

Etiology of habanero pepper (*Capsicum chinense*) wilt in Tabasco, Mexico

Etiología de la marchitez del chile habanero (*Capsicum chinense*) en Tabasco, México

Karina Moctezuma-Bautista, Carlos Fredy Ortiz-García*, David Jesús Palma-López, Luis Alberto Cerón-Hernández, Colegio de Postgraduados, Periférico Carlos A. Molina, Km 3.5. Carretera Cárdenas-Huimanguillo, Cárdenas, Tabasco, CP 86500, México; **Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Gerardo Rodríguez-Alvarado**, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, CP. 58880, México; **Nadia Landero-Valenzuela**, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Domicilio conocido s/n. Tepatepec, Francisco I. Madero, Hidalgo, C.P. 42660, México. *Autor para correspondencia: cfortiz@colpos.mx

Recibido: 04 de Marzo, 2021.

Aceptado: 15 de Julio, 2021.

Moctezuma-Bautista K, Ortiz-García CF, Palma-López DJ, Cerón-Hernández LA, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G and Landero-Valenzuela N. 2021. Etiology of habanero pepper (*Capsicum chinense*) wilt in Tabasco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(3).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2103-5>

Primera publicación DOI: 30 de Julio, 2021.

First DOI publication: July 30, 2021.

Resumen. El objetivo de este estudio fue detectar el agente causal de la marchitez del chile habanero en cuatro municipios de Tabasco, en las áreas cacaoteras donde se está incentivando la producción de chile habanero. Se realizaron muestreos en cuatro municipios: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) y Centro (3). Las muestras se

Abstract. The objective of this study was to detect the causal agent of habanero bell pepper wilt in four municipalities of Tabasco, in cocoa-growing areas where habanero bell pepper production is being encouraged. Sampling was carried out in four municipalities: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) and Centro (3). Samples were sown and isolated for morphological and molecular identification. Six *Phytophthora* (1) and *Fusarium* (5) isolates obtained from 15 habanero pepper plantations were tested for pathogenicity. The *Phytophthora* isolate (CH132) was pathogenic in the pathogenicity test on two-month-old habanero pepper seedlings; however, none of the *Fusarium* isolates showed pathogenicity. The *Phytophthora* strain was identified as *P. capsici* using morphological characteristics and the use of the COI sequence. *P. capsici* strains were not shown to be pathogenic on cocoa pods. *P. capsici* was not detected habanero peppers seedlings in the

sembraron y aislaron para la identificación morfológica y molecular. Se realizaron pruebas de patogenicidad con seis aislamientos: *Phytophthora* (1) y *Fusarium* (5) obtenidos de 15 plantaciones de chile habanero. El aislado *Phytophthora* (CH132) fue patogénica en la prueba de patogenicidad, en plántulas de chile habanero de dos meses de edad y, ninguno de los aislados de *Fusarium* mostró patogenicidad. La cepa de *Phytophthora* fue identificada como *P. capsici* empleando características morfológicas y el uso de la secuencia del COI. Las cepas de *P. capsici* no se mostraron patogénicas en mazorcas de cacao. No se detectó a *P. capsici* en las plántulas de chile de los municipios cacaoteros de Huimanguillo, Cárdenas y Cunduacán en la subzona hidrológica 1, pero *P. capsici* sí está presente en Acachapa y Colmena, Centro, Tabasco.

Palabras clave: *Phytophthora capsici*, cacao, morfología, amplificación, ADN, COI.

Dentro de las especies de chile cultivadas en México se encuentra el chile habanero (*Capsicum chinensis*) producido en Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Tabasco. En 2015 la producción de chile habanero en Tabasco fue de 3,055.5 t (SIAP, 2015). Sin embargo, en los últimos años, este cultivo se ha introducido a municipios propiamente cacaoteros. En México, se ha reportado la marchitez del chile, atacando diferentes tipos de chiles y causando pérdidas hasta un 40% en varios estados de la república mexicana (Silva-Rojas *et al.*, 2009; Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Sin embargo, en Tabasco se presume la presencia de *P. capsici* con la marchitez del chile habanero (López-López *et al.*, 2018) basados en la sintomatología, por lo que se requiere la corroboración de la presencia de *P. capsici*. Montes y de los Santos, (1989) y Ortiz-García (1996) señalan la presencia

cacao-growing municipalities of Huimanguillo, Cárdenas and Cunduacán in hydrological subzone 1, but *P. capsici* is present in Acachapa and Colmena, Centro, Tabasco.

Key words: *Phytophthora capsici*, cacao, morphology, amplification, DNA, COI.

One of the chili pepper species planted in Mexico is the habanero (*Capsicum chinensis*), produced in Campeche, Quintana Roo, Yucatan and Tabasco. In 2015, the production of habanero peppers in 3,055.5 t (SIAP, 2015). However, in recent years this crop has been introduced into cocoa-producing municipalities. In Mexico, wilt has been reported in chili pepper plants, attacking different types of peppers and causing losses of up to 40% in several states in Mexico (Silva-Rojas *et al.*, 2009; Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Nevertheless, the presence of *P. capsici* is suspected in Tabasco with the wilt of habanero peppers (López-López *et al.*, 2018) based on the symptomatology, therefore the presence of *P. capsici* must be corroborated. Montes and de los Santos (1989) and Ortiz-García (1996) indicate the presence of *P. capsici* in cocoa trees, according to the criteria of Tsao and Alizadeth (1988), later pointed out by Uchida *et al.* (1992) as *P. tropicalis*, considering that the species of *Phytophthora* that attack both the cocoa trees and the pepper plants are phylogenetically related in clade 2 (Martin *et al.*, 2012). Likewise, Donahoo and Lamour (2008) point out that when populations are superimposed, hybridization can take place after generation F1 both species of *Phytophthora*; this situation was documented *in vitro* by Hurtado-González and Lamour (2009) with cucumber and pumpkin strains in the USA, in the same way that Ortiz-García (1996) did with pumpkin *Phytophthora*

de *P. capsici* en cacao de acuerdo con los criterios de Tsao y Alizadeth (1988) posteriormente señalada por Uchida *et al.* (1992) como *P. tropicalis*. Considerando que las especies de *Phytophthora* que atacan tanto al cacao y al chile están filogenéticamente relacionadas en el clade 2 (Martin *et al.*, 2012). Asimismo, Donahoo y Lamour (2008) señalan que cuando existen poblaciones superpuestas, de ambas especies de *Phytophthora*, puede darse la hibridación después de la generación F; situación que documenta *in vitro* Hurtado-González y Lamour (2009) con cepas de pepino y calabaza en USA, al igual que Ortiz-García (1996) con cepas de *Phytophthora* de calabaza de Francia y de cacao de México. Con base a lo anterior, y dada la importancia que tiene el cacao en Tabasco, y la ampliación de la superficie cultivada del chile habanero en la zona cacaotera de Tabasco, hizo imprescindible determinar el agente causal de la marchitez del chile habanero en las áreas cacaoteras donde se está incentivando la producción de chile habanero, en municipios de Tabasco.

Área de estudio. El área de estudio fue un transecto de 82 km que inicia en el C-34, Huimanguillo y finaliza en Acachapa y Colmena, Centro, en dirección oeste-este, pasando por comunidades cacaoteras de Huimanguillo, Cárdenas y Cunduacán en la subzona hidrológica 1 y llegando a la subzona 2, en Acachapa y Colmena, Centro Tabasco (Figura 1) en cuyas vecindades se ubican comunidades tradicionalmente cacaoteras con plantaciones de chile habanero.

Colecta y aislamiento. De enero a mayo de 2018, se visitaron 15 plantaciones de chile habanero en cuatro municipios de Tabasco: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) y Centro (3) donde las plantas de chile con síntomas de diferente grado de marchitez se colectaron. Para aislar los

strains of france in France and cocoa of Mexico. Based on this, and given the importance of the cocoa tree in Tabasco, as well as the expansion of the plantation areas of the habanero pepper in the cocoa-producing area of Tabasco, it became crucial to determine the causal agent of the wilting of the habanero pepper plant in cocoa-producing areas in which the production of the habanero pepper is being incentivized in municipalities of Tabasco.

Area of Study. The area of study was an 82 km transect beginning in C-34, Huimanguillo, and ending in Acachapa and Colmena, Centro, from west to east, covering cocoa-producing areas of Huimanguillo, Cárdenas and Cunduacán in hydrological area 1 and reaching subzone 2 in Acachapa y Colmena, Centro Tabasco (Figure 1) in the vicinities of which are traditionally cocoa-producing communities with habanero pepper plantations.

Collection and isolation. From January to May 2018, 15 habanero pepper plantations in four municipalities of Tabasco were visited: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) and Centro (3), in which plants with symptoms of different degrees of wilt were collected. To isolate the associated microorganisms, small fragments of tissue were cut, disinfected, washed and dried in a V8-Agar culture medium and incubated at 25 ± 1 °C in the dark for 7 days in a Prendo® incubator. The cultures were purified using the hypha tip method, following the method by Ortiz-García (1996). Identification at the genus level adhered to the keys by Barnett and Hunter (1972) for *Fusarium* and by Erwin and Ribeiro (1996) for *Phytophthora*.

Pathogenicity tests in habanero chili plants. The pathogenicity test was carried out with each microorganism isolated from wilting plants in

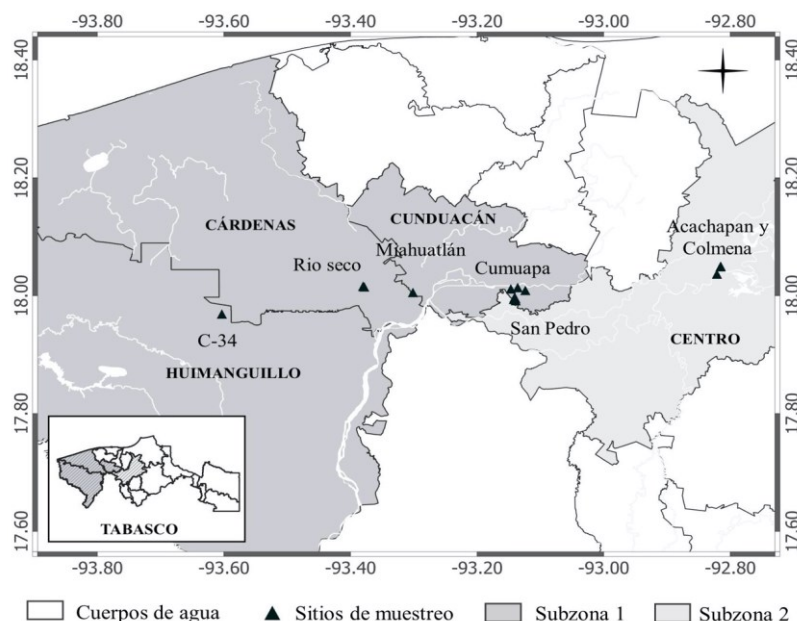


Figura 1. Transecto de comunidades de los municipios de Huimanguillo, Cárdenas, Cunduacán en la subzona 1, y del Centro, en la subzona 2 en Tabasco, donde se colectaron plantas de chile habanero con marchitamiento, en la zona hidrológica Grijalva.

Figure 1. Transect of communities of the municipal areas of Huimanguillo, Cárdenas, Cunduacán in subzone 1, and of Centro, in subzone 2 in Tabasco, where habanero pepper plants with wilt were collected, in the Grijalva hydrological zone.

microrganismos asociados, se cortaron pequeños fragmentos de tejido, desinfectados, lavados y secos se sembraron en medio de cultivo V8-Agar y se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad durante siete días en una incubadora Prendo®. Los cultivos se purificaron utilizando el método de punta de hifa siguiendo la metodología de Ortiz-García (1996). La identificación a nivel de género se apoyó a las claves de Barnett y Hunter (1972) para *Fusarium* y Erwin y Ribeiro (1996) para *Phytophthora*.

Pruebas de patogenicidad en plantas de chile habanero. La prueba de patogenicidad se realizó con cada microorganismo aislados de plantas marchitas de chile habanero de 60 días de edad, *Phytophthora* CH132; *Fusarium* CH2, CH3, CH7, CH11 y CH16, además, se empleó la cepa de *P. capsici*

60-day old habanero pepper plants, *Phytophthora* CH132; *Fusarium* CH2, CH3, CH7, CH11 and CH16. Additionally, we used the *P. capsici* strain CPV302, from national collections. In this way, a pair of disks, 0.5 cm in diameter from young cultures, were stuck to the bottom of the base of the stem to infect it by mycelial contact, then incubated in a wet chamber. Daily supervision helped register the morphological changes in the 35 habanero plants used in this test with the seven isolations (five plants per isolation) for a period of 16 days, along with five non-inoculated plants taken as a control.

Pathogenicity tests on cocoa fruits. Using strains CH132 (*Phytophthora* isolated from a habanero pepper plant), PC161.2, PC219 (*P. capsici* isolated

CPV302 de colecciones nacionales. Así, un par de discos de 0.5 cm de diámetro, de colonias jóvenes, se colocaron adherido a la base del tallo para infectarlo por contacto micelial e incubadas en cámara húmeda. La supervisión diaria permitió registrar los cambios morfológicos en las 35 plantas de chile habanero empleadas en esta prueba con los siete aislamientos (cinco plantas por aislamiento) por un periodo de 16 días; además, de cinco plantas no inoculadas tomadas como testigo.

Prueba de patogenicidad sobre mazorca de cacao. Con las cepas CH132 (*Phytophthora* aislada de chile habanero), PC161.2, PC219 (*P. capsici* aisladas de chile empleadas como referencia) y CPM04 (de *Phytophthora* aisladas de cacao de Tabasco como testigos positivos), se realizó la prueba de patogenicidad sobre mazorcas de cacao. Para esta prueba se emplearon mazorcas, en etapa de madurez fisiológica de cacao del ecotipo Guayaquil. Éstas, después de lavadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por un minuto y, después lavadas en tres recipientes con agua destilada estéril, fueron introducidas en una caja plástica igualmente esterilizada, con una tela esterilizada y húmeda en el fondo para aclimatarlas por 12 horas. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, fueron tomados y depositados sobre la epidermis de las mazorcas (sin heridas y en línea recta) cuatro discos de 0.5 mm de diámetro de la zona de crecimiento de las colonias de *Phytophthora*, con cinco días de crecimiento. Las cajas se taparon e incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad durante siete días en una incubadora Prendo®.

