EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN SEMILLAS DE *Capsicum* spp. Y SU SENSIBILIDAD *in vitro* A EXTRACTOS VEGETALES

TESIS

Que presenta:

Christian Lucelly Pérez Chablé

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:

Dr. Jairo Cristóbal Alejo

Conkal, Yucatán, México

Octubre, 2019

TecNM

EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México, 23 de Octubre de 2019

El comité de tesis del candidato a grado: Christian Lucelly Pérez Chablé, constituido por los CC. Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Dra. Marcela Gamboa Angulo y Dr. Arturo Reyes Ramírez, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Aislamiento e identificación de hongos en semillas de *Capsicum* spp. y su sensibilidad *in vitro* a extractos vegetales,** que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Jairo Cristóbal Alejo
Director de Tesis

Dra. Marcela Gamboa Angulo
Co- Director de Tesis

Dr. Arturo Reyes Ramírez
Asesor de Tesis

REDMI NOTE 8
AI QUAD CAMERA

Conkal, Yucatán a 23 de Octubre de 2019

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Christian Lucelly Pérez Chablé

REDMI NOTE 8
AI QUAD CAMERA

Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, por otorgarme los conocimientos necesarios para mi formación profesional.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI) por darme la oportunidad de cursar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Al Dr. Jairo Cristóbal Alejo director de esta tesis, por su tiempo, paciencia, motivación conocimientos, disponibilidad, confianza y dedicación.

A la Dra. María Marcela Gamboa Angulo co-directora de esta tesis, por las sugerencias y opiniones para mejorar este trabajo.

Al Dr. Arturo Reyes Ramírez asesor de esta tesis, por su paciencia, sugerencias y opiniones para mejorar este trabajo.

A mis amigos: Caro, Laura, Arturo y Erick por su amistad, consejos y todos los momentos compartidos.

A los profesores y compañeros que contribuyeron a mi formación profesional en la Maestría

Dedicatorias

A Diós por bendecirme y sostenerme en todo momento, por darme fuerzas para seguir adelante.

A mis padres: Delfina y Fernando gracias por su amor, confianza y por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida.

Índice de contenido

Agradecimientos……... iv

Dedicatorias…….. v

Índice de Contenido…….. vi

Índice de Figuras……... viii

Índice de Cuadros……. ix

RESUMEN……... x

ABSTRACT……. xi

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL…….

1.1 Introducción…….

1.2 Antecedentes……

1.2.1 Importancia de la calidad de la semilla…….....

1.2.2 Importancia de los hongos fitopatógenos……

1.2.2.1 Hongos en semillas de chile……

1.2.2.2 Identificación de hongos……...……

1.2.2.3 Control de hongos……

1.2.3 Extractos vegetales para el manejo de hongos fitopatógenos…….....

1.2.4 Efecto fungicida o fungistático……

1.2.5 Evaluación *in vitro* de extractos vegetales contra hongos fitopatógenos...

1.2.6 Descripción de especies……...

1.2.6.1 *Mosannona depressa*……...

1.2.6.2 *Parathesis cubana*……...

1.2.6.3 *Croton chichenensis*……

1.2.6.4 *Acalypha guameri*……

1.2.6.5 *Calea jamaicensis*……

1.3 Hipótesis……...

1.4 Objetivo general……...

1.4.1 Objetivos específicos……...

1.5 Procedimiento experimental……

1.6 Literatura citada……

CAPITULO II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN SEMILLAS DE *Capsicum* spp. Y SU SENSIBILIDAD *in vitro* A EXTRACTOS VEGETALES……
Resumen……....

Abstract…….

2.1 Introducción……

2.2 Materiales y métodos…….

2.2.1 Aislamiento de hongos……

2.2.2 Identificación de hongos…….

2.2.3 Pruebas de patogenicidad con *Fusarium* spp……..

2.2.4 Preparación de extractos acuosos……

2.2.5 Preparación de extractos etanólicos……

2.2.6 Determinación de la sensibilidad *in vitro* de extractos vegetales……..

2.2.7 Diseño experimental……...

2.3 Resultados y discusión……

2.3.1 Aislamiento e identificación morfológica de hongos de semillas de *Capsicum* spp…….
2.3.2 Identificación molecular de hongos aislados de semillas de *Capsicum* spp……..
2.3.3 Patogenicidad de cepas aisladas de semillas de chile……..

