

Identificación de fuentes de resistencia a pudriciones de la raíz en germoplasma de chile serrano (*Capsicum annuum* L.)*

Identification of sources of resistance to root rots in germplasm of serrano pepper (*Capsicum annuum* L.)

Reinaldo Méndez Aguilar^{1§}, Raúl Rodríguez Guerra², Moisés Ramírez Meraz¹, María Genoveva Álvarez Ojeda³, Enrique Vázquez García¹, Arcos Cavazos Gerardo¹, Valeriano Tenorio Pérez⁴, Sanjuana Hernández Delgado⁵ y Netzahualcóyotl Mayek Pérez⁵

¹Campo Experimental Las Huastecas-INIFAP. Carretera Tampico-Mante. 89601, km 55. Villa Cuauhtémoc, Tamaulipas, México. (ramirez.moises@inifap.gob.mx; vazquez.enrique@inifap.gob.mx; arcos.gerardo@inifap.gob.mx). ²Campo Experimental General Terán-INIFAP. Carretera Montemorelos-China. 67400, km 31. General Terán, Nuevo León, México. (rodriguez.raul@inifap.gob.mx). ³Campo Experimental Río Bravo-INIFAP. Carretera Matamoros-Reynosa. 88900, km 61. Río Bravo, Tamaulipas, México. (alvarez.genoveva@inifap.gob.mx). ⁴Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Lindero Tametate s/n, Col. La Morita. 92116. Tantoyuca, Veracruz, México. (vale_alma4@hotmail.com). ⁵Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro esq. Elías Piña s/n, Col. Narciso Mendoza. 88710. Reynosa, Tamaulipas, México. (shernand@ipn.mx; nmayek@ipn.mx). §Autor para correspondencia: mendez.reinaldo@inifap.gob.mx.

Resumen

En México las pérdidas en la producción de chile (*Capsicum* spp.) ocasionadas por infección con *Phytophthora capsici* Leo; han llegado a ser de hasta 100% en áreas específicas del Bajío y Puebla, por lo que se ha planteado enfrentar el problema fitosanitario mediante la búsqueda de resistencia genética en accesiones de chile serrano obtenidas a partir de colectas en diferentes regiones del país. En el presente trabajo de investigación se utilizó el marcador SCAR OpD04.717 para identificar fuentes de resistencia a dicho patógeno a nivel molecular, se consideraron las accesiones con resistencia a *P. capsici* cuando amplificaron una banda de 717 pb. Así también se realizaron pruebas de reacción a *P. capsici* bajo condiciones *in vitro*, con la cepa PCT-17 previamente aislada, y se obtuvo el porcentaje de supervivencia de 142 accesiones de chile más los dos testigos (SCM334, resistente y MIRASOL, susceptible al hongo). La accesión que mostró mayor resistencia a la cepa fue BGS41 en comparación con SCM334. Únicamente se identificaron accesiones de chile serrano con resistencia a *P. capsici* mediante pruebas de reacción *in vitro*. La no identificación de fuentes de resistencia al hongo a nivel

Abstract

In Mexico production losses in pepper (*Capsicum* spp.) caused by infection of *Phytophthora capsici* Leo, has reached up to 100% in specific areas from the Bajío and Puebla, so it has been lay out to face the phytosanitary problem through the search of genetic resistance in serrano pepper accessions obtained from collections in different regions. In the present study the SCAR marker OpD04.717 was used to identify sources of resistance to the pathogen at molecular level, the accessions were considered resistant to *P. capsici* when amplified at band of 717 bp. Also reaction tests to *P. capsici* under *in vitro* conditions with strain PCT-17 previously isolated were carried out and the survival rate from 142 pepper accessions plus two checks (SCM334, resistant and MIRASOL susceptible to fungus) was obtained. The accession that showed greater resistance to strain was BGS41 compared to SCM334. Serrano pepper accessions with resistance to *P. capsici* were identified by *in vitro* test reactions. Not being able to identify sources of resistance to the fungus at molecular level in serrano pepper accessions could be due to the presence of an allele marker associated with resistance locus in a given accession / population does

* Recibido: marzo de 2015
Aceptado: julio de 2015

molecular en accesiones de chile serrano se pudo deber a que la presencia de un alelo marcador asociado con un locus de resistencia en una accesión/población determinada no implica necesariamente la misma asociación en diferentes accesiones. Se identificaron accesiones de chile serrano con utilidad potencial como nuevas fuentes de resistencia a pudriciones de la raíz (*P. capsici*) para programas de mejoramiento genético tradicional pero no para selección asistida por marcadores (MAS) mediante OpD04.717.

Palabras clave: *Phytophthora capsici* Leo., accesiones, marcador SCAR OpD04.717.

Introducción

El chile (*Capsicum* spp.) es una de las hortalizas más importantes alrededor del mundo. La pungencia y el color son los atributos más importantes de este cultivo utilizado ampliamente en los productos alimenticios y en diversas aplicaciones farmacológicas (Kumar *et al.*, 2011). El género *Capsicum* incluye 30 especies, cinco de las cuales son domesticadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. baccatum*. De estas, *C. annuum* es la más comúnmente cultivada a nivel mundial, seguido por *C. frutescens* (Bosland y Votava, 2003; Wang y Bosland, 2006). En México la superficie sembrada de chile es de 136 053.46 ha con un rendimiento promedio de 17.3 t ha⁻¹ (SIAP, 2013).

Las enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus son el mayor problema en la producción del chile (Sandoval, 1993). Dentro de las enfermedades causadas por hongos se encuentra la pudrición de la raíz, también conocida como marchitez o secadera. Esta enfermedad se caracteriza por síntomas como marchitez de la planta, clorosis, defoliación, pérdida de estructuras reproductivas, necrosis de raíces, entre otras. Ha sido asociada a un complejo de fitopatógenos entre los cuales destaca el Oomycete *Phytophthora capsici* (Velásquez y Medina, 2003). Esta enfermedad ha sido reportada en todos los estados productores de nuestro país (Guijón y González, 2001). Las pérdidas ocasionadas por *P. capsici* a nivel nacional oscilan entre un 10 y un 60%, mientras que en áreas específicas del Bajío y Puebla pueden alcanzar el 100% (Pérez *et al.*, 2003).

El método tradicional para el control de enfermedades consiste en frecuentes aplicaciones de agroquímicos; sin embargo, la resistencia genética es el método más

not necessarily imply the same association in different accessions. Serrano pepper accessions with potential use as new sources of resistance to root rot (*P. capsici*) were identified for traditional breeding programs but not for marker-assisted selection (MAS) through OpD04.717.

Keywords: *Phytophthora capsici* Leo., accessions, SCAR marker OpD04.717.

Introduction

Pepper (*Capsicum* spp.) is one of the most important vegetable worldwide. Pungency and color are the most important attributes of this crop widely used in foodstuffs and in different pharmacological applications (Kumar *et al.*, 2011). *Capsicum* genus includes 30 species, of which five are domesticated: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* and *C. baccatum*. Of these, *C. annuum* is the most grown worldwide, followed by *C. frutescens* (Bosland and Votava, 2003; Wang and Bosland, 2006). In Mexico pepper acreage is 136, 053.46 ha with an average yield of 17.3 t ha⁻¹ (SIAP, 2013).

The diseases caused by fungi, bacteria and viruses are a major problem in the production of pepper (Sandoval, 1993). Among the diseases caused by fungal are root rot, which is also known as blight or damping off. This disease is characterized by symptoms such as wilting, chlorosis, defoliation, loss of reproductive structures, root necrosis, among others. It has been associated with a complex of pathogens among which highlights the Oomycete *Phytophthora capsici* (Velasquez and Medina, 2003). This disease has been reported in all producing states of our country (Gihon and Gonzalez, 2001). Losses caused by *P. capsici* nationwide range between 10 and 60%, while for specific areas from the Bajío and Puebla can reach 100% (Perez *et al.*, 2003).

The traditional method of disease control is the application of agrochemicals; however, genetic resistance is the most desirable method (Kim and Hartmann, 1985). In our country have been found 19 accessions of native pepper from the state of Morelos resistant to *P. capsici* that can be used to develop varieties and hybrids resistant to this pathogen (Gil-Ortega, 1991); however there are a great number of serrano pepper accessions that have not been characterized for these purpose and may be an important source of resistance to this disease.

deseable (Kim y Hartmann, 1985). En nuestro país se han descubierto 19 accesiones de chile criollo originarios del estado de Morelos resistentes a *P. capsici* que pueden ser utilizados para obtener variedades o híbridos resistentes a este patógeno (Gil-Ortega, 1991); sin embargo existe un gran número de accesiones de chile tipo serrano que no han sido caracterizadas para estos fines y que pueden ser fuente importante de resistencia a esta enfermedad. Las pruebas de reacción *in vitro* a fitopatógenos ahorran tiempo, costos y espacio en la caracterización de distintos y numerosos genotipos de chile respecto al grado de susceptibilidad o resistencia a hongos, bacterias, entre otros.

Otra herramienta que se está utilizando es la selección asistida por marcadores moleculares (MAS), la cual está incrementando su importancia en los programas modernos de mejoramiento genético. La selección indirecta utiliza métodos de genotipificado permitiendo la detección de los alelos y genotipos deseables en etapas tempranas de las plantas y puede reducir o eliminar la necesidad de ciclos de evaluación fenotípica (Dubcovsky, 2004), MAS es aún más valiosa cuando los caracteres muestran recesividad, herencia poligénica o son difíciles o imposibles de seleccionar directamente (Yeam *et al.*, 2005). El objetivo de este estudio fue identificar fuentes de resistencia a pudriciones de la raíz (*P. capsici*) en accesiones de chile serrano que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético tradicional o mediante selección asistida por marcadores moleculares de ADN.

Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se realizó de 2012 a 2013, en las instalaciones del Campo Experimental Las Huastecas (CEHUAS), el cual forma parte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se encuentra ubicado en las coordenadas: 22° 33' 59" latitud norte y 98° 09' 49" longitud oeste dentro de la región Huasteca en el oriente de la República Mexicana (Morales, 2012).

Germoplasma. En esta investigación se incluyeron 142 accesiones de chile serrano pertenecientes al Banco de Germoplasma de Chile del CEHUAS-INIFAP; las cuales son procedentes de colectas de diferentes estados del país, y representan los grupos raciales Rojo, Amarillo, Café y Anaranjado. Así también, se incluyeron dos genotipos como testigo (SCM334, resistente y Mirasol, susceptible al hongo) (Cuadro 1).

The *in vitro* reaction tests to phytopathogens save time, costs and space in the characterization of different and numerous pepper genotypes regarding to the degree of susceptibility or resistance to fungi, bacteria, among others.

Another tool being used is molecular marker-assisted selection (MAS) its importance is increasing in modern breeding programs. Indirect selection uses genotyping methods allowing detection of alleles and desirable genotypes in early stages of the plant and can reduce or eliminate the need for phenotypic evaluation cycles (Dubcovsky, 2004); MAS is even more valuable when characters show recessivity, polygenic inheritance which are difficult or impossible to select directly (Yeam *et al.*, 2005). The aim of this study was to identify sources of resistance to root rot (*P. capsici*) in Serrano pepper accessions that can be used in traditional breeding programs or through marker assisted selection.

Materials and methods

This research was conducted in 2012-2013, on the premises of the Experimental Field Las Huastecas (CEHUAS), which is part of the National Institute of Livestock Agriculture and Forestry Research (INIFAP). It is located in the coordinates: 22° 33' 59" north latitude and 98° 09' 49" west longitude in the Huasteca region in eastern Mexico (Morales, 2012).

Germplasm. In this research, 142 serrano pepper accessions belonging to the Germplasm Bank of Pepper from CEHUAS-INIFAP were included; which are collections from different states, and represent the racial groups: Red, Yellow, Brown and Orange. Also, two genotypes as a check (SCM334 resistant and Mirasol susceptible to the fungus) (Table 1) were included.

Isolation of genomic DNA. Genomic DNA extraction was performed from 2012 to 2013 in the Experimental Field Las Huastecas-INIFAP with the commercial kit Genomic Wizard® (Promega®). For this purpose 80 mg of tissue from young leaves of 15 plants per accession were weighed, same that were macerated in a mortar adding liquid nitrogen (-196 °C) to form a fine powder. The powder was transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube containing 600 µL of lysis buffer and agitated on a vortex for 3 seconds. The mixture was incubated in a water bath at 65 °C for 15 min. Elapsed time added 3 mL of RNase and mixed by gentle inversion (five times).

Cuadro 1. Accesiones de chile serrano utilizadas para la identificación de fuentes de resistencia a *P. capsici*.
Table 1. Serrano pepper accessions used to identify sources of resistance to *P. capsici*.