Identificación morfológica. La formación de esporangios se indujo de acuerdo con Pérez-Acevedo *et al.* (2017). El aislamiento obtenido del chile habanero (CH132) se confrontó con los tipos de compatibilidad conocidos de A1 (PVM-161.2) y

from chili pepper plants used as a reference) and CPM04 (from *Phytophthora* isolated from Tabasco cocoa as positive controls), a pathogenicity test was carried out on cocoa fruits. The fruits used for these tests were in a stage of physiological maturity, and of the Guayaquil ecotype. After washing by immersion in 1% sodium hypochlorite for one minute, followed by another wash in three containers filled with sterile distilled water, the fruits were placed in an also sterilized plastic box, with a piece of cloth in the bottom to acclimatize them for 12 hours. Next, in a laminar flow cabinet, four disks, each one of which was 0.5 mm in diameter, were taken from the growth area of the *Phytophthora* cultures after five days of growth and placed on the epidermis of the fruits (without lesions and in a straight line). The boxes were covered and incubated at 25 ± 1 °C in the dark for seven days in a Prendo® incubator.

Morphological identification. The formation of sporangia was induced following Pérez-Acevedo *et al.* (2017). The isolation obtained from the habanero chili pepper (CH132) was confronted with the known types of compatibility for A1 (PVM-161.2) and A2 (CPV-219) of *P. capsici*. In a dish with a Green Bean-Agar medium culture, a 5 mm disk of isolation CH132 was placed 1 cm away from the reference isolation (A1 or A2). The dishes were kept at 25 ± 1 °C in a Prendo® incubator in the dark for 2 weeks and examined under the Cole Parmer® compound microscope (Fernández-Pavía *et al.*, 2004). The morphological characteristics were compared with those obtained by Stamps *et al.* (1990).

Molecular identification. In order to extract the DNA, the protocol by Leslie and Summerell (2006) was followed, with modifications. The region of the COI (cytochrome oxidase c subunit 1) mitochondrial

A2 (CPV-219) de *P. capsici*. En una caja con medio de cultivo Ejote-Agar, se colocó un disco de 5 mm del aislamiento CH132 a 1 cm de distancia del aislamiento de referencia (A1 o A2). Las cajas se mantuvieron a 25 ± 1 °C en una incubadora Prendo® en oscuridad por dos semanas y se examinaron al microscopio compuesto Cole Parmer® (Fernández-Pavía *et al.*, 2004). Las características morfológicas se compararon con Stamps *et al.* (1990).

Identificación molecular. Para extraer el ADN se siguió el protocolo de Leslie y Summerell (2006) con modificaciones. La región del gen mitocondrial COI (citocromo oxidasa c subunidad 1) fue amplificada con los iniciadores COIF-1 (5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3') y COIR-1 (5'-RRHWACKTGACTDATRATACCAAA-3') que amplifican 727 pb. Las amplificaciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf MasterCycler® Gradient. Las condiciones para la amplificación fueron: 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min (Robideau *et al.*, 2011). Los fragmentos de ADN fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos de PCR fueron secuenciados en Macrogen (Seúl, República de Corea). Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron usando el programa PreGap y Gap. Se creó una secuencia consenso, y se alinearon empleando el software ClustalX2. La identidad de las secuencias primero se realizó por medio del programa web Blast® blastn suite en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para confirmar la identidad de los aislados con secuencias ex-tipo, se llevó a cabo un análisis genético en MEGA® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) aplicando el método Máxima Verosimilitud con 100 repeticiones bootstrap. Se utilizó el modelo de Tamura-Nei para

gene was amplified with primers COIF-1 (5' – TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC–3') and COIR-1 (5'–RRHWACKTGACTDATRATACCAAA–3'), which amplified 727 pb. The PCR amplifications were carried out in an Eppendorf MasterCycler® Gradient thermocycler. The conditions for the amplification were: 2 min at 95 °C, followed by 35 one-minute cycles at 95 °C, 1 min at 55 °C and a final extension step at 72 °C for 10 min (Robideau *et al.*, 2011). The DNA fragments were purified using the Wizard® SV Gel kit and the PCR Clean-Up System-Promega, following the manufacturer's instructions. The PCR products were sequenced in Macrogen (Seoul, South Korea). The sequences obtained were assembled and edited using the program PreGap y Gap. A consensus sequence was created, and they were aligned using the software ClustalX2. The identity of the sequences was first carried out using the web program Blast® blastn suite on NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To confirm the identity of the isolations with ex-type sequences, a genetic analysis was carried out using MEGA® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), applying the Maximum Likelihood method with 100 bootstrap repetitions. The model by Tamura-Nei was used to infer the evolution (Tamura and Nei, 1993), and *Pythium oopapillum* was used as an external group.