2.3.4 Efectividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales……...……

2.4 Conclusiones……

2.5 Literatura citada……...

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Incidencia de hongos en semillas de *Capsicum* spp.	
2	Identificación molecular de hongos fitopatógenos aislados de semillas de *Capsicum* spp.	
3	Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos vegetales mediante el ensayo de minidiscos contra hongos aislados de semillas de *Capsicum* spp.	
4	Efectividad extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* (ITC F01) y *Curvularia lunata* (ITC C02).	
5	Efectividad extractos vegetales sobre la inhibición de la esporulación de *Fusarium equiseti* (ITC F01) y *Curvularia lunata* (ITC C02).	
6	Efectividad extractos vegetales sobre la germinación de conidios de *Fusarium equiseti* (ITC F01) y *Curvularia lunata* (ITC C02).	

Índice de figuras

Figura		Página
1	Inhibición de crecimiento de *Fusarium equiseti* en medios con extractos etanólicos por día.	
2	Inhibición de crecimiento de *Curvularia lunata* en medios con extractos etanólicos por día.	

Índice de Anexos

Anexo		Página
1	Hongos aislados de semillas de chile y su identificación morfotaxonómica.	
2	Hongos fitopatógenos, aislados de semillas de chile y su identificación morfotaxonómica.	
3	Efecto de s extractos etanólicos en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata*	
4	Efecto de extractos etanólicos en el crecimiento micelial de *Fusarium equiseti*	
5	Efecto de extractos etanólicos en la esporulación de *Curvularia lunata*	

RESUMEN

En México, la producción de chile (*Capsicum* spp.) es afectada por agentes causantes de enfermedades, principalmente hongos, que ocasionan cuantiosas pérdidas de producción. Los hongos se alojan en la semilla y pueden causar diferentes daños, si estas semillas germinan pueden ser portadoras de hongos patógenos. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar hongos en semillas de *Capsicum* spp. y su sensibilidad *in vitro* a extractos vegetales con propósitos de control biorracional. Un total de 80 semillas de cada tipo de chile se sembraron, previa desinfestación con hipoclorito de sodio al 2 % en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar, se incluyeron 20 semillas por caja petri con cuatro repeticiones e incubaron a 28 ºC en oscuridad total, repetido en dos ocasiones. Cuatro y siete días después de la siembra se cuantificaron y aislaron los hongos que se desarrollaron en el medio de cultivo. Se hicieron cultivos puros y de acuerdo con los crecimientos fúngicos, se identificaron a nivel género por métodos tradicionales y a nivel especie mediante secuencia de la región ITS1- 5.8s- ITS2 del ADN ribosomal. Se evaluaron seis extractos a 2 mg. mL^{-1} contra las cepas identificadas. Se identificaron tres géneros como contaminantes o saprófitos: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. y dos especies como hongos fitopatógenos, *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata*. Las semillas de *C. chinense* tuvieron mayor número de crecimiento fúngico y los hongos con mayor frecuencia sin importar la especie de chile fueron *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp. Los extractos de *Mosannona depressa* (T y R), *Calea Jamaicensis* (planta completa), *Croton chichenensis* (R)y *Acalypha gaumeri* (R) mostraron efecto antifúngico del 100% sobre las cepas aisladas de semillas de *Capsicum* spp.

Abstract

In Mexico, the production of chili (*Capsicum* spp.) is affected by disease-causing agents, mainly fungi, which cause large production losses. The fungi lodge in the seed and can cause different damages, if these seeds germinate they can be carriers of pathogenic fungi. The objective of this work was to identify fungi in seeds of *Capsicum* spp. and its *in vitro* sensitivity to plant extracts for biorational control purposes. A total of 80 seeds of each type of chili were sown, after disinfestation with 2% sodium hypochlorite in Papa-Dextrose-Agar culture medium, 20 seeds were included per petri dish with four repetitions and incubated at 28 ° C in total darkness , repeated twice. Four and seven days after planting, the fungi that developed in the culture medium were quantified and isolated. Pure cultures were made and according to fungal growths, they were identified at the genus level by traditional methods and at the species level by sequence of the ITS1-5.8s-ITS2 region of the ribosomal DNA. Six extracts at 2 mg. mL^{-1} were evaluated against the identified strains. Three genera were identified as contaminants or saprophytes: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. and two species such as phytopathogenic fungi, *Fusarium equiseti* and *Curvularia lunata*. The seeds of *C. chinense* had a greater number of fungal growth and the fungi more frequently regardless of the species of chili were *Aspergillus* sp. and *Cladosporium* sp. extracts of *Mosannona depressa* (T y R), *Calea Jamaicensis* (whole plant), *Croton chichenensis* (R) and *Acalypha gaumeri* (R) showed 100% antifungal effect on isolated strains of *Capsicum* spp.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción

En México, la producción de chile (*Capsicum* spp.) es afectada por agentes causantes de enfermedades, que ocasionan importantes pérdidas de producción (Guigón-López y González-González, 2001). Entre las enfermedades que atacan con mayor frecuencia al cultivo destaca la marchitez del chile, que consiste en la muerte prematura por pudrición de la raíz (Avelar y Marban, 1989). En campo, se han aislado varios agentes fitopatógenos como *Fusarium* spp. (67%), *Rhizoctonia solani* Kühn (42%) y *Phytophthora capsici* Leonian (2%) (Rico-Guerrero *et al.*, 2001; Rico-Guerrero, 2002).

En algunos casos, la semilla se contamina o infecta en la mayoría desde la parcela de producción y los patógenos son capaces de causar síntomas durante la fase de almácigo o campo (Galván, 2003). En los últimos años, se ha incrementado el uso de productos naturales que sirven como alternativas para el control de estos agentes fitopatógenos; con el propósito de disminuir los costos de producción y el impacto ambiental (Leng *et al.*, 2011).

Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivos aislar e identificar hongos de semillas de *C. annuum* L. y *C. chinense* Jacq. y estimar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos vegetales provenientes de la península de Yucatán.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Importancia de la calidad de la semilla

Las semillas infectadas comúnmente presentan coloraciones café a negro, arrugadas o deformes, de menor tamaño y peso que las sanas, al abrirlas pueden mostrar un algodoncillo de color blanco, gris o negro, que manifiesta los signos de hongos. Cuando

éstos se alojan en la semilla, pueden causar diferentes daños. Si la infección es severa, pueden ocasionar la muerte del embrión o perder su valor germinativo. Si estas semillas llegan a germinar son portadoras directamente de patógenos, esto tendrá un efecto determinante en el progreso de enfermedades, que aumenta la probabilidad de ser atacados por otros patógenos que se encuentran en la semilla y el suelo (Galván, 2003).

La calidad de la semilla es un aspecto fundamental para garantizar el éxito de la obtención de material vegetal sano (Arguedas *et al.*, 1997). Por lo general, se adquieren semillas de características sanitarias desconocidas, lo cual puede incidir negativamente (March *et al.*, 2012). Un patógeno transmitido por semilla es aquel que se encuentra sobre o dentro de la semilla, penetra sus tejidos y permanece en estado latente; como contaminante o internamente donde es difícil su detección y control (Galván, 2003). El manejo de los almácigos tradicionales establecidos en suelo sin fumigar y empleando semilla no tratada es económicamente costoso, debido a la protección requerida contra la incidencia de fenómenos climáticos adversos y factores bióticos desfavorables (Velázquez *et al*., 2007).

1.2.2 Importancia de los hongos fitopatógenos

Las enfermedades de etiología fúngica casi siempre se debe a un solo tipo de hongo y aunque se estiman más de 100,000 especies, su identificación cuando se encuentra en una planta enferma; implica que deben incluirse todas cuando se aísla en medio de cultivo.

1.2.2.1 Hongos en semillas de chile

Velázquez *et al.* (2007) reportaron la presencia de *Alternaria* spp. en el 97.7 % de las colectas de semilla de chile, independientemente del origen geográfico y tipo de chile; sin embargo, en el 30 % encontraron a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. causantes de

ahogamiento en almácigos, también se identificó a *Penicillium* spp. Con excepción de este último, los primeros fueron aislados de plántulas de chile en la región (Goldberg, 1995).

Avelar *et al.* (2011) detectaron crecimientos fungosos en semilla sana y en semillas colectadas de plantas de chile que mostraron síntomas de la enfermedad "Miada de perro", aunque en este caso los más comunes fueron hongos saprófitos como *Aspergillus* spp. (40 %), y como fitopatógenos a *Alternaria solani* (13.5 %) y *Fusarium* spp. (3.3 %) y en la mayoría de las siembras no se obtuvo ningún tipo de crecimiento (43.2 %).

Morales *et al.* (2002) encontraron a *Phytophthora capsici* en casi todas las estructuras de la semilla; las partes más infectadas fueron el endospermo y el embrión.

1.2.2.2 Identificación de hongos

Las características que se utilizan para la identificación de los hongos son: tipo de esporas, cuerpos fructíferos (o estructuras portadoras de las esporas) y hasta cierto grado las del soma (plasmodio o micelio). Lo anterior resulta suficiente para sugerir la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo, esto se logra mediante la consulta de claves dicotómicas (Barnnet y Hunter, 2006).

Una forma rápida y eficaz, para la identificación a nivel especie, es mediante el análisis de la secuencia de regiones del ADN o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite establecer la identificación de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, lo que ha revolucionado la sistemática de hongos (Aguín *et al*., 2001; Seifert *et al*., 2007). En la actualidad, esta información junto con las características morfológicas y bioquímicas específicas, constituye la base de la identificación y clasificación taxonómica de los hongos.

1.2.2.3 Control de hongos

El uso de fungicidas sintéticos ayuda en forma rápida a reducir pérdidas de producción, por lo que constituye la principal táctica para el control de enfermedades fungosas (Gutiérrez *et al.*, 2004; Bernal *et al.* 2005). Sin embargo, la utilización en dosis altas y aplicaciones recurrentes ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes, lo que ha elevado los costos de producción (Cooke *et al*. 2003; Leroux, 2003 y Guerrero *et al.* 2007). Además de que son contaminantes y dañinos a la salud. Una alternativa a esto, son los extractos vegetales, ya que cumplen un rol importante en la agroecología; por el beneficio al ambiente y al ecosistema cuando son usados como alternativa para el tratamiento de enfermedades en las plantas (Jiménez y Mosquera, 2014).

1.2.3 Extractos vegetales para el manejo de hongos fitopatógenos

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios como mecanismos de defensa. El proceso para obtener metabolitos secundarios es variable. Se pueden obtener extractos acuosos (Bautista *et al*., 2003) o utilizar disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (Abou-Jawdah *et al*., 2002).

Se considera que la mayoría de los compuestos obtenidos de las plantas son biodegradables e inocuos. México posee una riqueza florística total de 23 314 especies, ubicándolo en cuarto lugar detrás de Brasil, China y Colombia, al menos el 50 % de ellas, son endemicas del país (Villaseñor, 2016).

Se han desarrollado alternativas naturales de control de enfermedades, con el uso de extractos vegetales, con los que se ha obtenido resultados prometedores. Éstos, tienen las ventajas de poseer un origen biológico, ser degradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el ambiente (Barrera y Bautista, 2008).

1.2.4 Efecto fungicida o fungistático

El efecto fungicida es la capacidad de un agente sintético o natural para inhibir la viabilidad del hongo y el efecto fungistático es la capacidad para inhibir la germinación de las esporas o su desarrollo inicial, mientras permanezca en contacto continuo. Se utilizan diferentes técnicas para conocer si un producto sintético o natural tiene acción fungicida o fungistática. Alguna de ellas son la de disco, difusión en agar, E-test, bioautografía y microdilución (Achicanoy, 1981).

1.2.5 Evaluación *in vitro* de extractos vegetales contra hongos fitopatógenos

En condiciones *in vitro* los extractos pueden inhibir el crecimiento micelial de los hongos, la formación y la germinación de sus esporas, de modo que ayudan al control de enfermedades de frutas y hortalizas (Hernández *et al.*, 2007). A continuación se mencionan algunas de las evaluaciones que se han realizado con extractos vegetales, los cuales mostraron el potencial contra hongos fitopatógenos.

López *et al.* (2005) evaluaron el efecto inhibitorio de extractos acuosos de ajo (*Allium sativum* L.), gobernadora (*Larrea tridentata* Sessé & Moc. ex DC.), clavo (*Syzygium aromaticum* L.) y canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.), en concentraciones de 5 y 10 %, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae;* los extractos mostraron una tendencia a incrementar su efecto inhibitorio con el aumento de la concentración.

Lizcano (2007), evaluó *in vitro* la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) contra *F. oxysporum*. El extracto inhibió el crecimiento micelial en un 74 %. Así mismo, Barrera y García (2008), evaluaron el aceite de *T. vulgaris* contra *Fusarium*

spp. en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) y comprobaron que el aceite de tomillo ejerció total inhibición del crecimiento micelial a dosis de 200, 250 y 300 $\mu g.mL^{-1}$.

Vargas- Diaz *et al.* (2014), con el extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri* inhibió el crecimiento micelial de *Curvularia* sp. (ITC 10).

1.2.6 Descripcion de especies

1.2.6.1 *Mosannona depressa*

Pertenece a la familia Annonaceae, a *Mosannona despresssa* también se le conoce como *Annona depressa* Baill y *Malmea depressa* Baill, comúnmente llamado *boox éelemuy, éelemuy, chakni', ch'ulumay, sak éelemuy* (maya). Es un árbol que puede medir hasta 10 m, prospera en selva mediana subperenifolia. Algunos estudios indican que el extracto clorofórmico de la corteza de *M. depressa* tiene efecto antifúngico contra *Trichophyton mentagrophytes* y *F. oxyosporum* en una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 400 $mg.mL^{-1}$ (Anaya *et al.*, 2001).

1.2.6.2 *Parathesis cubana*

Se encuentra dentro de la familia de Myrsinaceae, se le conoce también como *Ardisia cubana.* Es un árbol de hasta 15 m de altura y se encuentra en la selva baja caducifolia. No se conocen los nombres comunes de esta especie.

1.2.6.3 *Croton chichenensis*

La especie *Croton chichenensis* Lundell pertenece a la familia Euphorbiaceae, nombre común *xikin burro* (español-maya); *éck baalam, xikin ch' omak* (maya). Es una planta arbustiva de selvas medianas, endémica de la península de Yucatán. El génereo *Croton* se

han reportado flavonoides, eugenol, fenoles, terpenos y derivados diterpénicos como metabolitos principales con actividad antifúngica (Quevedo *et al*., 2007; Jaramillo *et al*., 2007 y Wang *et al*., 2010). Existen algunos estudios de *C. chichenensis* relacionados con su actividad antifúngica sobre *A. solani, A. tagetica, Colletotrichum gloeosporioides, F. oxysporum* y *Rhizopus* sp. (Méndez, 2003; Gamboa-Angulo *et al*., 2008; Canché, 2013).

1.2.6.4 *Acalypha gaumeri*

Perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es comúnmente conocida como *sak ch'ilib tuux* (maya), se distribuye solo en la Península de Yucatán. Es un arbusto de la selva baja caducifolia. Recientes estudios demuestran que el extracto etanólico y acuoso de la raíz de *A. gaumeri* presentan actividad antifúngica en la inhibición del crecimiento micelial de 75 y 69 %, respectivamente (Vargas- Díaz *et al.*, 2014).

1.2.6.5 *Calea jamaicenses*

Pertenece a la familia de Asteraceae,se le conoce también como *Santolina jamaicensis* L. y comúnmente como malvavisco silvestre. En maya se le conoce como *arnica che' pasmo xiiw* (español-maya); *tu' xikin, oj lam piix, maloko', ch'iilib tuux*. Es un arbusto de la selva baja caducifolia y se encuentra distribuida en los estados de Yucatán, Chiapas, Nayarit, Oaxaca, Tabasco y Veracruz.

1.3 Hipótesis

La capacidad antifúngica de los extractos etanólicos de plantas nativas de Yucatán contra hongos aislados de semillas de *C. chinense* y *C. annuum* depende de la especie del patógeno, por lo que se obtienen porcentajes diferentes de efectividad inhibitoria.

La aplicación *in vitro* de extractos de plantas provenientes de la Península de Yucatán tienen al menos una efectividad en al menos 80 % de control en los hongos identificados de semillas de *Capsicum* spp.

1.4 Objetivo general

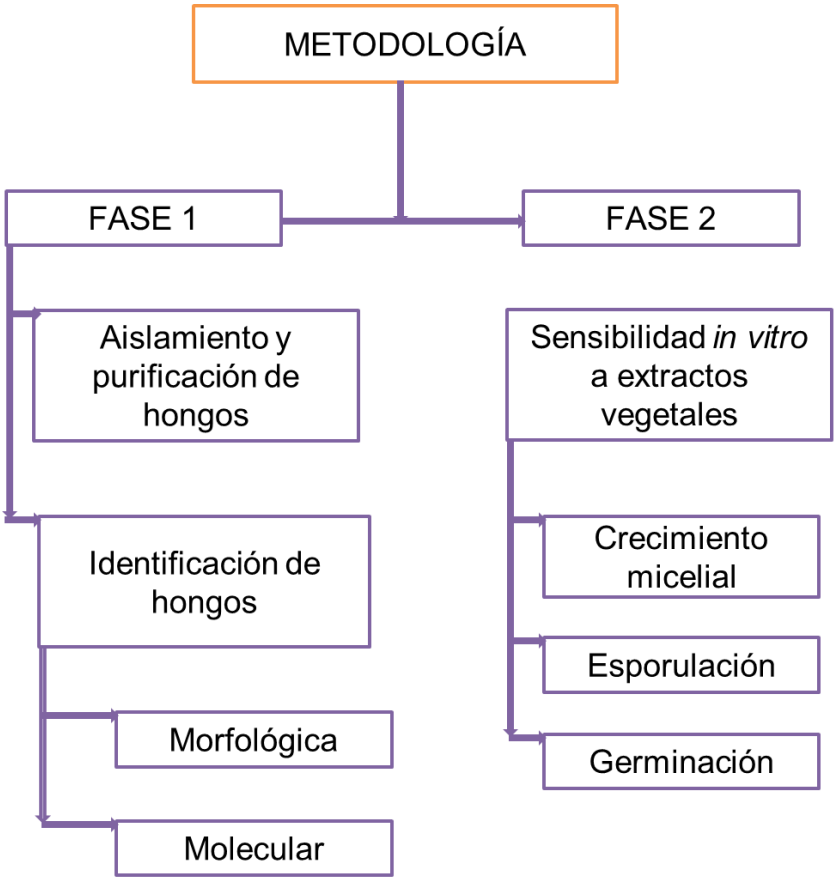
Aislar e identificar hongos en semillas de *Capsicum* spp. y determinar su sensibilidad *in vitro* a extractos de plantas provenientes de la península de Yucatán.

1.4.1 Objetivo específico

Identificar morfológica y molecularmente hongos en semillas de *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense.*

Estimar la inhibición en el crecimiento micelial, germinación y esporulación de hongos presentes en semillas de *Capsicum* spp. con extractos de plantas nativas.

1.5 Procedimiento experimental



1.6 Literatura citada

Abou-Jawdah, Y., H, Sobh, A, Salomeh. 2002. Antymicotic of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. J. Agric. Food Chem. 50: 3208-3213.

Achicanoy, H. 1981. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Crinipellis perniciosa* Singer y *Moniliphthora roreri*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 51 p.

Anaya, A. L., Espinosa- García, F. J., Cruz- Ortega R. 2001. Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. 1ra edición. Editorial Plaza y Valdés. 723 p.

Arguedas, M., Jiménez, M. y Miller, C. 1997. Microrganismos asociados a semillas de especies forestales en Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Ingeniería forestal. 4 p.

Aguín, O., Sabarís, M., Abelleira, A., Pintos, C. y Mansilla, J. P. 2001. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como técnica de diagnóstico en fitopatología forestal. III Congreso Forestal Español, Sierra Nevada (Granada).

Avelar- Mejía, José de Jesús, Galindo- Oliva, Martha, Lara- Herrera, Alfredo, Llamas-Llamas, J. Jesús, Luna- Flores, Maximino, Salas- Luevano, Miguel Ángel y Cabral-Enciso, Mariandrea. 2011. Hongos asociados con la enfermedad "miada de perro" en el cultivo de chile. REMEXCA. 2: 155-160.

Avelar, M.J., y Marban, M. 1989. Intentos de control de la marchitez del chile ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de Valsequillo, Puebla. Memorias XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Montecillo, Edo. de México, México. Resumen. 11 p.

Barnett, L., H., and B. Hunter B. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Barrera, L. y S. Bautista. 2008. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum Nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Rev. Mex. Fitopatol. 26: 27-31.

Barrera, N. L. y García, B. L. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* spp. aislado de papaya (*Carica papaya*). Rev. Científica UDO Agríc. 8:33-41.

Bautista, S. E., García, D. L., Barrera, N. R., Reyes, C., and Wilson, C. L. 2003. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamúchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea, Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Postharv. Biol. Technol. 29: 8 1-92.

Bernal, A.; J. F. Zamora, G. Virgen y R. Nuño. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Rev. Mex. Fitopatol. 23: 140-146.

Canché, M., C. 2013. Extractos acuosos para el control de hongos asociados en frutos postcosecha de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México. 2-17 pp.

Galván, D.l. 2003. Detección e identificación de hongos y bacterias en semilla de chile cascabel (*Capsicum annum*) y chile de árbol (*Capsicum frutensis*) del Estado de Nayarit. Tesis de licenciatura de la universidad autónoma agraria Antonio Narro, Buena vista Saltillo, Coahuila, México.

Gamboa- Angulo M., J. Cristobal- Alejo, I. Medina- Baizabal, F. Chı-Romero, R. Mendez-Gonzalez, P. Sima- Polanco y F. May- Pat. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. World J. Microbiol Biotechnol. 24: 1955–1959.

Guerrero, E.; S. Solís, F. Hernández, A. Flores, V. Sandoval y D. Jasso. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Rev. Mex. Fitopatol. 25: 48-53.

Goldberg, N.P. 1995. Chile Pepper Diseases. Agricultural Experiment Station, College of Agriculture and Home Economics, New Mexico State University. Circular 549. Las Cruces, New Mexico, USA. 20 p.

Guigon- López, C., y González- González, P. 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, N., Bautista, S. y Velázquez, M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. REV. FITOTEC. MEX. 30: 119-123.

Jaramillo, B., J. Olivero T., y K. Muñoz. 2007. Composición química volátil y toxicidad aguda (CL50) frente a *Artemia salina* del aceite esencial del *Croton malambo* colectado en la costa norte Colombiana. Scientia Et Technica 13: 299-302.

Jiménez, E, V. y O. Mosquera, M. 2014. Actividad antifúngica *in vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). Salud Soc Uptc. 1: 16-21.

Leng, P., Zhang .Z., Pan. G., and M. Zhao. 2011. Applications and development trends in biopesticides. Afr J Biotechnol. 10: 64-73.

Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemical towards plan pathogens. Comptes Renduns Biologies. 326: 9-21.

Lizcano, C. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá Colombia, D. C. 1-71 pp.

López, B. A., López, B. S. A., