

Severity of a *Phytophthora capsici* strain in chayote *Sechium edule* plants at growth chamber level

Severidad de una cepa de *Phytophthora capsici* en plantas de chayote *Sechium edule* a nivel de cámara de crecimiento

Mauricio Iván Andrade Luna, Estudiante de Doctorado del Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: mauricio@colpos.mx; **David Espinosa-Victoria***, Laboratorio de Interacción Molecular Planta-Microorganismo, Área de Microbiología, Programa de Postgrado en Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: despinos@colpos.mx; **Olga Gómez Rodríguez**, Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: olgago@colpos.mx; **Jorge Cadena Iñiguez**, Programa de Posgrado en Innovación en el Manejo de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí, Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. C. P. 78600. México. Correo electrónico: jocadena@colpos.mx; **María de Lourdes Arévalo Galarza**, Programa de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: larevalo@colpos.mx; **Libia Iris Trejo Téllez**, Laboratorio de Nutrición Vegetal, Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera. México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: tlibia@colpos.mx, y **Julián Delgadillo Martínez**, Área de Microbiología, Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: juliandm@colpos.mx.

*Autor para correspondencia: E-mail: despinos@colpos.mx

Recibido: 12 de junio 2016.

Aceptado: 14 de septiembre 2016.

Andrade-Luna MI, Espinosa-Victoria D, Gómez-Rodríguez O, Cadena Iñiguez J, Arévalo-Galarza ML, Trejo Téllez LI, Delgadillo Martínez J. 2016. Severity of a *Phytophthora capsici* strain in chayote *Sechium edule* plants at growth chamber level. 35 (1). DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1607-3

RESUMEN

Se determinó la severidad de *Phytophthora capsici* en plantas de chayote y se propuso una escala de severidad, dada su reciente confirmación como

ABSTRACT

The severity of *Phytophthora capsici* in chayote plants was determined and a scale of severity is proposed, given its recent confirmation as a causative agent of disease. Plants with wilting symptoms were sampled from two commercial chayote orchards in Huatusco, Veracruz, Mexico. The isolated oomycete, from fruits and stems, was characterized morphological and molecularly, which was identified as *P. capsici*. Chayote plants developed in growth chamber were inoculated with $1, 3$ y 6×10^5 zoospores 15 days after sowing. Necrosis of the transition zone between the stem

agente causal de enfermedad. Se muestrearon plantas con síntomas de marchitez en dos huertos comerciales de chayote en Huatusco, Veracruz, México. El oomiceto aislado, a partir de frutos y tallos, fue caracterizado morfológica y molecularmente e identificado como *P. capsici*. Plantas de chayote desarrolladas en cámara de crecimiento fueron inoculadas con $1, 3$ y 6×10^5 zoosporas 15 días después de la siembra. Se evaluaron la necrosis de la zona de transición entre el tallo y la raíz, el porcentaje de hojas marchitas y la marchitez de la planta. A los tres días después de la inoculación (ddi) se observó de 2.3 a 3.0 cm de longitud de la necrosis y 50 % de hojas marchitas. A los cinco ddi, la necrosis fue de 2.5 a 3.15 cm y 80 % de hojas marchitas. A los siete ddi, la necrosis fue de 2.67 a 3.3 cm con 100 % de hojas marchitas (planta muerta). Con base en los síntomas observados, se diseñó una escala de severidad para evaluar el avance del daño de *P. capsici* en plantas de chayote bajo condiciones controladas.

Palabras clave adicionales: Nivel de inóculo, Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces, Marchitez foliar.

INTRODUCCIÓN

El género *Phytophthora* es uno de los causantes de enfermedades del suelo con mayor impacto económico en todo el mundo (Lamour *et al.*, 2012). Este patógeno es altamente dinámico y destructivo, ya que ataca las raíces, tallos, hojas y frutos de una gran variedad de hortalizas (Lamour *et al.*, 2012). Además, posee ciclos sexual y asexual que dificultan el control de la enfermedad que causa (Ploetz *et al.*, 2002).

Inicialmente, Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010) reportaron a *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *F. sambucinum* como agentes causales de

and roots, the percentage of wilted leaves and wilting of the plant were evaluated. Three days after inoculation (dai), 2.3 to 3.0 cm of necrosis length and 50 % of wilted leaves were observed. At five day, necrosis was 2.5 to 3.15 cm with 80 % of wilted leaves. At seven day, necrosis was 2.67 to 3.3 cm with 100 % wilted leaves (dead plant). Based on the observed symptoms, a severity scale was designed to evaluate the progression of damage *P. capsici* in chayote plants grown under controlled conditions.

Additional key words: Inoculum level, Necrosis in the transitional zone between the stem and roots, leaf wilting

INTRODUCTION

The genus *Phytophthora* is one of the causes of soil diseases with the greatest economic impact in the world (Lamour *et al.*, 2012). This pathogen is highly dynamic and destructive, since it attacks roots, stems, leaves, and fruits of a large variety of vegetable crops (Lamour *et al.*, 2012). It also has sexual and asexual cycles that make it difficult to control the disease it causes (Ploetz *et al.*, 2002).

Initially, Rivera *et al.* (1992) and Olguín (2010) reported *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* and *F. sambucinum* as causative agents of the rotting of chayote in Costa Rica and Mexico, respectively. Later, Olguín *et al.* (2013) identified *Phytophthora capsici* as the causative agent of rotting in the transition area between the stem and the roots of the chayote plants. This oomycete is present in the soils of the production areas of the state of Veracruz, Mexico, where humidity levels are high.

The area of Huatusco, Veracruz, Mexico, in particular, is one of the most important areas in the production of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) worldwide. Recently in plants in orchards

la pudrición del chayote en Costa Rica y México, respectivamente. Más tarde, Olguín *et al.* (2013) identificaron a *Phytophthora capsici* como el agente causal de la pudrición de la zona de transición entre el tallo y la raíz de las plantas de chayote. Este oomiceto se encuentra presente en los suelos de las zonas productoras del estado de Veracruz, México, donde existe alta humedad.

Particularmente, la zona de Huatusco, Veracruz, México, es una de las principales zonas productoras de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) a nivel mundial. Recientemente, se han presentado en las huertas manchones de plantas con síntomas de marchitez en las hojas debido a la pudrición de la zona de transición entre el tallo y la raíz, que afecta la absorción de agua y que finalmente conduce a la muerte de la planta (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2006 y 2011; Cadena-Iñiguez y Arévalo-Galarza, 2008; Lira, 1992).

El rendimiento de la planta de chayote es de aproximadamente 130 ton de fruto ha⁻¹ en plantaciones comerciales con densidades de 100 a 128 plantas ha⁻¹. La producción por planta es aproximadamente de 47 a 120 kg en un periodo de seis meses, por lo que la muerte de varias plantas por hectárea representa pérdidas económicas significativas (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). A nivel nacional, entre 2010 y 2014 se obtuvo en promedio una producción de chayote de 162,600 toneladas (SIAP, 2016).

No obstante, se conoce muy poco sobre severidad inducida por *P. capsici*, dada su reciente confirmación etiológica. En este sentido, la medición y caracterización cuantitativa y cualitativa de la intensidad de una enfermedad (incidencia o severidad), es un requisito indispensable en estudios epidemiológicos básicos. Con esta información, se podrán generar en el futuro modelos de estimación de pérdidas, así como la importancia económica del daño (Campbell y Madden, 1990; Kranz, 1988).

there have been stains on leaves with symptoms of wilting due to the rotting of the transition area between the stem and the root, which affects the absorption of water, leading to the death of the plant (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2006 y 2011; Cadena-Iñiguez and Arévalo-Galarza, 2008; Lira, 1992).

