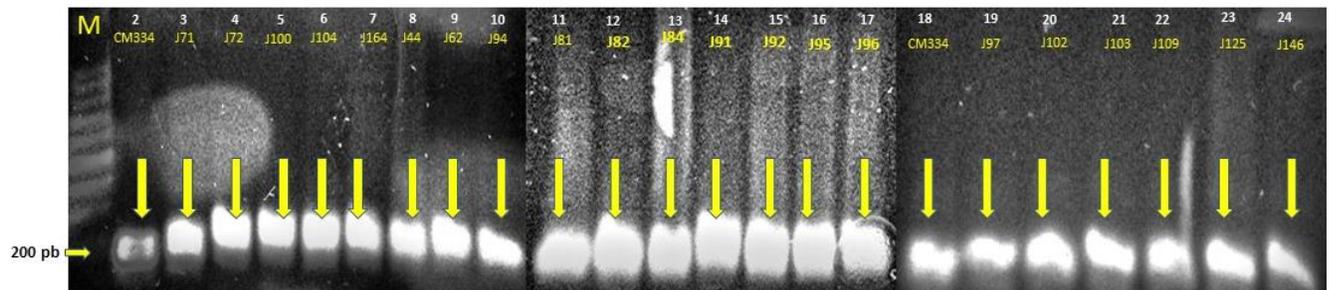


Figura 12. Fotografía en gel de agarosa con el marcador molecular *EAS* en diversas accesiones de chile jalapeño y el CM334 testigo resistente



1.1. Tabla comparativa de accesiones de chiles con diferentes marcadores moleculares de ADN

La siguiente (Tabla 2) muestra los marcadores moleculares de ADN usado en los diversos genotipos de chiles como son CM334 Testigo resistente y jalapeño para lograr discriminar entre resistentes y susceptibles.

Marcador molecular de ADN			
Genotipo	OpD04.717	PR-1	EAS
SCM334	+	+	+
J71	-	+	+
J72	-	+	+
J100	-	+	+
J104	-	+	+
J164	-	+	+
J44	-	+	+
J62	-	+	+
J94	-	+	+
J79	-	+	+
J81	-	+	+
J82	-	+	+
J84	-	.	+
J91	-	+	+
J92	-	+	+
J95	-	+	+
J96	-	+	+
J97	-	+	+
J102	-	+	+
J103	-	+	+
J109	-	+	+
J125	-	+	+
J146	-	.	+

Tabla 2. Comparativo de genes de resistencia. (El signo + representa la amplificación de las bandas al gen de resistencia, el signo – representa que no amplifiqué las bandas al gen de resistencia y el (punto) representa una omisión de algún reactivo durante su preparación.



VIII. Análisis de resultados

Se utilizaron los cebadores SCAR *OpD04.717*, *PR-1*, *EAS* para identificar accesiones de chile jalapeño resistentes a *P. capsici* dentro del banco de germoplasma del Campo experimental Las Huastecas con potencial para mejoramiento genético tradicional o mediante Selección asistida por marcadores moleculares de ADN (MAS).

El uso del marcador SCAR *OpD04.717* que se encuentra ligado al QTL Phyto 5.2 en el cromosoma 5 de la especie *Capsicum annuum* L. confiere resistencia a *Phytophthora capsici* y ha sido eficaz en la discriminación entre genotipos susceptibles y resistentes (Quirin *et al.*, 2005; Silvar *et al.*, 2005; Rehrig *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2013; Méndez *et al.*, 2015; Naresh *et al.*, 2019). Para Quirin *et al.*, (2005), el chile CM334, CMB, CMA y CU44 han presentado mayor resistencia al patógeno *P. capsici* representado con una amplificación de bandas de 717 pb en su investigación. Los trabajos realizados por Méndez *et al.*, (2015) muestran una banda de amplificación en el gel de agarosa aproximada a 700 pb con el marcador *OpD04.717*, así mismo para McGregor y Waters (2011), los resultados en el gel de agarosa evidencian una banda amplificada cercana a los 750 pb.

Por otra parte, las 22 accesiones de chile jalapeño que se utilizaron en la presente investigación con el marcador SCAR no fue capaz de discriminar entre accesiones resistentes y susceptibles, únicamente el testigo resistente CM334 amplificó del QTL asociado con la resistencia a *P. capsici* con unas bandas aproximadas de 700 pb según los geles reportados y se mostró como un marcador polimórfico (Figura 6, 7, 8).