Núm.	Nombre	Grupo Racial	No.	Nombre	Grupo Racial	No.	Nombre	Grupo Racial
1	BGS1	Amarillo	49	BGS50	Rojo	97	BGS112	Café
2	BGS2	Amarillo	50	BGS51	Rojo	98	BGS114	Café
3	BGS3	Amarillo	51	BGS52	Rojo	99	BGS116	Café
4	BGS4	Amarillo	52	BGS53	Rojo	100	BGS117	Café
5	BGS5	Amarillo	53	BGS54	Rojo	101	BGS118	Café
6	BGS6	Amarillo	54	BGS55	Rojo	102	BGS119	Café
7	BGS7	Amarillo	55	BGS56	Rojo	103	BGS120	Café
8	BGS8	Amarillo	56	BGS57	Amarillo	104	BGS121	Café
9	BGS9	Amarillo	57	BGS58	Amarillo	105	BGS122	Rojo
10	BGS10	Amarillo	58	BGS59	Amarillo	106	BGS123	Rojo
11	BGS11	Amarillo	59	BGS60	Amarillo	107	BGS124	Rojo
12	BGS12	Amarillo	60	BGS61	Amarillo	108	BGS125	Rojo
13	BGS13	Amarillo	61	BGS62	Amarillo	109	BGS126	Rojo
14	BGS14	Amarillo	62	BGS63	Rojo	110	BGS127	Rojo
15	BGS15	Amarillo	63	BGS64	Rojo	111	BGS128	Rojo
16	BGS16	Amarillo	64	BGS65	Rojo	112	BGS129	Rojo
17	BGS17	Amarillo	65	BGS66	Rojo	113	BGS131	Rojo
18	BGS18	Amarillo	66	BGS67	Rojo	114	BGS132	Rojo
19	BGS19	Amarillo	67	BGS68	Rojo	115	BGS133	Rojo
20	BGS20	Amarillo	68	BGS69	Rojo	116	BGS134	Rojo
21	BGS21	Amarillo	69	BGS70	Rojo	117	BGS135	Rojo
22	BGS22	Amarillo	70	BGS71	Rojo	118	BGS136	Rojo
23	BGS23	Amarillo	71	BGS72	Rojo	119	BGS137	Amarillo
24	BGS24	Amarillo	72	BGS73	Rojo	120	BGS138	Amarillo
25	BGS25	Amarillo	73	BGS77	Anaranjado	121	BGS139	Amarillo
26	BGS26	Rojo	74	BGS80	Anaranjado	122	BGS140	Amarillo
27	BGS27	Rojo	75	BGS81	Anaranjado	123	BGS141	Amarillo
28	BGS28	Rojo	76	BGS82	Anaranjado	124	BGS142	Amarillo
29	BGS29	Rojo	77	BGS83	Anaranjado	125	BGS143	Amarillo
30	BGS30	Rojo	78	BGS84	Anaranjado	126	BGS144	Amarillo
31	BGS31	Rojo	79	BGS85	Anaranjado	127	BGS145	Amarillo
32	BGS32	Rojo	80	BGS86	Anaranjado	128	BGS146	Café
33	BGS33	Rojo	81	BGS87	Anaranjado	129	BGS147	Café
34	BGS34	Rojo	82	BGS88	Anaranjado	130	BGS148	Rojo
35	BGS36	Rojo	83	BGS90	Anaranjado	131	BGS149	Rojo
36	BGS37	Rojo	84	BGS91	Rojo	132	BGS150	Amarillo
37	BGS38	Rojo	85	BGS92	Rojo	133	BGS151	Amarillo
38	BGS39	Rojo	86	BGS93	Rojo	134	BGS152	Amarillo
39	BGS40	Rojo	87	BGS94	Rojo	135	BGS153	Rojo
40	BGS41	Rojo	88	BGS95	Rojo	136	BGS154	Rojo
41	BGS42	Rojo	89	BGS96	Rojo	137	BGS155	Rojo
42	BGS43	Rojo	90	BGS97	Rojo	138	BGS156	Rojo
43	BGS44	Rojo	91	BGS98	Rojo	139	BGS157	Amarillo
44	BGS45	Rojo	92	BGS101	Rojo	140	BGS158	Amarillo
45	BGS46	Rojo	93	BGS102	Rojo	141	BGS159	Amarillo
46	BGS47	Rojo	94	BGS103	Rojo	142	BGS160	Rojo
47	BGS48	Rojo	95	BGS104	Rojo	143	SCM334*	
48	BGS49	Rojo	96	BGS110	Café	144	MIRASOL	

*SCM334= Serrano Criollo de Morelos 334.

Aislamiento del ADN genómico. La extracción de ADN genómico se realizó de 2012 a 2013 en el Campo Experimental Las Huastecas-INIFAP mediante el estuche comercial Wizard® Genomic (Promega®). Para ello se pesaron 80 mg de tejido de hojas jóvenes de 15 plantas de cada accesión mismas que se maceraron en un mortero con adición de nitrógeno líquido (-196 °C), hasta formar un polvo fino. El polvo se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL que contenía 600 µL de buffer de lisis y se agitó en Vortex por 3 s. La mezcla se incubó en baño maría a 65 °C por 15 min. Transcurrido el tiempo se agregó 3 µL de RNasa y se mezcló por inversión suave (cinco veces).

Las muestras se incubaron a 37 °C por 15 min y se enfriaron por 5 min a una temperatura de 17 °C. Posteriormente, se agregaron 200 µL de la solución de precipitación de proteínas y se agitaron en Vortex a alta velocidad por 20 s. Enseguida, se centrifugaron por 5 min a 13 000 rpm en una microcentrífuga y cuidadosamente se removió el sobrenadante que contenía el ADN y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, para precipitar el ADN. Inmediatamente se centrifugaron por 3 min a 13 000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con etanol al 70% y después se centrifugaron por 3 min a 13 000 rpm.

Finalmente, el ADN se re-suspendió en 80 µL de solución de rehidratación de DNA y se almacenaron a -20°C. Este proceso se realizó en 142 accesiones de chile serrano y los testigos. En 2013 en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional ubicado en Reynosa, Tamaulipas, se determinó las concentraciones de ADN genómico de las accesiones que se utilizaron en el presente estudio, se estimaron visualmente con tinción en geles de agarosa al 1%, con Sybr Green® con exposición a luz ultravioleta en un Fotodocumentador Gel Doc XR® marca Bio-Rad, mediante una comparación con un estándar de peso molecular con concentración conocida como fago λ digerido con la enzima de restricción Lambda DNA/HindIII Marker.

Análisis con el marcador SCAR. Se utilizó el marcador SCAR OpD04.717 asociado con la resistencia a pudriciones de la raíz (Quirin *et al.*, 2005), para determinar su presencia en el germoplasma de chile. El volumen de reacción fue de 20 µL, el cual contenía una mezcla de 150 ng µL⁻¹ de ADN; 2 µL (10 µM) de cada iniciador (sentido y anti-sentido); 2 µL de buffer de PCR; 2 µL (10mM) de dNTPs y 1 U de Taq DNA polimerasa. Las condiciones óptimas de PCR fueron: 2 min de desnaturalización a 94 °C; 32 ciclos de 30 s a 94 °C, 30s a 45 °C y 1 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C. Se trabajó en un termociclador T100™ marca Bio-Rad.

Samples were incubated at 37 °C for 15 min and cooled for 5 min at a temperature of 17 °C. Subsequently, 200 µL of protein precipitation solution were added and vortexed at high speed for 20 s. Then, centrifuged for 5 min at 13 000 rpm in a microcentrifuge and carefully removed the supernatant containing the DNA and placed in a 1.5 mL Eppendorf tube with 600 µL of isopropanol at room temperature for DNA to precipitate. Immediately centrifuged for 3 min at 13 000 rpm, the supernatant was removed, washed with 70% ethanol and then centrifuged for 3 min at 13 000 rpm.

Finally, the DNA was re-suspended in 80 µL of DNA rehydration solution and stored at -20 °C. This process was conducted for 142 serrano pepper accessions and checks. In 2013 at the Center for Genomic Biotechnology of the National Polytechnic Institute located in Reynosa, Tamaulipas, the concentrations of genomic DNA of the accessions that were used in this study was determined, estimated visually with stained agarose gel 1%, with SYBR Green® with exposure to ultraviolet light in a Gel Doc XR® Bio-Rad, through the comparison with a standard of known molecular weight known as phage λ digested with restriction enzyme Lambda DNA / HindIII Marker.

SCAR marker analysis. SCAR marker OpD04.717 associated with resistance to root rots was used (Quirin *et al.*, 2005), to determine its presence in the germplasm. The reaction volume was 20 µL, containing a mixture of 150 ng µL⁻¹ DNA; 2 µL (10 µM) of each primer (sense and antisense); 2 µL PCR buffer; 2 µL (10 mM) dNTPs and 1 U of Taq DNA polymerase. Optimal PCR conditions were: 2 min denaturation at 94 °C; 32 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 45 °C and 1 min at 72 °C and a final extension of 5 min at 72 °C. Worked on a T100™, Bio-Rad thermocycler.

The primer sequence is: (F) 5'-CCA TAA GGG TTG GTA AATTTACAAAG-3'/(R) 5'-TCGAGAGATAATTTCAGAT AGTATAATC-3'. The amplified fragments were separated on agarose gel 1% and visualized through stained gel with SYBR Green® with exposure to UV light on a BXT-F20.M (Uvitec Cambridge) transilluminator. Subsequently, the gels were photographed, and continued with the identification of the accessions with presence of the expected band 717 bp indicating resistance to *P. capsici*.

In vitro reaction to *P. capsici*. *In vitro* tests were performed in 2013 at the Laboratory of the Experimental Field General Teran (CEGET) from INIFAP, which is located in the municipality of General Teran, Nuevo Leon, Mexico. As

La secuencia de los iniciadores es: (F) 5'-CCA TAA GGG TTG GTAAATTTACAAAG-3'/(R) 5'-TCGAGAGATAAT TCA GAT AGT ATA ATC-3'. Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción del gel con Sybr Green® con exposición a luz UV en un transiluminador BXT-F20.M (Uvitec Cambridge). Posteriormente, los geles se fotografiaron, y se procedió con la identificación de accesiones de Chile con presencia de la banda de 717 pb esperada que indica la resistencia a *P. capsici*.

Reacción *in vitro* a *P. capsici*. Las pruebas *in vitro* se realizaron en 2013 en el Laboratorio del Campo Experimental General Terán (CEGET) del INIFAP, el cual se localiza en el municipio de General Terán, Nuevo León, México. Como fuente de inóculo se utilizó la cepa PCT-17 de *Phytophthora capsici*, la cual es altamente virulenta, y se ha utilizado en investigaciones previas (Hernández-González, 2007; Robles-Yerena *et al.*, 2010). El fitopatógeno se mantuvo por siete días en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) antes de utilizarse en las pruebas de patogenicidad. El experimento se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Robles-Yerena *et al.* (2010). Las semillas se trataron por tres minutos con hipoclorito de sodio al 1% y fueron lavadas con tres pasos de agua estéril. Las semillas se transfirieron a cajas Petri conteniendo agar agua al 2%, y se incubaron a 26 °C con ciclo diario de luz de 14 h. Se revisaron cada 24 h y por cuatro días para seleccionar semillas libres de crecimiento de cualquier microorganismo.

Al cuarto día se transfirieron grupos de tres a cinco semillas a nuevas cajas Petri y se incubaron por 24 días a 26 °C con ciclo diario de luz de 14 h. Las plántulas contenidas en las cajas Petri fueron inoculadas en el cuello a los 10 a 14 días con un fragmento de colonia de *P. capsici* de 0.3 cm² aproximadamente. Los tratamientos se evaluaron a los 16 días después de la inoculación registrando el número de plantas vivas y muertas, y obteniendo el porcentaje de supervivencia. Aquellas accesiones que mostraron igual o mayor porcentaje de supervivencia que el testigo SCM334 se consideraron resistentes a *P. capsici*.

Diseño experimental y análisis de los datos. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento; la unidad experimental fue de 5 plantas por repetición. Los datos de porcentaje de supervivencia al fitopatógeno se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS, 2007).

inoculum source PCT-17 strain of *Phytophthora capsici* was used, which is highly virulent, and has been used in previous studies (Hernandez-Gonzalez, 2007; Robles-Yerena *et al.*, 2010). The phytopathogen remained for seven days on PDA medium (Potato Dextrose Agar) before being used in pathogenicity tests. The experiment was conducted according to the methodology reported by Yerena Robles *et al.* (2010). Seeds were treated for three minutes with sodium hypochlorite at 1% and were washed three times with sterile water. The seeds were transferred to petri dishes containing 2% water agar and incubated at 26 °C with daily light cycles of 14 h. Monitored every 24 h for four days to select seeds free of any microorganism.

On the fourth day three to five groups of seeds were transferred to new petri dishes and incubated for 24 days at 26 °C with daily light cycles of 14 h. Seedlings contained in Petri dishes were inoculated on the neck at 10-14 days with a fragment of *P. capsici* colony of 0.3 cm² approximately. The treatments were evaluated at 16 days after inoculation recording the number of live and dead plants, obtaining the percentage of survival. Those accessions that showed equal or higher survival rate than SCM334 were considered resistant to *P. capsici*.