The plant yield for the chayote plant is of approximately 130 ton of fruit ha⁻¹ in commercial plantations with densities of 100 to 128 plants ha⁻¹. Production per plant is of approximately 47 to 120 kg in a period of six months; therefore the death of several plants per hectare brings significant economic losses (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). On a national scale, from 2010 to 2014 the average chayote production was 162,600 tons (SIAP, 2016).

However, little is known on the severity induced by *P. capsici*, given its recent data etiological confirmation. In this sense, taking the measurements and quantitative and qualitative characteristics of the intensity of a disease (incidence or severity), is a crucial requirement in basic epidemiological studies. Using this information, loss estimation models could be produced in the future, along with the economic importance of the damage (Campbell and Madden, 1990; Kranz, 1988).

Due to the above, the aims of this work were to determine the degree of severity of *P. capsici* in *S. edule* plants at growth chamber level, with a controlled environment, and to create a visual scale of severity for its use and evaluation in production systems. The intention of this is to contribute to laying the foundations for a disease control system.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

The sampling area corresponded to two commercial orchards in the municipal area of

Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el grado de severidad de *P. capsici* en plantas de *S. edule* a nivel de cámara de crecimiento con ambiente controlado y elaborar una escala visual de severidad para su uso y evaluación en los sistemas de producción. Con lo anterior se pretende contribuir al establecimiento de las bases para un sistema de control de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La zona de muestreo correspondió a dos huertos comerciales del municipio de Huatusco, Veracruz, México, situados en las coordenadas: 19° 7' 23.1" N, 97° 0' 5.2" O y 19° 7' 21.6" N, 97° 0' 4.9" O, a una altitud de 1,333 msnm. Los tipos de suelos presentes en la zona de muestreo son Luvisoles y Cambisoles. El clima es semicálido-húmedo con una temperatura promedio de 18.8°C, precipitación pluvial media anual de 1,763 mm, y vegetación característica del subtropico perennifolio. Durante el mes de diciembre de 2014 se colectaron muestras de plantas chayote var. Ventlali que presentaba síntomas de pudrición característica (pérdida de turgencia, reblandecimiento del tejido vegetal, presencia de micelio y olor penetrante) en frutos y de la zona de transición entre el tallo y la raíz. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico debidamente rotuladas y colocadas en una hielera.

Aislamiento e identificación de microorganismos asociados con la enfermedad

Se colectaron 10 muestras, tanto de frutos como de la zona de transición entre el tallo y la raíz, de

Huatusco, Veracruz, Mexico, located in the coordinates 19° 7' 23.1" N, 97° 0' 5.2" W, and 19° 7' 21.6" N, 97° 0' 4.9" W, at an altitude of 1,333 masl. The types of soils present in the sampling area were Luvisols and Cambisols. The climate is semiwarm-humid with an average temperature of 18.8°C; average annual rainfall is 1,763 mm and the characteristic vegetation is of the evergreen subtropics. In December 2014, samples were gathered of chayote plants, var. Ventlali with symptoms of characteristic rotting (loss of turgidity, softening of plant tissue, presence of mycelia, and strong smell) in fruits and the transition area between stem and root. The samples were transported to the lab in plastic bags, which were labeled and placed in a cooler.

Isolation and identification of microorganisms related to the disease

Ten samples were taken of both fruit and of the transition area between stem and root, from each of the two areas of study. In this case, the number of samples taken from each location was standardized, unlike reports by Olguín *et al.* (2013). The infected tissue of chayote plants and fruits was washed with distilled water and cut into 6 sections of approximately 5 mm in length. The result was 60 sections (30 of fruit and 30 of the stem-root transition area). Likewise, 5 asymptomatic samples taken from fruits and the stem-root transition area were analyzed. The sections were disinfected with a commercial sodium hypochlorite solution 1 % for 1 min; they were rinsed several times with sterile distilled water, and dried with sterile paper towels. Later, the sections were cultivated in water-agar plates (acidified with lactic acid at 25 %) and incubated at 28 °C. Once myceliar growth was observed, using a hole puncher, discs of 0.5 cm in diameter were taken from the developed cultures,

cada uno de los dos sitios de estudio. En este caso, se uniformizó el número de muestras tomadas de cada sitio, a diferencia de lo reportado por Olguín *et al.* (2013). El tejido enfermo de plantas y frutos de chayote fue lavado con agua destilada y cortado en 6 secciones de aproximadamente 5 mm de longitud. Como resultado se obtuvieron 60 secciones (30 de fruto y 30 de la zona de transición tallo-raíz). Así también, se analizaron 5 muestras asintomáticas de frutos y de la zona de transición tallo-raíz. Las secciones se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1% por 1 min, se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Posteriormente, se realizó la siembra de las secciones en placas de agua-agar (acidificado con ácido láctico al 25%) y se incubaron a 28 °C. Una vez que se observó el crecimiento micelial, con ayuda de un sacabocados, se tomaron discos de 0.5 cm de diámetro de las colonias desarrolladas y se sembraron en placas de medio jugo V8-agar (V8) y papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 28°C por 48 h (French y Hebert, 1980; French-Monar *et al.*, 2006). El oomiceto desarrollado fue purificado en placas de medio V8-agar empleando monoesporangios. Las características cualitativas y cuantitativas de las estructuras asexuales (esporangióforos y esporangios) del oomiceto fueron analizadas a partir de preparaciones semi-permanentes con la ayuda de un microscopio compuesto (OLYMPUS. Mod: CX31RBSFA). Los esporangios fueron medidos a los 10 días de incubación en medio V8. Con el resultado de 100 mediciones se identificó al oomiceto empleando las descripciones de Newhook *et al.* (1978), Stamps (1985), O'Donnell (1992) y Gallegly y Hong (2008). El resto de los aislamientos fúngicos presentes en las muestras se purificaron por transferencia de colonias y se identificaron empleando las claves de Barnett y Hunter (1998).

and there were replanted in a V8 juice-agar (V8) and potato dextrose agar (PDA), and incubated at 28°C for 48 h (French and Hebert, 1980; French-Monar *et al.*, 2006). The oomycete developed was purified in V8-agar medium plate using monosporangia. The qualitative and quantitative characteristics of the asexual structures (sporangiophores and sporangia) of the oomycete were analyzed from semipermanent preparations with the use of a compound microscope (OLYMPUS. Mod: CX31RBSFA). The sporangia were measured after 10 days of incubation in V8 medium. With the result of 100 measurements, we identified the oomycete using the descriptions by Newhook *et al.* (1978), Stamps (1985), O'Donnell (1992), and Gallegly and Hong (2008). The rest of the fungal isolations present in the samples were purified by transferring cultures, and were identified using the taxonomic keys of Barnett and Hunter (1998).

Pathogenicity test of the isolated chayote oomycete

The oomycete with the highest frequency (76 %) was used to carry out the pathogenicity test. The chayote fruits were washed with soap and water, then disinfested with alcohol at 70 %. Using a blade, two cuts were made, each 1 cm deep, inside of which we placed a culture medium disc, of 0.5 cm in diameter, which contained the oomycete. Eighteen chayote fruits were inoculated. The control fruits were only added growth medium without oomycete growth. Afterwards, the inoculated fruit were placed in a wet paper towel on top of a base of styrofoam. The fruits were kept inside sealed plastic bags. The paper towel was added sterile distilled water to maintain moisture saturation conditions in the system. To stimulate the growth of the oomycete, the incubation temperature was

Prueba de patogenicidad del oomiceto aislado de chayote

El oomiceto que presentó la mayor frecuencia (76 %), fue utilizado para realizar la prueba de patogenicidad. Los frutos de chayote se lavaron con agua y jabón, y posteriormente se desinfectaron con alcohol al 70%. Con una navaja se hicieron dos incisiones de 1 cm de profundidad, en las que se colocó un disco de medio de cultivo de 0.5 cm de diámetro que contenía al oomiceto. Se inocularon 18 frutos de chayote. Los frutos testigo se les adicionó únicamente medio de cultivo sin crecimiento del oomiceto. Posteriormente, los frutos inoculados fueron colocados sobre una toalla de papel absorbente húmeda, que se encontraba sobre una base de unicel. Los frutos se mantuvieron dentro de bolsas de plástico cerradas. A la toalla se le agregó agua destilada estéril para mantener condiciones de saturación de humedad en el sistema. Para estimular el desarrollo del oomiceto, la temperatura de incubación se mantuvo entre 24 y 27°C, con un fotoperiodo de 12-12 h. Una vez que los frutos fueron invadidos por el micelio del oomiceto, éste fue reaislado en placas de medio V8. La morfología de las colonias obtenidas se comparó con la del aislamiento original de las huertas comerciales. El ensayo de patogenicidad se realizó dos veces.