Isolations obtained. The communities of hydrological subzone 1, from which diseased habanero pepper plants were collected, were C-34, in Huimanguillo (S16), Rio Seco (S2) in Cárdenas, Miahuatlán (S11), Cumuapa (S3) and San Pedro (S7) in Cunduacán, where the isolations of *Fusarium* (CH2, CH3, CH7, CH11 and CH16) were found to be related. The collected plants displayed slight wilting in the foliage without necrosis in the leaves or stem. In the three sampling

inferir la evolución (Tamura y Nei, 1993), se utilizó a *Pythium ooparium* como grupo externo.

Aislados obtenidos. Las comunidades de la subzona hidrológica 1, de donde se colectaron plantas de chile habanero enfermas fueron C-34, en Huimanguillo (S16), Rio Seco (S2) en Cárdenas, Miahuatlán (S11), Cumuapa (S3) y San Pedro (S7) en Cunduacán, donde se encontraron asociados los aislados de *Fusarium* (CH2, CH3, CH7, CH11 y CH16). Las plantas colectadas mostraron marchitamiento ligero en el follaje sin necrosamiento foliar o necrosis de tallo. En los tres sitios de muestreos del municipio de Centro, se colectaron plantas con necrosis foliar y daños tal como señala Pérez-Moreno *et al.* (2005), y donde se obtuvo el aislado CH132 de *Phytophthora*, en Acachapa y Colmena (S13).

Pruebas de patogenicidad en plántulas de chile.

A los seis ddi (días después de la inoculación) con las cepas CH132 se registraron puntos necróticos en la base del tallo y marchitez del follaje (Figura 2 A). A los 16 días se observó una necrosis del tallo y hojas secas (Figura 2 B).

De las plantas marchitas y necrosis en el tallo, se re-aisló *Phytophthora* confirmando los postulados de Koch, señalando a CH132 como patógena y causante la marchitez del chile. Los daños de marchitez y necrosamiento en la base del tallo causada por la cepa CH132 (*Phytophthora*) fue similar al causado por la cepa CPV302 de *P. capsici*. Las plantas testigo y las plantas inoculadas con cepas e de *Fusarium* (CH2, CH3, CH7, CH11 y CH16) no mostraron síntomas.

Prueba de Patogenicidad en mazorcas de Cacao.

Las mazorcas de cacao inoculadas con los discos de micelio de las colonias aisladas de cacao (CPMO 04) a los cuatro días de incubación, dos de los cuatro

sites of the municipal area of Centro, plants with foliar necrosis were gathered, along with plants with other damages as indicated by Pérez-Moreno *et al.* (2005), as well as where the *Phytophthora* isolation CH132 was obtained, in Acachapa and Colmena (S13).

Pathogenicity tests in chili pepper seedlings. Six dai (days after inoculation) with the strains CH132, necrotic spots were registered on the base of the stem, along with wilting of the foliage (Figure 2 A). Sixteen days later, necrosis was found on the stem and dry leaves (Figure 2 B).

From the wilted plants and with necrosis on the stem, *Phytophthora* was reisolated, confirming Koch's postulates, indicating CH132 as a pathogen and the cause of the wilting of the plant. The damages caused by wilting and necrosis on the base of the stem caused by strain CH132 (*Phytophthora*) was similar to the one caused by *P. capsici* strain CPV302. The control plants and the plants inoculated with e *Fusarium* strains (CH2, CH3, CH7, CH11 and CH16) showed no symptoms.

Pathogenicity tests in cocoa fruits. In the cocoa fruits inoculated with the mycelium discs of the isolated cocoa cultures (CPMO 04) four days after incubation, two of the four points of inoculation displayed the typical symptoms of the black spot (Ortiz-García, 1996). However, the *Phytophthora* strains isolated from chili peppers from Tabasco and the strains used as a reference displayed no damage on the surface.

Morphological characterization. Isolation CH132 displayed cenocytic mycelium, caducous sporangia, with a predominance of ovoid and obpyriform. The average length and width for 50 sporangia was 73.72 μm and 37.3 μm respectively; and a length/width ratio of 2.02. Papilla 4.91 μm



Figura 2. Prueba de patogenicidad de cepas de *Phytophthora*: Testigo, CPV302 y CH132 (de izquierda a derecha) en plántulas de chile habanero. Síntomas a los nueve ddi (A). Síntomas a los 16 ddi (B).

Figure 2. Pathogenicity tests of *Phytophthora* strains: Control, CPV302 and CH132 (from left to right) in habanero chili pepper seedlings. Symptoms nine dai (A). Symptoms 16 dai (B).

puntos de inoculación mostraron los síntomas típicos de ataque de la mancha negra (Ortiz-García, 1996). Sin embargo, las cepas de *Phytophthora* aisladas de chile de Tabasco y las cepas empleadas como referencia, no presentaron daño sobre la corteza.