Experimental design and data analysis. The design was completely randomized with three replicates per treatment; the experimental unit was 5 plants per repetition. Survival rate data to the phytopathogen were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a mean comparison of Tukey ($p \leq 0.05$) using the statistical package SAS version 9.1 (SAS, 2007).

Results and discussion

SCAR OpD04.717 linked to QTL Phyto 5.2 which confers resistance to *P. capsici* (Quirin *et al.*, 2005) was found that the genotype SCM334 resistant to *P. capsici* (check), which is the pepper that has greater resistance this phytopathogen (Guerrero-Moreno and Laborde, 1980; Bosland and Lindsey, 1991; Reifschneider *et al.*, 1992; Quirin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). However, in the 142 accessions was not found, therefore it was not possible to discriminate between the accessions with possibility of having resistance or susceptibility (Figure 1). OpD04.717 marker has been reported as effective in discriminating between resistant and susceptible genotypes to *P. capsici*, which has allowed the identification of genetic materials *C. annuum* and *C. chinense*

Resultados y discusión

El SCAR OpD04.717 ligado el QTL Phyto 5.2 que confiere resistencia a *P. capsici* (Quirin *et al.*, 2005) se encontró en el genotipo resistente a *P. capsici* SCM334 (testigo resistente), el cual es el chile que mayor resistencia presenta a este fitopatógeno (Guerrero-Moreno y Laborde, 1980; Bosland y Lindsey, 1991; Reifschneider *et al.*, 1992; Quirin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Sin embargo, no se encontró en las 142 accesiones, por lo tanto no fue posible discriminar entre las accesiones con posibilidad de poseer resistencia o susceptibilidad (Figura 1). El marcador OpD04.717 ha sido reportado como eficaz en la discriminación entre genotipos resistentes y susceptibles a *P. capsici*, lo que ha permitido la identificación de materiales genéticos de *C. annuum* y *C. chinense* con resistencia al patógeno (Quirin *et al.*, 2005). McGregor y Waters (2011), utilizaron este marcador el cual amplificó la banda de 717 pb en las accesiones PI 439273, PI 566811, PI 640641 y en el genotipo SCM334, sin embargo no amplificó la banda en PI 593573, la cual es una accesión resistente estrechamente relacionada a SCM334.

Lo reportado en el trabajo antes mencionado y en el presente estudio se puede deber, a que la presencia de un alelo marcador asociado con un locus de resistencia en una accesión/población determinada, no implica necesariamente la misma asociación en diferentes accesiones (McGregor y Waters, 2011). Lo anterior puede explicar la ausencia del marcador OpD04.717 en las accesiones analizadas, a pesar de haber usado 15 plantas por accesión. Gill (2009), con una mezcla de hojas jóvenes de 10 plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por accesión le fue suficiente para identificar los marcadores SY20, SAS13, SAB3, SZ04 y BAC6, SAP6, SU91 asociados con la resistencia a antracnosis y tizón común, respectivamente.

Ernest y Kelly (2004) enfatizan la necesidad de realizar inoculaciones en condiciones controladas durante el mejoramiento para corroborar la evaluación genotípica. Vences-Contreras y Vázquez-García (2008) y Zhang *et al.* (2013), mediante pruebas de inoculación *in vitro* a roya blanca (*Puccinia horiana* Hennings) y a pudriciones de la raíz (*P. capsici*) pudieron discriminar entre genotipos de crisantemo y chile susceptibles y resistentes a los fitopatógenos, respectivamente; estos estudios indican la confiabilidad de la técnica.

resistente to the pathogen (Quirin *et al.*, 2005). McGregor and Waters (2011) used this marker which amplified band 717 bp in PI 439273, PI 566811, PI 640641 accessions and genotype SCM334, however it did not amplify the band in PI 593573, which is resistant and closely related to SCM334.

The results reported in the aforementioned work and in the present study may be due to the presence of allele marker associated with resistance locus in a given accession/population, it does not necessarily imply the same association in different accessions (McGregor and Waters, 2011). This may explain the absence of OpD04.717 marker in the analyzed accessions, despite using 15 plants per accession. Gill (2009), used a mixture of young leaves from 10 plants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) per accession and was enough to identify SY20, SAS13, SAB3, SZ04 and BAC6, SAP6, SU91 markers associated with resistance to anthracnose and common blight, respectively.

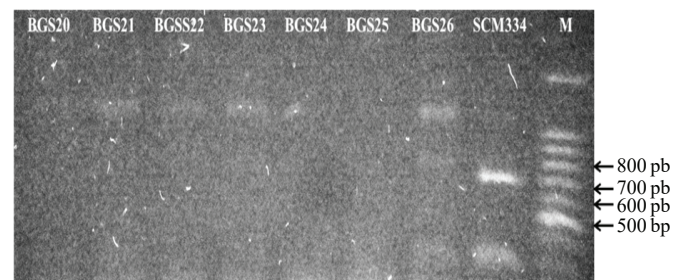


Figura 1. El marcador SCAR OpD04.717 amplificó únicamente la banda de 717 pb en el genotipo resistente al hongo SCM334. M= marcador de peso molecular; y pb= pares de bases.

Figure 1. SCAR marker OpD04.717 only amplified band 717 bp in the genotype resistant to the fungus SCM334. M= molecular weight marker; and bp= base pairs.

Ernest and Kelly (2004) emphasized the need to perform inoculations under controlled conditions during breeding to corroborate genotypic evaluation. Vences-Contreras and Vázquez-García (2008) and Zhang *et al.* (2013), through *in vitro* inoculation tests to white rust (*Puccinia horiana* Hennings) and root rot (*P. capsici*) were able to discriminate between genotypes of chrysanthemum and pepper susceptible and resistant to pathogens, respectively; these studies indicate the reliability of the technique.