Amplificación del ADN y secuenciación del oomiceto

Después de cuatro días de crecimiento del oomiceto en placas de medio V8, se tomó una porción de aproximadamente 5 mm de micelio y se colocó en un tubo de reacción de 200 µL conteniendo 30 µL de la solución de lisis, Lyse N Go (Pierce, USA). Posteriormente se colocó el tubo a 95 °C durante 5 min y se centrifugó por 10 min a 5,000 x g. Finalmente se tomaron 5 µL del sobrenadante para realizar las amplificaciones de los ITS mediante PCR.

kept between 24 and 27 °C, with a photoperiod of 12-12 h. Once the fruits were invaded by the mycelium of the oomycete, the latter was reisolated in V8 medium plates. The morphology of the cultures obtained was compared with that of the original isolation in commercial orchards. The pathogenicity test was performed twice.

DNA amplification and sequencing of the oomycete

After four days' growth of the oomycete in V8 medium plates, a portion of approximately 5 mm of mycelium was taken and placed in a 200 µL test tube with 30 µL of the lysis solution Lyse N Go (Pierce, USA). The tube was then heated at 95 °C for 5 min and centrifuged for 10 min at 5,000 x g. Finally, 5 µL of supernatant were taken to carry out the amplifications of the ITS by PCR.

For the amplification of the ITS area, we used the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), which amplify a fragment of 580 pairs of bases, approximately (pb). Another pair of primers used was ITS5 and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), to amplify a fragment of 1,100 pb, which included the region of the ITS and ~600 pb of the gene 28S rRNA. The reaction mixture for PCR was prepared in a final volume of 25 µL, containing the enzyme 1X Taq DNA polymerase, 0.8 mM deoxynucleotide triphosphates (0.2 mM each), 100 ng DNA, 20 pmol of each primer, and 2 units of GoTaq DNA (Promega, USA). The amplifications were carried out with an initial denaturation cycle at 95 °C for 2 min; 35 denaturation cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 57 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 2 min; finally, one amplification cycle at 72 °C for 10 min (Silva-Rojas *et al.*, 2009).

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGA-AGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), que amplifican un fragmento de 580 pares de bases aproximadamente (pb). Otro par de iniciadores utilizados fueron ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGT-GTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), para amplificar un fragmento de 1,100 pb, que incluyó la región del ITS y ~600 pb del gen 28S rRNA. La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo la enzima 1X Taq DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de GoTaq DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, el alineamiento a 57°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 2 min; finalmente un ciclo de amplificación a 72°C por 10 min (Silva-Rojas *et al.*, 2009).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Modelo: TECHNER TC-512, marca: Bibby Scientific). Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % preparado con el amortiguador 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) y corrimiento a 87 V cm⁻³ durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹), y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV (Modelo: GL-3120, Marca: Scientific). Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación (Modelo: QIAquick PCR, Marca: Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de DNA (Modelo 3730XL, Marca: Applied BioSystems), para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas.

All the PCR reactions were carried out in a thermocycler (Model: TECHNER TC-512, brand: Bibby Scientific). The amplifications were verified by electrophoresis in an agarose gel at 1.2 % prepared with the buffer 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) and run at 87 V cm⁻³ for 1 h. The gel became stained with ethidium bromide (3 mg L⁻¹), and the bands were viewed in a UV transilluminator (Model: GL-3120, brand: Scientific). The amplified products were cleaned using the purification kit (Model: QIAquick PCR, brand : Qiagen), following instructions by the manufacturer. These products were sequenced in both directions using an automated system DNA sequencing system (Model 3730XL, brand: Applied BioSystems), to ensure no incorrect nucleotide readings.

Comparing the ITS and LSU sequences

The sequences from both regions were assembled and edited using BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), used to create a consensual sequence. This sequence was compared with sequences deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), with the option BLASTN 2.2.19 (Brown *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2000).

Evaluation of the severity of the disease Planting the plant material

For the pregermination of the chayote fruits, we used a 40 x 60 cm black, plastic bag, in which 20 fruits were placed for 20 days. The fruits had previously been washed with soap and rinsed with a 0.6 % chlorine solution. Once the root and stem sprouted, each fruit was placed in a black plastic bag (25 x 25 cm) containing 2,500 cm³ of substrate composed of sand-agrolite-vecompost

Comparación de las secuencias ITS y LSU

Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Brown *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2000).

Evaluación de la severidad de la enfermedad Siembra del material vegetal

Para la pre-germinación de los frutos de chayote, se utilizó una bolsa negra de plástico de 40 x 60 cm donde se colocaron 20 frutos por 20 días. Los frutos previamente habían sido lavados con jabón y enjuagados con una solución de cloro al 0.6 %. Una vez que brotaron la raíz y el tallo, cada fruto germinado fue colocado en una bolsa de plástico negra (25 x 25 cm) que contenía 2,500 cm³ de sustrato compuesto por arena-agrolita-vecomposta (40:40:20), tratado dos veces con vapor a 120 libras de presión por tres horas. Los frutos se mantuvieron en una cámara de crecimiento (Modelo CEL 37-14, Marca: SHERER,) a una temperatura de 26±1 °C, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de obscuridad y una intensidad luminosa de 6,768 lux de luz fluorescente. Las plantas inicialmente fueron regadas a capacidad de campo, y posteriormente se realizaron riegos cada tres días con 300 mL de agua por planta hasta el fin del experimento.

Preparación del inóculo

El oomiceto se cultivó en placas de medio V8 por 7 días a 28 °C. A cada caja de Petri se le agregó solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9 % (AbbottMR) por 10 min. La solución isotónica se

(40:40:20), treated twice with steam under 120 pounds of pressure for three hours. The fruits were kept in a growth chamber (Model CEL 37-14, brand: SHERER,) at a temperature of 26±1 °C, with a photoperiod of 14 light hours and 10 of darkness, and a light intensity of 6, 768 lux of fluorescent light. The plants were initially watered at field capacity, and later, irrigated every three days with 300 mL of water per plant until the end of the experiment.

Preparation of the inoculant

The oomycete was cultivated in V8 medium plates for 7 days at 28 °C. Each Petri dish was added an isotonic solution of sodium chloride at 0.9 % (AbbottMR) for 10 min. The isotonic solution was poured out, and using a dissection needle, the dish was divided in four parts. Each part of the medium containing the oomycete was placed in a sterile Petri dish. Sterile distilled water was then added, until it covered the medium, and the dishes were placed under a cold white light at 26 °C for 48 h. The release of the zoospores was then induced, exposing the Petri dishes to two temperatures (4 °C and room temperature) for 30 min. Finally, the number of zoospores was quantified using a cytometer (Marienfeld®). Inoculation was performed when the plants had an average of 16 leaves (15 days after planting) applying a suspension of 1, 3 and 6 x 10⁵ zoospores to each plant in the transition zone between stem and root. Each treatment (level of inoculant) consisted of four plants and the control. To determine the level of inoculant, the minimum level of of *P. capsici* used by Trujillo-Viramontes *et al.* (2005) in JEP chili plants, was taken into consideration.