McGregor y Waters (2011), mencionan que la no amplificación se puede deber a que la presencia de un alelo marcador asociado con un locus de resistencia en una accesión/población determinada no implica necesariamente la misma asociación en diferentes accesiones, por tal motivo las 22 accesiones no



amplificaron el marcador SCAR, así mismo no se logró identificar accesiones potenciales para introgresar en programas de mejoramiento genético ya sea tradicional o mediante MAS.

El marcador molecular SCAR PR-1 (Figura 9, 10, 11), fue monomórfico es decir tanto el chile CM334 (testigo resistente) como todas las accesiones (20) de chile jalapeño presentaron amplificación de banda de 301 pb del gen de resistencia CABPR1, pero no se logró discriminar materiales susceptibles de los resistentes.

Dicho marcador está asociado con los mecanismos moleculares asociados con la resistencia al oomiceto implican la sobreexpresión de genes/enzimas de defensa CABPR1, que codifica para una proteína PR-1 relacionadas con patogénesis en cultivos de chiles a *P. capsici* reportado por (Kuy-Hong y Kook-Hwang, 2005; Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2013; Ying-Li *et al.*, 2013; Villar-Luna *et al.*, 2015). Así mismo, no se logró identificar accesiones potenciales para introgresar en programas de mejoramiento genético ya sea tradicional o mediante MAS.

Con respecto al marcador molecular SCAR EAS se presentó como marcador monomórfico (Figura 12), es decir el testigo resistente chile CM334 ubicado en el pocillo número 2 y 18 así como las 21 accesiones de chile jalapeño amplificaron con bandas de 200 pb del gen (*PEAS 5-epi-aristoloqueno sintasa*) de resistencia, pero no se logró discriminar materiales susceptibles de los resistentes. Para (Fernández-Herrera *et al.*, 2012) el genotipo CM334 ha reportado el gen de resistencia, así como chile de la var. Sonora Anaheim. Dicho marcador está asociado con los mecanismos moleculares asociados con la resistencia al oomiceto implican la sobreexpresión de genes/enzimas de defensa EAS que codifica para la 5-*epi*-aristoloqueno sintasa, que es la enzima clave en la biosíntesis del capsidiol, la principal fitoalexina sintetizada en chile.



Los resultados obtenidos indicaron una estrecha relación entre la expresión de *EAS* y la acumulación de capsidiol en las raíces de chile, así en las plantas infectadas con *P. capsici* reportado por (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Villar-Luna *et al.*, 2015). Así mismo, no se logró identificar accesiones potenciales para introgresar en programas de mejoramiento genético ya sea tradicional o mediante MAS.

IX. Conclusiones

El marcador molecular SCAR *OpD04. 717* no logró identificar de las 22 accesiones de chile jalapeño que se investigaron, resistencia al fitopatógeno, únicamente el testigo resistente chile CM334 presentó amplificación de dicho marcador, el cual está asociado con el QTL que confiere resistencia a *P. capsici*.

El marcador *PR-1* presentó amplificación del gen de resistencia a *P. capsici* en las 20 accesiones de chile jalapeño incluyendo el testigo resistente CM334. Sin embargo, no fue capaz de discriminar entre genotipos susceptibles de los resistentes al hongo.

El marcador molecular *EAS (5-epi-aristoloqueno sintasa)* presentó amplificación al gen de resistencia a *P. capsici* en las 21 accesiones de chile jalapeño incluyendo el testigo resistente CM334. Sin embargo, no fue capaz de discriminar entre genotipos susceptibles de los resistentes al fitopatógeno.

Por lo tanto, no se logró identificar nuevos materiales resistentes que sean capaces de ser introgresados en programas de mejoramiento genético por vía tradicional o mediante selección asistida por marcadores de ADN (MAS).