In vitro tests reactions to *P. capsici* performed in serrano pepper accessions, 11 were identified with resistance to the pathogen, since statistics showed equal or greater fungus

En las pruebas realizadas en el presente estudio de reacción *in vitro* a *P. capsici* en accesiones de chile serrano; 11 se identificaron con resistencia al fitopatógeno debido a que mostraron igual o mayor supervivencia estadística al hongo ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo resistente SCM334, de estas accesiones la mayor frecuencia se encontró en el grupo racial Rojo (63.6%) y la menor frecuencia en el Anaranjado (9.1%). En los programas de mejoramiento genético el grupo racial que más se utiliza para la obtención de variedades/híbridos es el Rojo. La accesión BGS41 mostró mayor porcentaje de supervivencia (45.8%) a la cepa del hongo en comparación con SCM334 (testigo resistente); 97 accesiones presentaron la mayor mortandad la cual fue de 100% (Cuadro 2).

survival ($p \leq 0.05$) compared with check SCM334; of these accessions the highest frequency was found in the racial group Red (63.6%) and the lowest in Orange (9.1%). In breeding programs the racial group that is used to obtain varieties/hybrids is Red. The accession BGS41 showed higher survival rate (45.8%) to the strain of the fungus compared with SCM334 (resistant check); 97 accessions showed the highest mortality which was 100% (Table 2).

Mora and Vargas (1981) used the survival variable to identify pepper genotypes resistant to *P. capsici* under field conditions, from a total of 69 genotypes, identifying four with higher percentage of survival to the Oomycete:

Cuadro 2. Medias de la variable evaluada de pruebas de reacción *in vitro* a *P. capsici* en germoplasma de chile serrano.
Table 2. Means of variable assessed *in vitro* test reaction to *P. capsici* in germplasm of serrano pepper.

Acc	Sup (%)	Acc	Sup (%)	Acc	Sup (%)
BGS1	0.0 ^a f	BGS50	0.0 f	BGS112	0.0 f
BGS2	0.0 f	BGS51	13.0 c-f	BGS114	0.0 f
BGS3	0.0 f	BGS52	0.0 f	BGS116	0.0 f
BGS4	0.0 f	BGS53	14.0 c-f	BGS117	0.0 f
BGS5	0.0 f	BGS54	4.3 ef	BGS118	0.0 f
BGS6	0.0 f	BGS55*	23.1 a-f	BGS119	0.0 f
BGS7	0.0 f	BGS56	0.0 f	BGS120	3.3 ef
BGS8	10.8 c-f	BGS57	0.0 f	BGS121	0.0 f
BGS9	0.0 f	BGS58	0.0 f	BGS122	0.0 f
BGS10	0.0 f	BGS59	3.7 ef	BGS123	3.3 ef
BGS11	0.0 f	BGS60	0.0 f	BGS124	0.0 f
BGS12	0.0 f	BGS61	10.0 c-f	BGS125	0.0 f
BGS13	0.0 f	BGS62	9.1 d-f	BGS126	0.0 f
BGS14	0.0 f	BGS63	3.3 ef	BGS127	0.0 f
BGS15	0.0 f	BGS64	0.0 f	BGS128	0.0 f
BGS16	0.0 f	BGS65	10.0 c-f	BGS129	0.0 f
BGS17	0.0 f	BGS66*	25.0 e	BGS131	0.0 f
BGS18	10.8 c-f	BGS67	13.3 c-f	BGS132	0.0 f
BGS19	10.0 c-f	BGS68	12.0 c-f	BGS133	0.0 f
BGS20	4.8 ef	BGS69	13.0 c-f	BGS134	0.0 f
BGS21	10.0 c-f	BGS70	16.0 c-f	BGS135	0.0 f
BGS22*	19.1 b-f	BGS71	0.0 f	BGS136	0.0 f
BGS23	7.4 ef	BGS72	8.0 ef	BGS137	0.0 f
BGS24	4.3 ef	BGS73	0.0 f	BGS138	0.0 f
BGS25*	20.0 b-f	BGS77*	33.3 c	BGS139	0.0 f
BGS26*	20.0 b-f	BGS80	0.0 f	BGS140	0.0 f

*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$); Acc= accesión; Sup= supervivencia; * = accesiones de chile serrano identificadas con resistencia a *P. capsici*.

Cuadro 2. Medias de la variable evaluada de pruebas de reacción *in vitro* a *P. capsici* en germoplasma de chile serrano (Continuación).**Table 2. Means of variable assessed *in vitro* test reaction to *P. capsici* in germplasm of serrano pepper (Continuation).**

Acc	Sup (%)	Acc	Sup (%)	Acc	Sup (%)
BGS27*	22.0 b-f	BGS81	0.0 f	BGS141	0.0 f
BGS28	0.0 f	BGS82	3.3 ef	BGS142	0.0 f
BGS29	10.4 c-f	BGS83	0.0 f	BGS143	0.0 f
BGS30	12.0 c-f	BGS84	0.0 f	BGS144	0.0 f
BGS31*	40.5 b	BGS85	0.0 f	BGS145	0.0 f
BGS32	0.0 f	BGS86	0.0 f	BGS146	0.0 f
BGS33	0.0 f	BGS87	0.0 f	BGS147	0.0 f
BGS34	14.0 c-f	BGS88	0.0 f	BGS148	0.0 f
BGS36	3.4 ef	BGS90	3.3 ef	BGS149	0.0 f
BGS37	0.0 f	BGS91	6.7 ef	BGS150	0.0 f
BGS38	0.0 f	BGS92	0.0 f	BGS151	0.0 f
BGS39	4.0 ef	BGS93	0.0 f	BGS152	0.0 f
BGS40	0.0 f	BGS94	0.0 f	BGS153	0.0 f
BGS41*	45.8 a	BGS95	0.0 f	BGS154	0.0 f
BGS42*	32.0 d	BGS96	0.0 f	BGS155	0.0 f
BGS43	8.7 d-f	BGS97	0.0 f	BGS156	0.0 f
BGS44	12.0 c-f	BGS98	0.0 f	BGS157	0.0 f
BGS45	0.0 f	BGS101	0.0 f	BGS158	0.0 f
BGS46	0.0 f	BGS102	3.3 ef	BGS159	0.0 f
BGS47	0.0 f	BGS103	3.3 ef	BGS160	0.0 f
BGS48	0.0 f	BGS104	0.0 f	SCM334*	20.0 b-f
BGS49	0.0 f	BGS110*	23.3 a-f	MIRASOL	0.0 f

*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$); Acc= acesión; Sup= supervivencia; * = accesiones de chile serrano identificadas con resistencia a *P. capsici*.

Mora y Vargas (1981) utilizaron la variable supervivencia para la identificación de genotipos de chile con resistencia a *P. capsici* bajo condiciones de cielo abierto, de un total de 69 genotipos identificaron cuatro por presentar mayor porcentaje de supervivencia al Oomycete: Malayo, Tabasco, línea 56 de Jalapeño y línea 59 de malayo con 40, 53, 36 y 60%, respectivamente. La presión a la que se sometieron las 142 accesiones y los dos testigos en esta investigación fue elevada debido a que se utilizó una cepa altamente virulenta (Hernández-González, 2007; Robles-Yerena *et al.*, 2010), prueba de ello fue que SCM334 tuvo una supervivencia de 20% (Cuadro 2).

Pozo (1983), menciona a SCM334 con supervivencia a *P. capsici* de 100%. Esto se debe a que los patógenos pueden presentar variabilidad en agresividad y en las accesiones de chile puede haber reacción variable a la enfermedad (Kelly y Vallejo, 2004). Asimismo, las evaluaciones de la enfermedad en diferentes zonas agroecológicas y/o etapas específicas del desarrollo fisiológico de la planta modifican los resultados de reacción al patógeno (Marcia y João, 2001).

Malayo, Tabasco, Jalapeño line 56 and line 59 of Malayo with 40, 53, 36 and 60%, respectively. The pressure at which the 142 accessions and the two checks were subjected in this research was high, as a highly virulent strain was used (Hernandez-Gonzalez, 2007; Robles-Yerena *et al.*, 2010), proof of that was that SCM334 had a survival rate of 20% (Table 2).

Pozo (1983), mentions SCM334 with a survival rate of 100% to *P. capsici*. This is because the pathogen may show variability in aggressiveness and in the accessions could have shown a variable reaction to the disease (Kelly and Vallejo, 2004). Also, the assessments of the disease in different agro-ecological zones and on specific physiological stages of plant development modify the results of pathogen reaction (Marcia and João, 2001).

The 11 accessions identified as resistant in this study have potential use as new sources of resistance to the pathogen in breeding programs for the production of varieties/hybrids that help to decrease yield losses caused by *P.*

Las 11 accesiones identificadas como resistentes en el presente estudio tienen uso potencial como nuevas fuentes de resistencia al fitopatógeno en programas de mejoramiento genético para la obtención de variedades/híbridos que permitan disminuir las pérdidas de rendimiento causadas por *P. capsici*. A pesar que estos materiales genéticos no amplificaron el marcador SCAR OpD04.717, pueden ser utilizados para la búsqueda de otros marcadores asociados a genes que confieren resistencia al Oomycete como: CaRGA2, CABPR1, CABGLU, CAPO1, CASC1 (Silvar *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013), o a los QTLs Phyto.4.1, Phyto.5.1, Phyto.6.1, Phyto.11.1 y Phyto12.1, localizadas en los cromosomas 4, 5, 11 y 12, respectivamente (Thabuis *et al.*, 2003). Debido a que la resistencia a este fitopatógeno es poligénica (Pochard y Daubèze, 1980; Ogundiwin *et al.*, 2005; Minamiyama *et al.*, 2007), es difícil explicar la resistencia a la enfermedad mediante únicamente el marcador OpD04.717.

La selección asistida por marcadores moleculares (MAS) ha sido propuesta para facilitar el manejo de caracteres complejos como la resistencia a *P. capsici* en combinación con análisis fenotípicos como una vía fácil para introgresar altos niveles de resistencia al fitopatógeno en Chile (Thabuis *et al.*, 2004) o para seleccionar genotipos resistentes. Es necesario evaluar nuevamente las 11 accesiones sobresalientes para verificar la resistencia al hongo pero ahora bajo condiciones de invernadero/cielo abierto y evaluar otros caracteres de interés como rendimiento, precocidad, características de fruto (largo, diámetro, peso, color en madurez comercial), entre otros, y obtener progenie de cada uno de los materiales genéticos para realizar futuras investigaciones. El problema que se ha tenido en los programas de mejoramiento genético de Chile al introgresar la resistencia a *P. capsici* utilizando como donador a SCM334 son las características desfavorables de fruto que este genotipo tiene, y este problema puede ser resuelto con alguna(s) de las accesiones identificadas.

Conclusiones

El marcador SCAR OpD04.717 no permitió la discriminación entre accesiones resistentes y susceptibles a *P. capsici*. Se identificaron 11 accesiones de Chile serrano con resistencia al hongo mediante pruebas de reacción *in vitro*; de éstas, la accesión BGS41 mostró mayor porcentaje de supervivencia (45.8%) a la cepa del patógeno en comparación al testigo

capsici. Despite these genetic material did not amplify the SCAR marker OpD04.717, can be used to search for other markers associated with genes that confer resistance to the Oomycete like: CaRGA2, CABPR1, CABGLU, CAPO1, CASC1 (Silvar *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013), or QTLs Phyto.4.1, Phyto.5.1, Phyto.6.1, Phyto.11.1 and Phyto12.1, located on chromosomes 4, 5, 11 and 12 respectively (Thabuis *et al.*, 2003). Because the resistance to this pathogen is polygenic (Pochard and Daubèze, 1980; Ogundiwin *et al.*, 2005; Minamiyama *et al.*, 2007), it is difficult to explain the resistance to the disease just through marker OpD04.717.

Molecular assisted selection (MAS) has been proposed to facilitate handling of complex traits such as resistance to *P. capsici* in combination with phenotypic analysis as an easy way to introgress high levels of resistance to the pathogen in pepper (Thabuis *et al.*, 2004) or to select resistant genotypes. It is necessary to reassess the 11 outstanding accessions to verify the resistance to the fungus but now under greenhouse/field conditions and evaluate other traits of interest like yield, earliness, fruit characteristics (length, diameter, weight and color at commercial maturity) among others, and obtain progeny of each of the genetic materials for future research. The problem that pepper breeding programs have had when introgressing resistance to *P. capsici* using as a donor SCM334 are the unfavorable characteristics that this genotype has, this problem can be solved with some of the identified accessions.

Conclusions

SCAR marker OpD04.717 did not allow discrimination between resistant and susceptible accessions to *P. capsici*. 11 serrano peppers accessions with resistance to the fungus were identified through *in vitro* test reaction; of these, accession BGS41 showed higher survival rate (45.8%) to the strain of the pathogen compared to SCM334 resistant check (20%). There are accessions with potential use as new sources of resistance to root rot caused by *P. capsici* for traditional breeding programs, but not for marker-assisted selection through OpD04.717.

End of the English version



resistente SCM334 (20%). Existen accesiones de chile serrano con utilidad potencial como nuevas fuentes de resistencia a pudriciones de la raíz causada por *P. capsici* para programas de mejoramiento genético tradicional, pero no para selección asistida por marcadores moleculares mediante OpD04.717.

Agradecimientos

Los autores(as) agradecen al INIFAP (Proyecto 2324621897) por el financiamiento de este estudio.