The progress of the damage induced by *P. capsici* was measured in cm from the transition area between stem and root. Apart from the length

decantó y con la ayuda de una aguja de disección, la placa se dividió en cuatro partes. Cada parte del medio conteniendo el oomiceto se colocó en una caja de Petri estéril. Después se agregó agua destilada estéril hasta cubrir el medio, y las cajas se colocaron bajo una lámpara de luz blanca fría a 26 °C por 48 h. Posteriormente, se indujo la liberación de zoosporas exponiendo las cajas Petri a dos temperaturas (4 °C y temperatura ambiente) por 30 min. Finalmente, se cuantificó el número de zoosporas con un citómetro (Marienfeld®). La inoculación se efectuó cuando las plantas tenían en promedio 16 hojas (15 días después de la siembra) aplicando una suspensión de 1, 3 y 6 x 10⁵ zoosporas por planta en la zona de transición entre el tallo y la raíz. Cada tratamiento (nivel de inóculo) consistió de cuatro plantas al igual que el testigo. Para la determinación del nivel de inóculo, se consideró el nivel mínimo de inóculo de *P. capsici* usado por Trujillo-Viramontes *et al.* (2005) en plantas de chile JEP.

El avance del daño inducido por *P. capsici* se midió en cm a partir de la zona de transición entre el tallo y la raíz. Además de la longitud de la necrosis, se determinó el número de hojas y guías marchitas así como presencia de micelio en la semilla a los 3, 5 y 7 días después de la inoculación (ddi). Con base en los síntomas y mediciones observadas, como se ha hecho con otros cultivos (Navarrete y Acosta, 1999), se diseñó una escala de severidad para evaluar la magnitud del daño de *P. capsici* en plantas de chayote en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas. El ensayo de evaluación de la patogenicidad se montó en tres ocasiones con similares resultados.

Análisis estadístico

Los datos de cada variable se sometieron al análisis de varianza y a la comparación de medias empleando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 2002-2003).

of the necrosis, we determined the number of wilted leaves and guides, as well as the presence of mycelia in the seed 3, 5 and 7 days after inoculation (ddi). Based on the symptoms and measurements observed, as in the case of other crops (Navarrete and Acosta, 1999), we designed a scale of severity to evaluate the damage of *P. capsici* in chayote plants in growth chambers under controlled conditions. The pathogenicity evaluation test was set up on three occasions with similar results.

Statistical analysis

The data of each variable underwent an analysis of variance and comparison of average, using the Tukey test ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 2002-2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Detecting *Phytophthora* in diseased chayote plants

Out of the 60 sections (30 fruit and 30 stem sections) planted in V8 agar, in 46 (76 %) *Phytophthora* sp grew, in 9 (15 %) *Fusarium*, and in 3 (4 %), *Alternaria*. The rest of the sections corresponded to saprophytic fungi and bacteria. Babadoost and Pavon (2013) indicate that the high frequency of *P. capsici*, as well as its virulence, determine its role as a causative agent of the disease. However, pathogenicity tests are required for each host plant. Rivera *et al.* (1992) and Olguín (2010) initially reported *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* and *F. sambucinum* as causative agents of rotting of chayote in Costa Rica and Mexico, respectively. However, the low frequency of *Fusarium* found in this investigation could indicate that the wilting of the chayote plants is not induced by this fungus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *Phytophthora* en plantas de chayote enfermas

De las 60 secciones (30 de fruto y 30 de tallo) sembradas en agar V8, en 46 (76 %) creció *Phytophthora* sp, en 9 (15 %) *Fusarium* y en 3 (4 %) *Alternaria*. El resto de las secciones correspondieron a hongos saprófitos y bacterias. Babadoost y Pavon (2013) indican que la alta frecuencia de *P. capsici*, así como su virulencia, determinan su papel como agente causal de enfermedad. No obstante, se requiere de las pruebas de patogenicidad para cada planta hospedera. Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010) reportaron inicialmente a *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *F. sambucinum* como agentes causales de la pudrición del chayote en Costa Rica y México, respectivamente. Sin embargo, la baja frecuencia de *Fusarium* encontrada en la presente investigación, podría ser indicativa de que la marchitez de las plantas de chayote no es inducida por este hongo.

Caracterización morfológica del oomiceto causante de la pudrición

Las colonias que se desarrollaron en placas de medio V8, presentaron hifas aéreas abundantes, de longitud considerable, algodonosas, poco radiadas y compactas. El micelio fue cenocítico, hialino, ramificado, de diámetro irregular. Los esporangios que se produjeron en placas de medio V8 y agua estéril (Figura 1a) presentaban tamaños y formas diferentes: ovoides, alimonadas (en promedio de 55 x 32 µm), con una papila prominente, caducos, principalmente con una sola papila (en pocas ocasiones se encontraron bipapilados) (Figura 1b),

Morphological characterization of the rot-causing oomycete

The cultures developed in V8 medium plates presented an abundance of aerial hyphae, of considerable length, cotton-like, little radial, and compact. The mycelium was cenocytic, hyaline, branched, and with an irregular diameter. The sporangia produced in V8 and sterile water medium plates (Figure 1a) presented different sizes and shapes: ovoid, starchy (on average, 55 x 32 µm), with a prominent papilla, expired, mainly with only one papilla (seldom were there any with two found) (Figure 1b), long and persistent peduncle, sometimes symmetrical and other times, assymetrical and with clamidospores (Figure 1c). The morphometric data of the sporangia indicate the presence of *Phytophthora capsici* in the transition area between stem and roots and the fruits of the chayote, which agrees with reports by Olguín *et al.* (2013), who indicated that this oomycete is the causative agent of rotting in chayote plants.

Pathogenicity test for *Phytophthora* sp. in plantlets in growth chambers with a controlled environment

The oomycete inoculated in the chayote fruits indicates the same characteristic rotting of the fruits it was isolated from: loss of turgidity, rotting and the presence of white mycelia 5 days after inoculation (Figure 2a). Under humid conditions (80 to 100 %) the growth of the pathogen was conspicuous (Figure 2b). In pieces of fruits with mycelia placed in sterile distilled water and under continuous white light (Figure 2c), we observed abundant sporangia, irregularly spread out (Figure 2d).