X. Cronograma

Descripción de Actividades	Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio			
	Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Entrega de los primeros resultados	■	■	■	■																
Desarrollo de metodología y ampliación de marco teórico				■	■	■	■	■	■	■										
1ª. Evaluación de asesor externo y entrega rubrica de primer reporte											■									
Desarrollo de resultados													■	■	■					
Entrevista examen final																			■	
Entrega cartel																			■	
Entrega final del proyecto																			■	
2ª. Entrega de evaluación de asesor externo y rubrica de reporte final																			■	
Entrega de documentos a la coordinación																			■	

XI. Referencias

- Álvarez-Gil, M.** (2011). La selección asistida por Marcadores (MAS, Marker-Assisted Selection) en el mejoramiento genético de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(3): 46-58
- Azofeifa-Delgado, A.** (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutas del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2): 221-241
- Bailey, C. D., C. E. Hughes., S. A. Harris.** (2004). Using RAPDs to identify DNA sequence loci for species level phylogeny reconstruction: an example from *Leucaena* (Fabaceae). *Systematic Botany*, 29:4-14
- Bartual R., A. Lacasa, J., I. Marsal, J., C. Tello.** (1993). Efectos epistáticos en la resistencia a *Phytophthora capsici* Leon en pimiento (*Capsicum annuum*). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 19:485-490
- Bashan, Y., Okon, Y.** (1986). Internal and external infections of fruits and seeds of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Canadian Journal of Botany*, 64: 2861-2871
- Bosland, P.** (1996). Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. Recuperado el 09 de agosto de 2018 de la base de datos de Proceedings of the Third National Symposium, New Crops, New Opportunities, New Technologies 479-487 pp.
- Bosland, P.W., Votava, E. J.** (2003). Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. CAB International. England. 233 p.
- C. Martin, N., G. González, W.** 1991. Caracterización de Acciones de Chile (*Capsicum* spp.). *Agronomía Mesoamericana*, 2: 31-39
- Candole, B. L., P. J. Conner., P. Ji.** (2010). Screening *Capsicum annuum* accessions for resistance to six isolates of *Phytophthora capsici*. *HortScience*, 45:254-259

- Caranta, C., Thabuis, A., Palloix, A.** (1999). Development of a CAPs marker for the *Pvr4* locus: a tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome*, 42: 1111-1116
- Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Mendoza-Elos, M., Vargas-López, A., Cárdenas-Morales, H.** (2008). Colección y caracterización de Chile (*Capsicum spp*) en Tabasco, México. *Revista Internacional Botánica Experimental* ΦYTON, 77: 189-202
- Castro-Rocha, A., Fernández-Pavía, S., Osuna-Ávila, P.** 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora Capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30: 49-65
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).** (1993). Guía para el manejo integrado de plagas de cultivo de chile dulce. Informe Técnico No. 201. 12, 79-81pp.
- Chew-Madinaveitia, Y., Vega-Piña, A., Palomo-Rodríguez, M., Jiménez-Díaz, F.** (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annum* L.) (1ª. Edición). México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2-6 pp.
- Cortez, M.** (1992). Monitoreo del desarrollo fenológico del chile serrano y sus plagas principales (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro. Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México
- Cruz-Alcalá, A., Mendoza-Zamora, C., Romero-Cova, S.** (2000). Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el sureste del estado de México, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6(1): 25-32
- Dalla-Rizza, M., Real, D., Vidal, S.** (2003). Desarrollo y aplicación de marcadores codominantes para las determinaciones del sistema reproductivo en plantas. Serie Técnica N°. 137. Unidad de Agronomía y difusión INIA. Montevideo, Uruguay
- Dubcovsky, J.** (2004). Marker-assisted selection in public breeding programs: The wheat experience. *Crop Science*, 44: 1895-1898



- Erwin, D., Bartnicki-García, S., Tsao, P.** (1983). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology* (First edition). EUA: American Phytopathological Society Press. 1-7 pp.
- Estrada-Ramos, N.** (2000). *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa* (1ª. Edición). Bolivia: Plural editores. 142 p.
- Fernández-Herrera, E., Rojas-Martínez, R., Guevara-Olvera, L., Rivas-Dávila, M., Valadez-Moctezuma, E., Zavaleta-Mejía, E.** (2012). Defensa en Chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 42(1):96-107
- Fonnegra, R., Jiménez, S.** (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (2ª Edición). Colombia: Universidad de Antioquia. 09, 27-30 pp.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO).** (2002). *El cultivo protegido en clima mediterráneo. Manual preparado por el Grupo de cultivo Hortícolas*. Roma: Food & Agriculture. 206-207 p.
- Francki, R.I.B., Milne, R.G., Hatta, T.** (1985). *Atlas of Plants Viruses*. CRC press. Boca Ratón, Florida, EE. UU. 65pp.
- García-Rodríguez, M., Chiquito-Almazán, E., Loeza-Lara, P., Godoy-Hernández, H., Villordo-Pineda, E., Pons-Hernández, L., González-Chavira, M., Anaya-López, J.** (2010). Producción de Chile injertado sobre criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsicia*. *Agrociencia*, 44:701-709
- Gil, O. R., C. Palazón E., J. Cuartero Z.** (1991). Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. *Plant Breeding*, 107:50-55
- Gil-Ortega, R., Palazón-Español, C., Cuartero-Zueco, J.** (1991). Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. *Plant Breed*, 107: 50-55
- González-Franco, A., Gil-Langarica, E., Robres-Hernández, L., Núñez-Barrios, A., Pérez-Leal, R., Hernández-Rodríguez, O., Pérez-Moreno, L.** (2014).