Literatura citada

- Bosland, P. W. and Linsey, D. L. 1991. A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper *Capsicum annuum*. Plant. Dis. 75:1048-1050.
- Bosland, P. W. and Votava, E. J. 2003. Peppers: vegetable and spice *Capsicums*. CAB International, England, 233 p.
- Dubcovsky, J. 2004. Marker-assisted selection in public breeding programs: the wheat experience. Crop Sci. 44:1895-1898.
- Ernest, E. G. and Kelly, J. D. 2004. The Mesoamerican anthracnose resistance gene, Co-42, does not confer resistance in certain Andean genetic backgrounds. Annu. Rep. Bean Improvement Coop. 47:245-246.
- Gill, L. H. R. 2009. Diversidad genética de frijol común y su implicación en el mejoramiento genético asistido en México. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada-Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Doctorado. Altamira, Tamaulipas. 129 p.
- Gil-Ortega, R.; Palazón-Español, C. and Cuartero-Zueco, J. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breed. 107:50-55.
- Guerrero-Moreno, A. and Laborde, J. A. 1980. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. Synopses of the IVth meeting of the *Capsicum* working group of Eucarpia. I. V. T. Wageningen, The Netherlands. 52-56 pp.
- Guijón, L. C. y González, P. A. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. Rev. Mex. Fitopatol. 19:49-56.
- Hernández-González, M. E. 2007. Variabilidad de aislados de *Phytophthora capsici* en el estado de Guanajuato. Tesis de Maestría en Ciencia. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya Guanajuato. 100 p.
- Kelly, J. and Vallejo, V. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. HortScience 39:1196-1197.
- Kim, B. S. and Hartmann, R. W. 1985. Inheritance of a gene (Bs3) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum*). Plant Dis. 69:233-235.
- Kim, H. J.; Nahm, S. H.; Lee, H. R.; Yoon, G. B.; Kim, K. T.; Kang, B. C.; Choi, D.; Kweon, O. Y.; Kwon, J. K.; Han, J. H.; Kim, J. H.; Park, M.; Ahn, J. H.; Choi, S. H.; Her, N. H.; Sung, J. H. and Kim, B. D. 2008. BAC-derived markers converted from RFLP linked to *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). Theor. Appl. Genet. 118: 15-27.
- Kumar, J.; Choudhary, A. K.; Solanki, R. K. and Pratap, A. 2011. Towards marker-assisted selection in pulses: a review. Plant Breed. 130:297-313.
- Marcia, V. S. e João, B. S. 2001. Identificacao de marcador RAPD ligado ao alelo Co-4² de resistencia do feijoeiro comun ao agente causal de antracnose. Ciencias Agrotécnicas 25(5):1097-1104.
- McGregor, C. and Waters, V. 2011. Genotypic and phenotypic variation among pepper accessions resistant to *Phytophthora capsici*. HortScience. 46(9):1235-1240.
- Mínamiyama, Y.; Tsuru, M.; Kubo, T. and Hirai, M. 2007. QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. Breed. Sci. 57:129-134.
- Mora, B. B. y Vargas, E. 1981. Evaluación de la resistencia de cultivares de chile (*Capsicum* spp.) a la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* Leonian. Agronomía Costarricense 5:109-113.
- Morales, A. M. 2012. Características de producción y calidad de líneas avanzadas de chile jalapeño para la Planicie Huasteca. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. División de Ingeniería en Agronomía. Tantoyuca, Veracruz. 52 p.
- Ogundiwin, E. A.; Berke, T. F.; Massoudi, M.; Black, L. L.; Huestis, G.; Choi, D.; Lee, S. and Prince, J. P. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTL's for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). Genome. 48:698-711.
- Pérez, M. L.; Duran, O. L.; Ramírez, M. R.; Sánchez, P. J. R. y Olalde, P. V. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Rev. Mex. Fitopatol. 21:19-25.
- Pochard, E. and Daubèze, A. M. 1980. Recherche et évaluation des composantes d'une résistance polygénique: la résistance du piment à *Phytophthora capsici*. Ann. Amélior. Plant. 30:377-398.
- Pozo, C. O. 1983. Estimates of natural cross-pollination in serrano pepper (*Capsicum annuum* L.). Capsicum Newsletter 2:106-108.
- Quirin, E. A.; Ogundiwin, E. A.; Prince, J. P.; Mazourek, M.; Briggs, M. O.; Chlanda, T. S.; Kim K. T.; Falise, M.; Kang, B. C. and Jahn, M. M. 2005. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto.5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. Theor. Appl. Genet. 110: 605-612.
- Reifschneider, F. J. B.; Boiteux, L. S.; Della-Veicchia, P. T.; Poulos, J. M. and Kuroda, N. 1992. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. Euphytica 62:45-49.
- Robles-Yerena, L.; Rodríguez-Villarreal, R. A.; Ortega-Amaro, M. A.; Fraire-Velázquez, S.; Simpson, J.; Rodríguez-Guerra, R. y Jiménez-Bremont, J. F. 2010. Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. Scientia Hortic. 125(3):248-255.
- Sandoval, B. J. 1993. Chile. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Ed. Trillas. 125-136 pp.

- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2007. SAS user's guide. Statistics. Version 8. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. *J. Environ. Qual.* 19:749-756.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2013. Disponible en (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>).
- Silvar, C.; Merino, F. and Díaz, J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165:1120-1124.
- Thabuis, A.; Palloix, A.; Servin, B.; Daubeze, A. M. and Signoret, P. 2004. Marker-Assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. *Mol. Breed.* 14:9-20.
- Thabuis, A.; Palloix, A.; Pflieger, S.; Daubeze, A. M.; Caranta, C. and Lefebvre, V. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germoplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1473-1485.
- Velásquez, V. R. y Medina, M.M. 2003. La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. INIFAP. Centro de Investigación Regional Norte-Centro, Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, México. Folleto científico Núm. 14. 26 p.
- Vences-Contreras, C. y Vázquez-García, L. M. 2008. Inoculación *in vitro* de la roya blanca (*Puccinia horiana* Hennings) en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Agronomía Mesoamericana.* 19(1):81-85.
- Yeam, I.; Kang, B. C.; Lindeman, W.; Frantz, J. D.; Faber, N. and Jahn, M. M. 2005. Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the pvr1 locus encoding eIF4E in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 112:178-186.
- Wang, D. and Bosland, P. W. 2006. The genes of *Capsicum*. *HortSci.* 41: 1169-1187.
- Zhang, Y. L.; Jia, Q. L.; Li, D. W.; Wang, J. E.; Yin, Y. X. and Gong, Z. H. 2013. Characteristic of the Pepper CaRGA2 Gene in Defense Responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 8985-9004.