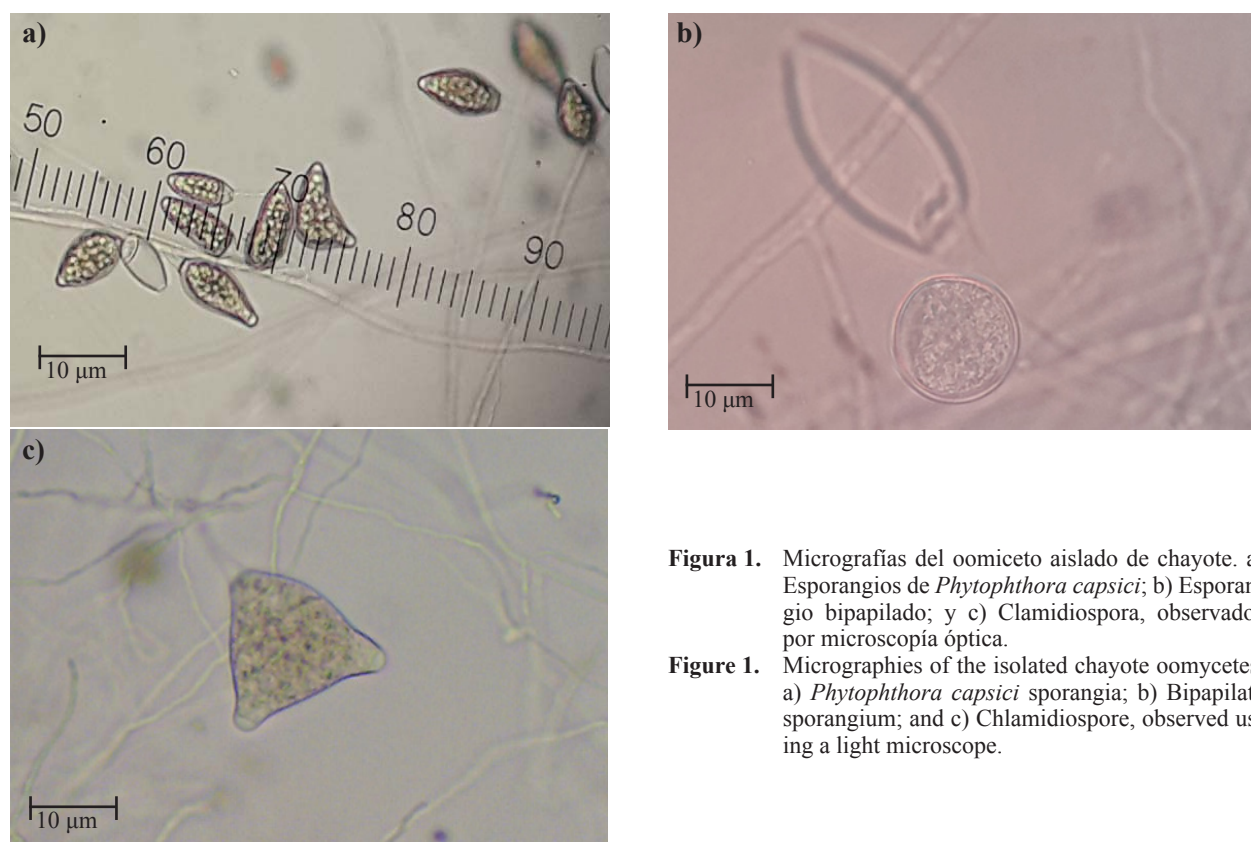


Figura 1. Micrografías del oomiceto aislado de chayote. a) Esporangios de *Phytophthora capsici*; b) Esporangio bipilado; y c) Clamidiospora, observados por microscopía óptica.

Figure 1. Micrographies of the isolated chayote oomycetes. a) *Phytophthora capsici* sporangia; b) Bipilate sporangium; and c) Chlamidospore, observed using a light microscope.

largos pedicelos persistentes, a veces simétricos y otros más asimétricos y con presencia de clamidiosporas (Figura 1c). Los datos morfométricos de los esporangios indican la presencia de *Phytophthora capsici* en la zona de transición entre el tallo y las raíces y los frutos del chayote, lo que concuerda con lo reportado por Olguín *et al.* (2013), quienes indicaron que este oomiceto es el agente causal de la pudrición de plantas de chayote.

Prueba de patogenicidad de *Phytophthora* sp. en plántulas en cámara de crecimiento con ambiente controlado

El oomiceto que se inoculó en los frutos de chayote indujo la misma pudrición característica de los frutos donde se aisló: pérdida de turgencia, pudrición y presencia de micelio blanco a los 5 días

Analyses of DNA sequences

The four sequences obtained in this study were placed in the GenBank-NCBI under the accession numbers KM087089, KM087090.1, KM087091, and KM087092. DNA sequencing confirmed that the isolated strain of the necrotic chayote tissue samples gathered in the area of study belonged to *Phytophthora capsici*, with an identity of 99 and 100 % with respect to the sequences of different isolations of the GenBank. It is worth mentioning that the strain with accession number KM087090.1, which showed an identity of 100 % (Table 1), was used in the severity test.

Severity of *P. capsici* in chayote plants

No significant differences ($\alpha=0.05$) were observed between the three levels of *P. capsici*

después de la inoculación (Figura 2a). Bajo condiciones de humedad, entre 80 y 100 %, el desarrollo del patógeno fue conspicuo (Figura 2b). En trozos de fruto con micelio que se colocaron en agua destilada estéril y bajo luz blanca continua (Figura 2c), se observaron abundantes esporangios esparcidos irregularmente (Figura 2d).

Análisis de secuencias de ADN

Las cuatro secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en el GenBank-NCBI bajo los números de acceso KM087089, KM087090.1, KM087091 y KM087092. La secuenciación del ADN confirmó que la cepa aislada de las muestras

inoculant for the variable number of wilted leaves, necrosis in the transition area between stem and roots, and wilting of chayote plants (Figure 3 a, b, and c). When the plants were inoculated with *P. capsici*, differences were observed with the control plants (not inoculated), like in reports by Uribe-Lorio *et al.* (2014) in their work with chili pepper plants. The control plants remained healthy throughout the experiment. As in the present study, other authors (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005) report that inoculation of 3×10^5 zoospores of the oomycete is enough to induce a response of the chili plant. Although no significant differences were found in the three levels of *P. capsisci* inoculant used, there were numerical differences.

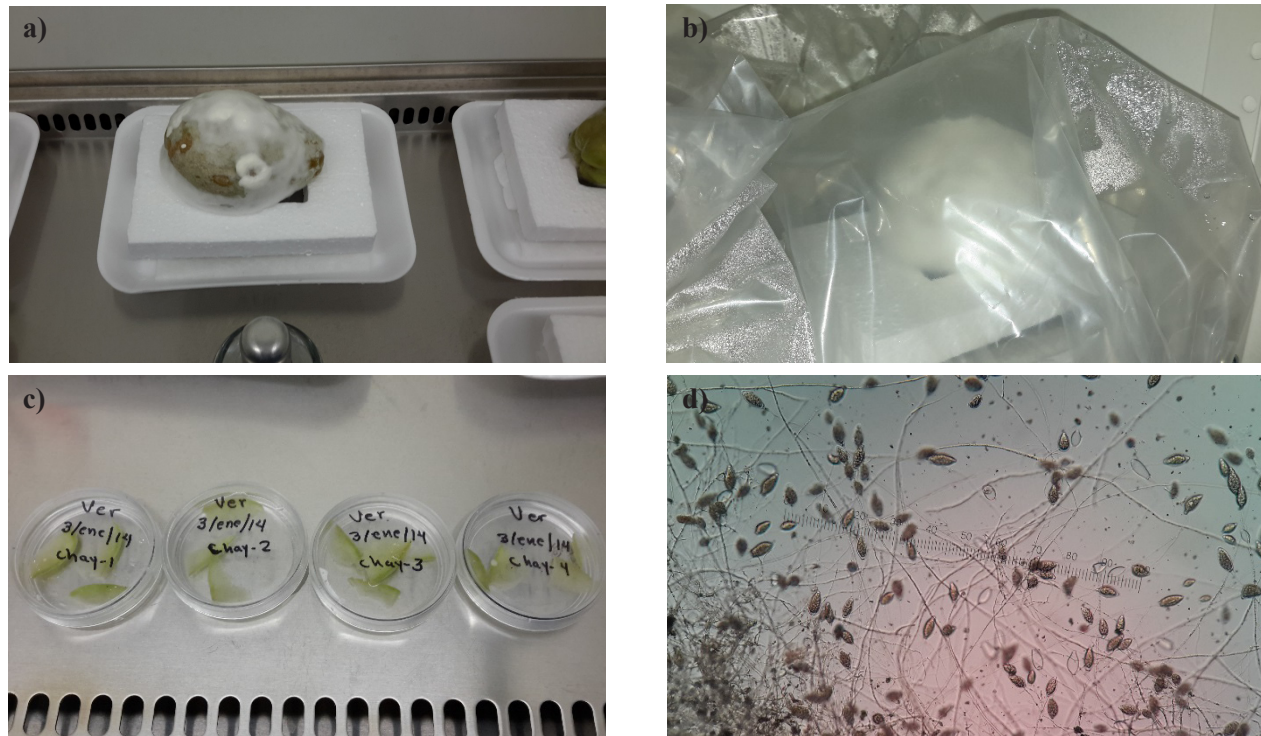


Figura 2. a) Frutos de chayote con presencia de micelio blanco, pérdida de turgencia y síntomas de pudrición; b) Frutos bajo condiciones de humedad, entre 80 y 100 %, con desarrollo conspicuo del patógeno; c) trozos de fruto con micelio colocados en agua destilada estéril bajo luz blanca continua; y d) esporangios esparcidos irregularmente.