- Detección de Virus que Afectan al Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(1): 38-51
- González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M., Santiago-Santiago, V., Montero-Pineda, A.** (2004). Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en el Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. *Agrociencia*, 38(6): 653-661
- Goodwin, S.** (1997). The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87(4): 462-473
- Guigón-López, C., González-González, P.A.** (2001). Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56
- Guillen-Cruz, R., Hernández-Castillo, F., Gallegos -Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-Sánchez, C, Padrón-Corral, E., Aguilar-Valdez, M.** (2006). *Bacillus* spp. Como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2): 105-114
- Heiser, C., Smith, P.** (1953). The cultivated capsicum peppers. Recuperado el 09 de agosto de 2018, de la base de datos de Economy Botany
- Hong, T.H.T., Kim, K.T., Kim, S., Cho, M.C., Kim, H.R., Woo, J.G.** (2011). Development of Gene-based Markers for the *Bs2* Bacterial Spot Resistance Gene for Marker-Assisted Selection in Pepper (*Capsicum* spp.). *Hort. Environ. Biotechnol*, 52: 65-73
- Hong-Truong, H., Ho-Kim, J., Cheoul-Cho, M., Young Chae, S., Eun-Lee, H.** (2013). Identification and development of molecular markers linked to *Phytophthora* root rot resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *European Journal of Plant Pathology* .135:289–297
- Jun, W., Da-Wei, Li., Ying-Li, Z., Qian, Z., Yu-Mei, H., Zhen-Hui, G.** (2013). Defense responses of peper (*Capsicum annuum* L.) infected with

- incompatible and compatible strains of *Phytophthora capsici*. *Eur J Plant Pathol.* 136: 625-638
- Kim, B.S., Hartmann, R.W.** (1985.) Inheritance of a gene (*Bs3*) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Dis*, 69: 233-235
- Kimble, K. A., R. G. Grogan.** (1960). Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. *The Plant Disease Reporter*, 44:872-873
- Kirk, P.M., P.F. Cannon, J., D, J.A. Stalpers.** (2001). Dictionary of the fungi. CAB international. UK. 665 p.
- Kumar, J., Choudhary, A.K., Solanki, R.K., Pratap, A.** (2011). Towards marker-assisted selection in pulses: a review. *Plant Breed.* 130: 297-313
- Kyu-Hong, J., Kook-Hwang, B.** (2005). Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-Glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *The Plant Pathology Journal.* 21(3): 195-206
- Lamour K. H., R. Stam, J. Jupe, E. Huitema.** (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13:329-337
- Lamour, K., Hausbeck, M.** (2000). Mefenoxam Insensitivity and the Sexual Stage of *Phytophthora capsici* in Michigan Cucurbit Fields. *Phytopathology*, 90(4):396-400
- Latournerie, L., Chávez, J., Pérez, M., F. Hernández, C., Martínez, R., Arias, L., Castañón, G.** (2001). Exploración de la diversidad morfológica de chiles regionales en Yaxcabá, Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana*, 12(1): 41-47
- León, J. (1987).** Botánica de los cultivos Tropicales (2ª edición). San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura (IICA). 179, 181pp.
- Leonian, L. H.** (1922). Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 12: 401-408

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L.** (s.f). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II (1^a. Edición). Argentina: Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 73 p.
- López, C.** (2011). Descifrando las bases moleculares de la resistencia cuantitativa. *Acta biol. Colomb.* 16(2): 3-12
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F., Gil, M.** (2004). Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12): 3861-3869
- Márquez, S.F.** (1991). Genotecnia vegetal. Métodos, Teoría, Resultados. AGT, México, D. F., Tomo II. 458p.
- McDermott, J., Brandle, U., Dutly, F., Haemmerli, U., Keller, S., Muller, K., Wolf, M.** (1994). Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers. *Phytopathology*, 84: 1316-1321
- McGregor, C., Waters, V.** (2011). Genotypic and Phenotypic Variation among Pepper Accessions Resistant to *Phytophthora capsici*. *HortScience*. 46(9): 1235-1240
- McKee, T., R. McKee, J.** (2009). Bioquímica las bases moleculares de la vida (4^a edición). México: McGraw Hill Educación. 174p.
- Méndez-Aguilar, R., Rodríguez-Guerra, R., Ramírez-Méndez, M., Alvarado-Ojeda, M., Vázquez-García, E., Arcos-Cavazos, G., Tenorio-Pérez, V., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N.** (2015). Identificación de fuentes de resistencia a pudriciones de la raíz en germoplasma de chile serrano (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*,6(7): 1507-1518
- Miles, J., Maas, B., do Valle, C.** (1998). *Brachiaria*: Biología, Agronomía y mejoramiento. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 216-221 pp.
- Morán-Bañuelos, S., Aguilar-Rincón, V., Corona-Torres, T., Zavaleta- Mejía, E** (.2010). Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de

- Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33 (Número especial 4): 21-26
- Moury, B., Pflieger, S., Battles, A., Lefebver, V., Palloix, A.** (2000). A CAPs marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSVW) resistance in pepper. *Genome* 43: 137-142.
- Muñoz-Villalobos, J., Velásquez-Valle, M., Macías-Rodríguez, H., Sánchez-Cohen, I.** (2013). Producción de chile (*Capsicum annum* L.) campo abierto con biofumigación del suelo (1ª edición). Centro Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (inifap). Folleto Técnico Núm. 30
- Naresh, P., Meenul, K., G, A., C. Reddy, A., Reddy, L.** (2019). Genetics and molecular markers for resistance to major soil borne pathogens in chilli (*Capsicum annum* L.). *Research Journal of Biotechnology*. 14(1): 101-105
- Ogundiwin, E. A., T. F. Berke, M., Massoudi, L. L. B., G. Huestis, D., Choi, S. L., J. P. Prince.** (2005). Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annum* L.). *Genome*, 48:698-711
- Palmar-Martínez, E., Aguilar-Rincón, V., Corona-Torres, T., Gómez-Rodríguez, O.** (2017). Resistencia a *Phytophthora Capsici* LEO. En líneas de chile Huacle (*Capsicum annum* L.). *Rev. Fitotec.Mex*, 40(3): 359-363
- Paran, I., R.W. Michelmore.** (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993
- Pérez, M.L., Duran, O.L., Ramírez, M.R., Sánchez, P.J.R., Olalde, P.V.** (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21: 19-25.
- Pérez-Castañeda, L., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., Mayek-Pérez, N.** (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la



- diversidad genética de *Capsicum spp.* *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4): 117-128
- Pino, M., Campos, A., Saavedra, J., Álvarez, F., Salazar, C., Hernández, C., Soto, S., Estay, P., Vitta, N., Escaff, M., Pabón, C., Zamora, O.** (2018). Pimientos para la industria de alimentos e ingredientes. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile. Boletín INIA N° 360, 23 p.
- Pozo, C., Ramírez, M.** (1994). Gigante Ébano y Paraíso. Nuevas variedades de chile serrano en México. Folleto Técnico No. 10. CESTAM-CIRNE-INIFAP.
- Pozo, C.O., Ramírez, M.** (1998). Cultivares de chile jalapeño para el trópico húmedo de México. Folleto Técnico No. 15. CESTAM-CIRNE-INIFAP.
- Quirin, E. A., Ogundiwin, E. A., Prince, J. P., Mazourek, M., Briggs, M. O., Chlanda, T. S., Kim K. T., Falise, M., Kang, B. C., Jahn, M. M.** (2005). Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto.5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(4): 605-612.
- Rehrig, W., Ashradi, H., Hill, T., Prince, J.** (2014). CaDMR1 Cosegregates with QTL Pc5.1 for Resistance to *Phytophthora capsici* in Pepper (*Capsicum annuum*). *The Plant Genome*. 7(2): 1-12
- Reifschneider, B., Boiteux, P. T. Della Vecchia, J. M. Poulos, N. Kuroda.** (1992). Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Euphytica*, 62:45-49
- Reynolds, M., Pask, A., Mullan, D., Chavez, P.** (2012). Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoque interdisciplinario para mejorar la adaptación del cultivo. México: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 141-149 pp.
- Ristaino, J., Johnston, S.** (1999). Ecologically Based Approaches to Management of *Phytophthora* Blight on Bell Pepper. *Plant Disease*, 83 (12): 1080-1089

- Roig, J. M., Occhiuto, R., Piccolo, C., R. Galmarini.** (2009). Evaluación de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. en germoplasma argentino de pimiento para pimentón. *Horticultura Argentina*, 28:5-9
- Ruiz-Salazar, R., Muruaga-Martínez, J., Vargas-Vázquez, M., Alejandre-Iturbide, G., Castañón-Nájera, G., Hernández-Delgado, S., Almaraz-Abarca, N., Mayek-Pérez, N.** (2016). Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). *Revista Internacional Botánica Experimental* ΦYTON, 85:184-193
- Sánchez-Chávez, E., Torres-González, A., Flores-Córdova, M., Preciado-Rangel, P., Márquez-Quiroz, C.** (2015). Uso de porta injerto sobre el rendimiento, calidad del fruto y resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento morrón. *Nova Scientia*, 7(15):227-244
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación- SAGARPA.** (2016). Producción Nacional de chile alcanza 2.3 millones de toneladas. Recuperado el día 28 de octubre de 2018, de la base de datos de: <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/produccion-nacional-de-chile-alcanza-2-3-millones-de-toneladas>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP.** (2010). Un panorama del cultivo de chile. Recuperado el 08 de agosto de 2018, de la base de datos de infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP.** (2013). México es primer lugar mundial en la producción de chile verde. Recuperado el día 08 de agosto de 2018, de <https://www.gob.mx/siap/prensa/mexico-es-primer-lugar-mundial-en-la-produccion-de-chile-verde-38656>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP.** (2013). Disponible en (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP.** (2017). El chile, corazón de la gastronomía mexicana. Recuperado el 08 de agosto de 2018,

de la base de datos de <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-chile-corazon-de-la-gastronomia-mexicana?idiom=es>

- Silvar C., J., M. Duncan., D. E. L. Cooke., N. A. Williams., J. Díaz., F. Merino.** (2005). Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology* 112: 43-52
- Thabuis A., A. Palloix, S., Pflieger, A. M., Daubèze, C., Caranta, V. Lefebvre.** (2003). Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:1473-1485
- Urías, M., Alejandro, T.** (1999). Los virus y su impacto en la producción agrícola. En: Hortalizas, Plagas y Enfermedades (1ª. Edición). México: Trillas. 92-109 pp.
- Velásquez, V.R., Medina, A.M.M.** (2003). La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. Folleto Científico No. 14. INIFAP. Centro de Investigación Regional Norte-Centro, Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 26 p.
- Velázquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.** (2017). Necrosis foliar; nuevo síntoma asociado a la pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum*) en Durango y Zacatecas, México. *Scientia Fungorum*, 46:47-53
- Villar-luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A., Zavaleta-Mejía, E.** (2009). Respuesta Hipersensitiva en el follaje de chile CM334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 39(1):143-155
- Villar-luna, H., Reyes-Trejo, B., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., Zavaleta-Mejía, E.** (2015). Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción compatible chile CM334/*Nacobbus aberrans*



e incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematropica*. 45(1):9-19

Walker, S. J., P. W. Bosland. (1999). Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124:14-18

Wang, D., Bosland, P.W. (2006). The genes of *Capsicum*. *HortSci*. 41: 1169-1187

Yeom, I., Kang, B.C., Lindeman, W., Frantz, J.D., Faber, N., Jahn, M.M. (2005). Specific marker CAPS markers based on point mutations in resistance alleles in the pvr1 locus encoding eIF4E in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 112: 178-186

Ying-Li, Z., Da-Wei, L., Zhen-Hui, G., Jun-E, W., Y.X. Y., J.J, J. (2013). Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). *Genetics and Molecular Research*. 12(3): 3605-3621