Caracterización morfológica. El asilamiento CH132 presentó micelio cenocítico, esporangios caducos, con predominio de formas obpiriforme y limoniforme. El promedio de 50 esporangios fue 73.72 μm de largo y 37.3 μm de ancho; y relación largo/ancho de 2.02. Papila de 4.91 μm y pedicelos largos de 189.8 μm , y sin clamidosporas. La oospora es esférica, plerótica, con un promedio de 25.04 μm de largo, 24.57 μm ancho y 3.07 μm de grosor (Figura 3). Anteridio anfigino, con un promedio de 12.6 μm de largo y 11.5 μm ancho. El oogonio mostró un promedio de 29.5 μm de largo y 27.8 μm de ancho. Dimensiones son similares a lo reportado para *P. capsici* por Stamps *et al.* (1990). El tipo de compatibilidad del aislamiento CH132 es heterotálica, tipo A2.

long and pedicels 189.8 μm long, and without chlamydospores. The oospore is spherical, plerotic, with an average length of 25.04 μm , 24.57 μm wide and 3.07 μm thick (Figure 3). The amphigynous antheridium, with an average length of 12.6 μm and 11.5 μm wide. The oogonium displayed an average length of 29.5 μm and a width of 27.8 μm . These dimensions are similar to those reported for *P. capsici* by Stamps *et al.* (1990). The type of compatibility of isolation CH132 is heterothallic, type A2.

Molecular characterization. The DNA amplification of isolation CH132 by PCR with oligonucleotides COIF-1 and COIR-1 created a 727 pb PCR product. The sizes of the PCR products are similar to those reported by Choi *et al.* (2015) with the use of COI. The BLAST analysis helped determine that isolation CH132 has a similarity of 100% with the species of *P. capsici* (Accession numbers AY129166, MH136864, MH013474, MH013475 and HQ261267). This was confirmed with the phylogenetic analysis under the criterion



Figura 3. Características morfológicas del aislamiento CH132. A: Esporangios papilados ($\geq 3.5 \mu\text{m}$) de forma limoniforme y obpiriforme y con pedicelo largo ($> 20 \mu\text{m}$). B: Oospora esférica y plerótica, pared del oogonio lisa y anteridio anfigino. Barras $20 \mu\text{m}$.

Figure 3. Morphological characteristics of isolation CH132. A: Papillated sporangia ($\geq 3.5 \mu\text{m}$), ovoid and obpyriform with a long pedicel ($> 20 \mu\text{m}$). B: Spherical and plerotic oospore, smooth oogonium wall and amphigynous antheridium. Bars $20 \mu\text{m}$.

Caracterización molecular. La amplificación del ADN del aislamiento CH132, mediante PCR con los oligonucleótidos COIF-1 y COIR-1 originó un producto de PCR de 727 pb. El tamaño de los productos de PCR son similares a lo reportado por Choi *et al.* (2015) con el uso de COI. El análisis BLAST permitió determinar que el aislamiento CH132 tiene un 100% de similitud con las especies de *P. capsici* (No. de accesoión AY129166, MH136864, MH013474, MH013475 y HQ261267). Esto se confirmó con el análisis filogenético bajo el criterio de máxima verosimilitud, donde se observa la similitud del aislado CH132 con dos de *P. capsici* aislados *Capsicum annuum* (Figura 4).

of maximum likelihood, which shows the similarity of isolation CH132 with two *P. capsici* of *Capsicum annuum* isolations (Figure 4).

The detection of the strain of *P. capsici* represents a warning, because it is a soil inhabitant, where it can survive for several years, as well as the diversity of plants it attacks (Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Erwin and Ribeiro, 1996). Also, the wide dispersion it may have with the use of infected seeds (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002). The low incidence of wilted plants in the sampling sites could have been due to 100% of the chili pepper plantations established with the grafting of seedlings in a nursery, and which have been

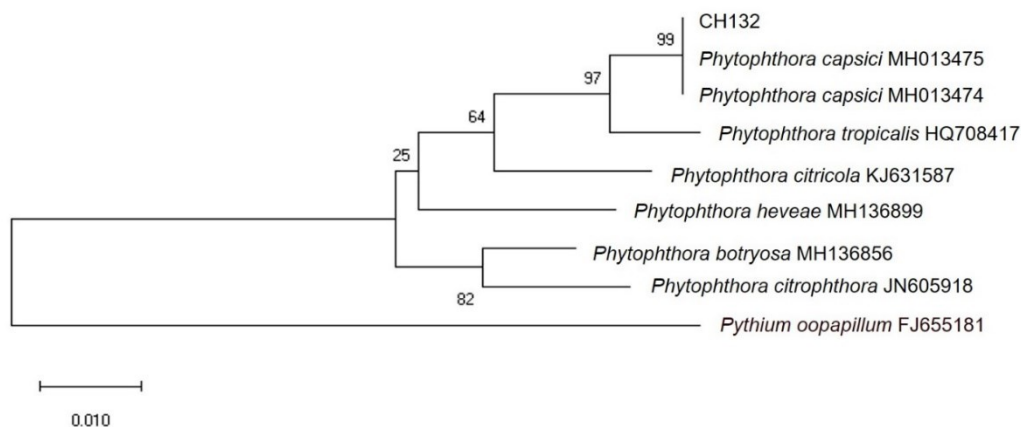


Figura 4. Análisis filogenético, de máxima verosimilitud de *Phytophthora capsici* con otras especies de *Phytophthora* del clado 2 con *Pythium oopapillum* grupoexterno. Los valores bootstrap (1000 repeticiones) de máxima verosimilitud en porcentajes se indican en los puntos de la rama. La barra de la escala indica 0.010 sustituciones por sitio por rama.

Figure 4. Maximum likelihood phylogenetic analysis of *Phytophthora capsici* with other *Phytophthora* species of clade 2 and *Pythium oopapillum* external group. The maximum bootstrap (1000 repetitions) values are indicated as percentages in the points of the branch. The bar of the scale indicates 0.010 substitutions per site per branch.

La detección de cepa de *P. capsici*, representa un hecho de alerta, debido a que es habitante del suelo, donde sobrevive por varios años; además de la diversidad de hortalizas que ataca (Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Erwin y Ribeiro, 1996). Asimismo, la amplia dispersión que se puede tener al emplear semillas infectadas (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002). La baja incidencia de plantas marchitas en los sitios de muestreo, pudo deberse a que el 100% de las plantaciones de chile se establecieron por trasplante de plántulas desarrolladas en vivero, y que son áreas abiertas al cultivo de chile uno o dos años atrás, por lo que se puede esperar que aún no sea alta la incidencia del patógeno en dichas zonas. La marchitez en plantas de chile no es exclusiva del ataque de *Phytophthora*, también puede deberse al ataque de otros patógenos como *Fusarium* o *Rhizoctonia* (Vásquez *et al.*, 2009; Anaya-López *et al.*, 2011; Lozano *et al.*, 2015; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Esto puede ser posible porque en el suelo habitan una gran diversidad de microorganismos como hongos, bacterias con la capacidad de

areas open to the planting of chili pepper plants for one or two year ago, therefore the incidence of the pathogen in the area can expected to be low. Wilting in chili pepper plants is not exclusive to the attack of *Phytophthora*, but can also be due to the attack of other pathogens, such as *Fusarium* or *Rhizoctonia* (Vásquez *et al.*, 2009; Anaya-López *et al.*, 2011; Lozano *et al.*, 2015; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). This may be possible because in the soil there are a large diversity of microorganisms such as fungi or bacteria with the ability to cause wilt in the chili pepper crop (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). There are non-pathogenic species of *Fusarium* or special proven ways to reduce the incidence and severity of diseases. It is important to understand that widening the chili pepper crop to the cocoa-producing areas favors a scenario of overpopulation of *Phytophthora* in cocoa and chili peppers which, in the medium term, could undergo severe losses due to the sexual reproduction between both species (Hurtado-González and Lamour, 2009), given the evidence that *P. capsici* is near the cocoa-

causar marchitez en el cultivo de chile (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Existen especies de *Fusarium* no patógenicas o formas especiales que han sido probadas para reducir la incidencia y severidad de enfermedades. Es importante comprender que la ampliación del cultivo de chile hacia las zonas cacaoteras, favorece un escenario con sobrepoblaciones de *Phytophthora* de cacao y chile, que a mediano plazo, podría lamentarse por la reproducción sexual entre ambas especies (Hurtado-González y Lamour, 2009) dada la evidencia que *P. capsici* está cerca de la zona cacaotera, con signo de compatibilidad A2 y que *P. capsici* Tsao y Alizadeh (1988), cuya proporción de compatibilidad A1 supera el 95% en la planicie y de 70% en las partes altas de Tabasco (Ortiz-García, 1996).

En conclusión, se identificó a *P. capsici* en plantas de chile habanero en zonas previamente cacaoteras (Acachapa y Colmena, Centro, Tabasco), donde el aislamiento de *Phytophthora* (CH132) fue patógeno en plantas de chile y no así de aislamientos de *Fusarium* en la prueba de patogenicidad. Por lo anterior, se sugiere que la producción de chile debe canalizarse en zonas no cacaoteras de Tabasco.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que le otorgaron para la realización de sus estudios de maestría.

LITERATURA CITADA

- Albañil JJA, Mariscal ALA, Martínez MTO, Anaya LJL, Cisneros LHC y Pérez RHA. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guajalajara, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp. 11:2191-2197. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263138103017>
- Anaya-López JL, González-Chavira MM, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R, Rodríguez-Martínez R, Guevara-González RG, Guevara-Olvera L, Montero-Tavera V y Torres-Pacheco I. 2011. Selección de genotipos de chile produciendo áreas, with signs of A2 compatibility and *P. capsici* Tsao and Alizadeh (1988), proportion of A1 surpasses 95% in the plains and 70% in the highlands of Tabasco (Ortiz-García, 1996).
- In conclusion, *P. capsici* was identified in habanero pepper plants in previously cocoa-producing areas (Acachapa and Colmena, Centro, Tabasco), where the isolation of *Phytophthora* (CH132) was pathogenic in chili pepper plants and was not the case for *Fusarium* isolations in the pathogenicity test. Due to this, the chili pepper production is suggested to be channeled to areas other than the cocoa-producing areas of Tabasco.
- ACKNOWLEDGEMENTS**
- The main author would like to thank the National Science and Technology Council (CONACYT) for the scholarship granted to complete his Master's.
- ~~~~~ End of the English version ~~~~~
- resistentes al complejo patógeno de la marchitez. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(3): 373-383. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263119714006>
- Barnett HL and Hunter BB. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess publishing company. Minneapolis, Minnesota, USA. 273 p.
- Choi Y, Beakes G, Glockling S, Kruse J, Nam B, Nigrelli L, Ploch S, Shin H, Shivas RG, Telle S, Voglmayr H and Thines M. 2015. Towards a universal barcode of oomycetes – a comparison of the cox1 and cox2 loci. Molecular Ecology Resources 15(6):1275–1288. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12398>
- Dandurand LM and Menge JA. 1992. Influence of *Fusarium solani* on citrus root rot caused by *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora*. Plant and Soil 144:13-21. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00018840.pdf>
- Donahoo RS and Lamour KH. 2008. Interspecific hybridization and apomixis between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. Mycology 100: 911-920.
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562p.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. 2017. Countries by commodity. http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_imports (consulta, junio 2019).

- Fernández-Pavía SP, Biles CL, Waugh ME, Onsurez-Waugh K, Rodríguez-Alvarado G and Liddell CM. 2004. Characterization of southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 22:82-89. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222111>
- Hurtado-González OP y Lamour KH. 2009. Evidence for inbreeding and apomixis in close crosses of *Phytophthora*. Plant pathology 58(4): 715-722. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02059.x>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Blackwell Publishing. Iowa USA 388p.
- López-López R, Inzunza-Ibarra MA, Fierro-Álvarez A y Palma-López DJ. 2018. Fechas de trasplante y productividad del chile habanero con riego por goteo. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9(1): 51-64. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i1.847>
- Lozano AN, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta ME, Aguilar RVH y Ayala EV. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en la Vega de Metztlán, Hidalgo, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33(1): 31-53. <http://redalyc.org/articulo.oa?id=61240687003>
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y and Ivors K. 2012. Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. Plant Disease 96(8): 1080-1103. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- Montes-Belmont R y De los Santos L. 1989. Especies de *Phytophthora* aisladas de cacao en México y su distribución geográfica. Turrialba 39(4): 473-476.
- Morales-Valenzuela G, Redondo-Juárez E, Covarrubias-Prieto J y Cárdenas-Soriano E. 2002. Detección y localización de *Phytophthora capsici* Leo. en semilla de chile. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1): 94-97.
- Ortiz-García CF. 1996. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). These Doctorat, (Science) Université Paul Sabatier de Toulouse, France. 85p.
- Pérez-Acevedo CE, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C, Enríquez del V R y Villegas-Aparicio Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(2): 281-293. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.50>
- Pérez-Moreno L, Casillas-Barajas AS y Ramírez-Malagón R. 2005. El cultivo del chile y su importancia económica en el norte del estado de Guanajuato, México. Universidad de Guanajuato. ICA. Guanajuato. México. 109pp.
- Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJ, Ristaino JB and Lévesque CA. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources 11(6): 1002-1011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- SIAP, Sistema de Información Agrícola y Pecuaria. 2015. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (consulta, junio 2019).
- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 27(2): 134-147. <http://redalyc.org/articulo.oa?id=61212195006>
- Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ and Hall GS. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycology Papers 162:1-28.
- Tamura K and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10(3): 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tsao PH and Alizadeh A. 1988. Recent advances in the taxonomy and nomenclature of the So-Called "*Phytophthora palmivora*" MF4 occurring on cocoa and other tropical crops. Santo Domingo, Dominican Republic. 441-445pp.
- Vásquez LA, Tlapal BB, Yáñez MMJ, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. Revista Fito-tecnia Mexicana 32(2): 127-134. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61011222007>