Figure 2. a) Chayote fruits with white mycelia, loss of turgency, and symptoms of rotting; b) Fruits under conditions of humidity, between 80 and 100 %, with a conspicuous growth of the pathogen; c) pieces of fruit with mycelia, placed in sterile distilled water under continuous white light; and d) sporangia irregularly spread out.

de tejido necrótico de chayote, colectadas en la zona de estudio, correspondió a *Phytophthora capsici*, con una identidad de 99 y 100 %, con respecto a las secuencias de diferentes aislamientos del GenBank. Cabe señalar que la cepa con número de acceso KM087090.1, que presentó 100 % de identidad (Cuadro 1), fue utilizada en el ensayo de severidad.

Severidad de *P. capsici* en plantas de chayote

No se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tres niveles de inóculo de *P. capsici* para las variables número de hojas marchitas, necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces y marchitamiento de plantas de chayote (Figura 3 a, b y c). Cuando las plantas fueron inoculadas con *P. capsici*, se observaron diferencias con respecto a las plantas testigo (no inoculadas), igual como lo reportan Uribe-Lorio *et al.* (2014) en un trabajo realizado con plantas de chile. Las plantas testigos permanecieron sanas durante todo el experimento. Al igual que en el presente estudio, otros autores (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005) reportan que la inoculación de 3×10^5 zoosporas del oomiceto es suficiente para inducir la respuesta de la planta de chile. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tres niveles de inóculo de *P. capsici*, empleados, si se observaron diferencias numéricas. Probablemente, 3×10^5 zoosporas por planta sea el límite umbral superior, arriba del cual el daño en plantas de chayote no será estadísticamente significativo.

Con los datos obtenidos se construyó la curva de progreso de la enfermedad. Independientemente del nivel de zoosporas inoculado, a los tres ddi, se observó el 50 % de hojas marchitas y de 2.3 a 3.0 cm de necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces (Figura 4). A los cinco ddi, el marchitamiento

Cuadro 1. E-value, % de identidad y número de acceso en el GenBank-NCBI de las cepas de *Phytophthora capsici* aisladas de frutos y de la zona de transición entre el tallo y las raíces de plantas de chayote *Sechium edule*.

Table 1. E-value, % of identity and access number in the GenBank-NCBI of the *Phytophthora capsici* strains isolated from fruits and the transition area between the stem and roots of *Sechium edule* chayote plants.

E-value	% de identidad	No. de acceso en el GenBank-NCBI
2E-114	99	GU111637
0.0	100	KM087090.1
0.0	100	AB688327
0.0	100	KF611675

Probably, 3×10^5 zoospores per plant is the top threshold, above which damage in chayote plants may not be statistically significant.

Using the data obtained, we built the disease progress curve. Regardless of the level of zoospores inoculated, at three ddi, we observed 50 % of wilted leaves, and 2.3 to 3.0 cm of necrosis in the transition area between stem and roots (Figure 4). At five ddi, wilting of leaves was 80% with the progress of necrosis at 2.5 to 3.15 cm and the presence of mycelia on the seed (the fruit). At seven ddi leaves presented 100 % wilting, necrosis from 2.67 to 3.3 cm, and the presence of mycelia in guides, seed, and roots. Therefore, the three levels of *P. capsici* inoculant were equally effective for the induction of wilting of chayote plants. Comparatively, the time of appearance of symptoms of the disease was lower than that reported by Olguín *et al.* (2013). The level of inoculation was crucial, while Olguín *et al.* (2013) used 11,500 sporangia mL⁻¹, this investigation used 1, 3 and 6×10^5 zoospores mL⁻¹.

The necrosis in the transition area between stem and roots was observed starting on day 3 after

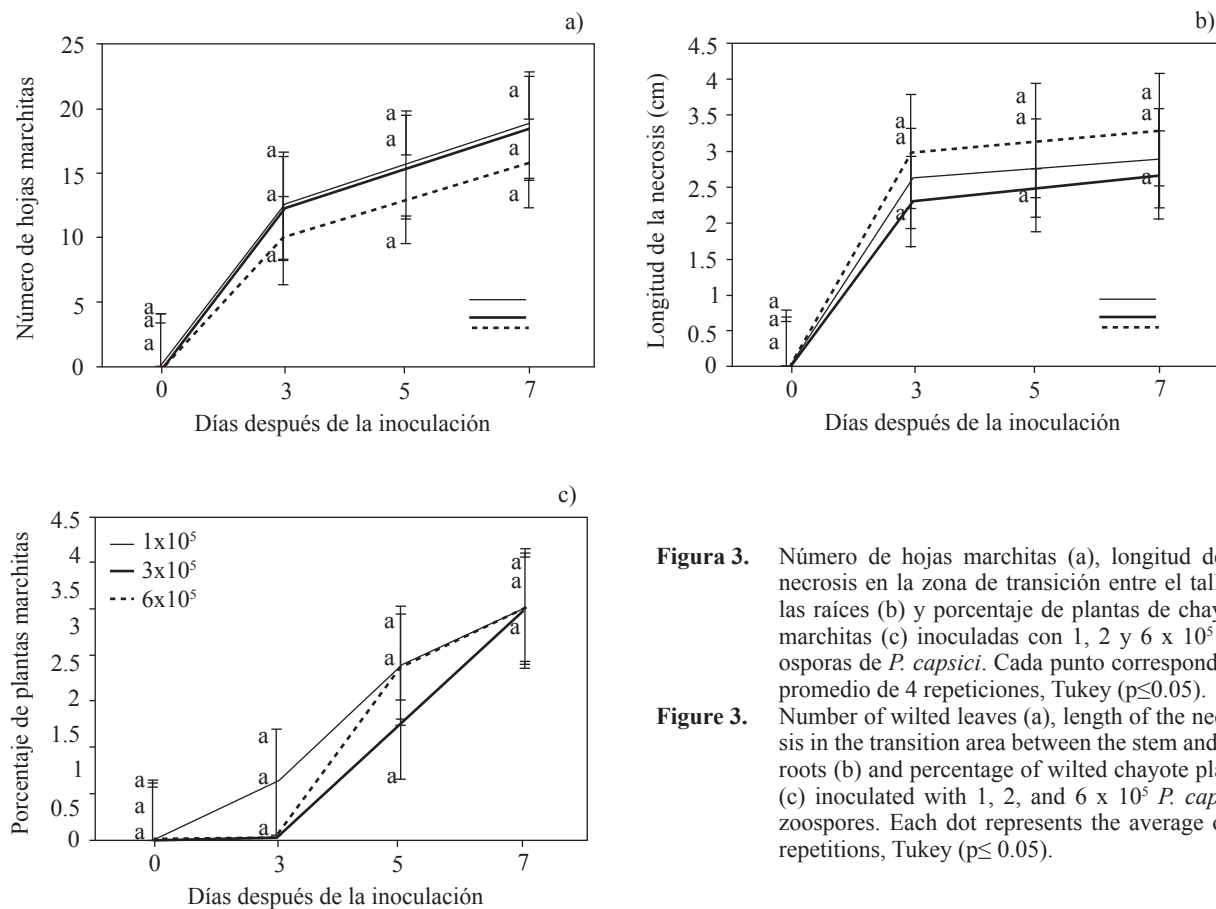


Figura 3. Número de hojas marchitas (a), longitud de la necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces (b) y porcentaje de plantas de chayote marchitas (c) inoculadas con 1, 2 y 6 x 10⁵ zoosporas de *P. capsici*. Cada punto corresponde al promedio de 4 repeticiones, Tukey (p≤0.05).

Figure 3. Number of wilted leaves (a), length of the necrosis in the transition area between the stem and the roots (b) and percentage of wilted chayote plants (c) inoculated with 1, 2, and 6 x 10⁵ *P. capsici* zoospores. Each dot represents the average of 4 repetitions, Tukey (p≤ 0.05).

de las hojas fue de 80 % con un avance de la necrosis de 2.5 a 3.15 cm y presencia de micelio sobre la semilla (el fruto). A los siete ddi se presentó 100 % de marchitamiento de las hojas, necrosis de 2.67 a 3.3 cm y presencia de micelio en guías, semilla y la raíz. Así, los tres niveles de inóculo de *P. capsici* fueron igualmente efectivos para inducir el marchitamiento de las plantas de chayote. Comparativamente, el tiempo de aparición de los síntomas de la enfermedad fue menor al reportado por Olguín *et al.* (2013). El nivel del inóculo fue crucial, mientras que Olguín *et al.* (2013) usaron 11,500 esporangios mL⁻¹, en la presente investigación se emplearon de 1, 3 y 6 x 10⁵ zoosporas mL⁻¹.

inoculation, regardless of the level of inoculant. Early necrosis may have accelerated plant wilting.

At five ddi, plant wilting was observed to be above 50 %, also regardless of the level of inoculant, which shows the pathogenicity of the isolation studied, according to reports by Olguín *et al.* (2013). At seven ddi, necrosis development was, on average, 3.0 cm, which contributed to the wilting of plants at 100 %. Probably, the degradation of cell walls and middle lamella of the parenchyma tissue of the vascular system, typically caused by *P. capsici*, appeared in the transition area between stem and roots, which prevented the flow of water and nutrients for the adequate development of the plant (Li, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

La necrosis de la zona de transición entre el tallo y las raíces fue observada desde los 3 días después de la inoculación, independientemente del nivel de inóculo. La necrosis temprana pudo acelerar el marchitamiento de las plantas.

A los cinco ddi, se observó más del 50 % de marchitez de las plantas, también independiente del nivel de inóculo, lo que demuestra la patogenicidad del aislamiento estudiado, de acuerdo a lo reportado por Olguín *et al.* (2013). A los siete ddi, el desarrollo de la necrosis fue en promedio de 3.0 cm, lo que coadyuvó al 100 % de plantas marchitas. Probablemente, la degradación de la pared celular y lamela media del tejido parenquimatoso del sistema vascular, causado típicamente por *P. capsici*, se presentó en la zona de transición entre el tallo y las raíces, lo cual no permitió el paso de agua y nutrientes para el óptimo desarrollo de la planta (Li, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

El sustrato utilizado fue crucial en el experimento, ya que este proveyó condiciones de alta humedad que favorecieron el desarrollo y diseminación de *P. capsici*. La alta humedad favoreció la movilidad de zoosporas asegurando la infección por parte del oomiceto. Silva-Rojas *et al.* (2009) indican que efectivamente, dicho factor ambiental es crucial para la diseminación de *P. capsici*.

La curva de progreso de la enfermedad (Figura 4) sirvió como base para elaborar una Escala de Severidad (Cuadro 2), con la que es factible evaluar los daños producidos por *P. capsici* en chayote bajo condiciones controladas. La escala fue validada en tres ocasiones. Las variables utilizadas para elaborar la escala fueron: porcentaje de hojas marchitas, longitud de necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces, porcentaje de planta marchita y presencia de micelio. Con lo anterior se pretende contribuir al establecimiento de las bases para un sistema de control de la enfermedad inducida por *P. capsici* en plantas de chayote.

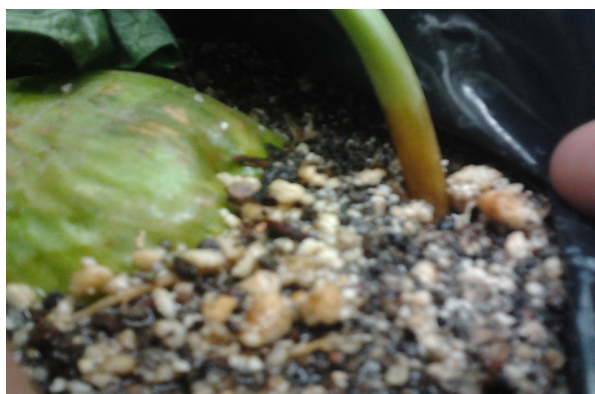


Figura 4. Avance de la necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de plántulas de chayote a los tres días de la inoculación con 300,000 zoosporas de *P. capsici*.

Figure 4. Progress of the necrosis in the transition area between the stem and the roots of chayote plantlets three days after inoculation with 300,000 *P. capsici* zoospores.

The substrate used was crucial in the experiment, since it provided high humidity conditions which favored the development and spreading of *P. capsici*. High humidity levels favored the mobility of zoospores, ensuring the infection by the oomycete. Silva-Rojas *et al.* (2009) indicate that, indeed, this environmental factor is crucial for the spreading of *P. capsici*.

The progress curve of the disease (Figure 4) was the base from which to create a Severity Scale (Table 2), which can be used to evaluate damages produced by *P. capsici* in chayote under controlled conditions. The scale was validated on three occasions. The variables used to create the scale were: percentage of wilted leaves, length of necrosis in the transition area between stem and roots, percentage of wilted plant, and the presence of mycelia. This attempts to become a contribution for the basis of a system for the control of the disease induced by *P. capsici* in chayote plants.

Cuadro 2. Escala de severidad para evaluar los daños producidos por *P. capsici* en plantas de chayote crecidas bajo condiciones controladas.

Table 2. Scale of severity to evaluate the damages produced by *P. capsici* in chayote plants grown under controlled conditions.

Escala de severidad	Síntomas
1	Sin síntomas visibles de enfermedad
2	Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 0.5 a 1.0 cm, con 15% de hojas marchitas.
3	Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 1.1 a 1.5 cm, con 30% de hojas marchitas.
4	Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 1.6 a 2.0 cm, con 50% de hojas marchitas.
5	Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 2.1 a 2.5 cm, con 75% de hojas marchitas.
6	Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 2.6 a 3.0 cm, con 100% de hojas marchitas, planta muerta. Semilla cubierta con micelio en su totalidad.

CONCLUSIONES

La cepa PCSE2 con número de acceso KM087090.1 identificada como *P. capsici*, aislada de plantas enfermas de chayote en Huatusco, Veracruz, México, indujo síntomas desde una nivel de inóculo de 1×10^5 zoosporas, resultando en la marchitez y muerte de plantas a los 5 y 7 ddi. La inoculación de 3×10^5 zoosporas promovió la presencia de plantas con síntomas de marchitez desde los 3 ddi, probablemente porque la necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces no permitió el paso de agua y nutrimentos para el óptimo desarrollo de la planta.

Aunque no se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tres niveles de inóculo de *P. capsici* para las variables número de hojas marchitas, necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces y marchitamiento de plantas de chayote, con los datos del progreso de la enfermedad se diseñó una escala de severidad, como una herramienta inicial para evaluar el daño producido por *P. capsici* en plantas de chayote crecidas bajo condiciones controladas.

CONCLUSIONS

The strain PCSE2, with the accession number KM087090.1 identified as *P. capsici*, isolated from diseased chayote plants in Huatusco, Veracruz, Mexico, induced symptoms from an inoculant level of 1×10^5 zoospores, resulting in the wilting and death of plants at 5 and 7 ddi. The inoculation of 3×10^5 zoospores promoted the presence of plants with symptoms of wilting after 3 ddi, probably because the necrosis in the transition area between stem and roots did not allow the flow of water and nutrients for the adequate development of the plant.

Although no significant differences ($\alpha=0.05$) were observed between the *P. capsici* inoculant for the variables number of wilted leaves, necrosis in the transition area between stem and roots, and wilting of chayote plants, with the disease progress curve, we designed a scale of severity, as an initial tool to evaluate the damage produced by *P. capsici* in chayote plants grown under controlled conditions.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC), por su financiamiento para la realización de este trabajo.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council (CONACYT)-National Quality Graduate Program (PNPC), for funding this work.

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

## LITERATURA CITADA

- Babadoost M and Pavon C. 2013. Survival of oospores of *Phytophthora capsici* in soil. Plant Dis. 97:1478-1483. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1123-RE>.
- Barnett LH and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, U.S.A. 218 p. Disponible en línea: <http://www.apsnet.org/apsstore/shopapspress/pages/41922.aspx>
- Brown SP, Rigdon-Huss AR and Jumpponen A. 2014. Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent result on fungal community responses. Fungal Ecology. 9:65-68. doi:10.1016/j.funeco.2014.02.002
- Cadena-Iñiguez J, Ruiz PLM, Avendaño ACH, Cisneros VM, Soto HMR y Aguirre MJF. 2006. Origen y Biodiversidad de *Sechium edule* en el Estado de Veracruz México. Chapingo, Huatusco Veracruz, México. Revista Centro Regional Universitario Oriente pp. 1-16.
- Cadena-Iñiguez J y Arévalo-Galarza ML. 2008. Rescatando y Aprovechando los Recursos Fitogenéticos de Mesoamérica. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 16 p. Disponible en línea: <http://gobernanzabiodiversidad.mx/biblioteca/component/content/article/50-casos-de-estudio/989-gisem-rescatando-y-aprovechando-los-recursos-fitogeneticos-de-mesoamerica-volumen-1-chayote>
- Cadena-Iñiguez J, Arrazate ACH, Soto HMR, Ruiz PLM and Aguirre MJF. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* in the state of Veracruz, Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution. 55:835-847. DOI: 10.1007/s10722-007-9288-4
- Cadena-Iñiguez J, Soto HMR, Arévalo GML, Avendaño ACH, Aguirre MJF y Ruiz PLM. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. Revista Chapingo Serie Horticultura, Vol. XVII, Edición Especial 2:45-55. Doi: [dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.17.044](http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.17.044)
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p
- French ER y Hebert TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. 148 p. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA), San José, Costa Rica.
- French-Monar RD, Jones JB and Roberts PD. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetables farms. Plants Disease. 90:345-350. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0345>
- Galleghy ME and Hong C. 2008. Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, U.S.A. 158 p.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98. Disponible en línea: [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwic3YOUIO3NAhVGqh4KHeokCuEQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fbrownlab.mbio.ncsu.edu%2FJWB%2Fpapers%2F1999Hall1.pdf&usg=AFQjCNEUNhUvAhTBCOXpD1PdvNFuRrQDA&sig2=OGI0P2DpO8w48wA7\\_ubq5A&bvm=bv.126130881,d.dmo&cad=rja](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwic3YOUIO3NAhVGqh4KHeokCuEQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fbrownlab.mbio.ncsu.edu%2FJWB%2Fpapers%2F1999Hall1.pdf&usg=AFQjCNEUNhUvAhTBCOXpD1PdvNFuRrQDA&sig2=OGI0P2DpO8w48wA7_ubq5A&bvm=bv.126130881,d.dmo&cad=rja)
- Kranz J. 1988. Measuring Plant Disease. In: Kranz J and Rotem J (eds.). Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp. 35-50. DOI: 10.1007/978-3-642-95534-1\_4
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Molecular Plant Pathology 13(4):329-337. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Li P, Feng B, Wang H, Tooley PW and Zhang, X. 2011. Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. Microbiology 51: 61-70. DOI: 10.1002/jobm.201000317
- Lira R. 1992. Chayote (*Sechium edule*). In: Hernández Bermejo JE y León J. (Eds.). Cultivos marginados. FAO. Roma. pp. 77-82.
- Navarrete NR y Acosta GJ. 1999. Reacción de variedades de frijol común a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* en el Altiplano de México. Agronomía Mesoamericana 10(1): 37-46.
- Newhook FJ, Waterhouse GM and Stamps DJ. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 143. 21 p. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaries*). Current Genetics 22:213-220. DOI: 10.1007/BF00351728
- Olguín, H. G. 2010. Identificación y caracterización morfológica, cultural y molecular de hongos asociados a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 118p.

- Olguín FG, Valdovinos PG, Cadena-Iñiguez J y Arévalo GML. 2013. Etiología de la marchitez de plantas de chayote (*Sechium edule*) en el Estado de Veracruz. Revista Mexicana de Fitopatología. 2:161-169. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509007>
- Ploetz R, Heine G, Haynes J and Watson M. 2002. An investigation of biological attributes that may contribute to the importance of *Phytophthora capsici* as a vegetable pathogen in Florida. Ann Appl Biol. 140:61-67. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2002.tb00157.x
- Rivera G, Brenes F y Gamboa W. 1992. Hoja divulgativa sobre las principales enfermedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). El Cocoro, COOPECHAYOTE R.L. 2p.
- Stamps DJ. 1985. *Phytophthora capsici*. Description of pathogenic fungi and bacteria. No. 836. 2 p. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. England.
- SAS-Institute. 2002-2003. Statistical Analysis System Institute. Software Version 9.1, SAS Institute, Vary, NC, USA. DOI: 10.2307/2234420
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON) 1980-2014. SAGARPA. Consultado en agosto de 2016.
- Silva-Rojas, HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quesada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología. 27(2): 134-147. Disponible en línea: [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL4Petmu3NAhXKsB4KHazCBnQQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.mx%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci\\_arttext%26pid%3DS0185-33092009000200006&usg=AFQjCNEJeKA09eSU3tD-H3MIYQ2IR-WxaoA&sig2=p4zS4arDdXNL5nhV52Cplw&bvm=bv.126130881,d.dmo](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL4Petmu3NAhXKsB4KHazCBnQQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.mx%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS0185-33092009000200006&usg=AFQjCNEJeKA09eSU3tD-H3MIYQ2IR-WxaoA&sig2=p4zS4arDdXNL5nhV52Cplw&bvm=bv.126130881,d.dmo)
- Trujillo-Viramontes, F, Zavaleta-Mejía E, Rojas-Martínez RI, y Lara J. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en chile (*Capsicum annuum*). Nematropica 35:37-44. [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL9bb98\\_nOAhUBxoMKHdVzDQAQFggBMAA&url=http%3A%2F%2Fjournals.fcla.edu%2Fnematropica%2Farticle%2Fdownload%2F69712%2F67372&usg=AFQjCNHLz2Z4ZkeOshK7YiIX8SSHFPmUXw&sig2=L\\_INCZNgDJQhUiYt0542oQ](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL9bb98_nOAhUBxoMKHdVzDQAQFggBMAA&url=http%3A%2F%2Fjournals.fcla.edu%2Fnematropica%2Farticle%2Fdownload%2F69712%2F67372&usg=AFQjCNHLz2Z4ZkeOshK7YiIX8SSHFPmUXw&sig2=L_INCZNgDJQhUiYt0542oQ)
- Uribe-Lorio L, Castro BL, Arauz CF, Henríquez HC y Blanco MM. 2014. Pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile tratadas con vermicompost. Agron. Mesoam. 25(2):243-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v25i2.15427>
- Wang H, Li F and Zhang X. 2011. Comparison of expression, purification and characterization of a new pectatelyase from *Phytophthora capsici* using two different methods. BMC Biotechnology 11:32. DOI: 10.1186/1472-6750-11-32
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. Academic Press, Inc., New York. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Zhang; Z., Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology. 7:203:214. doi: 10.1089/10665270050081478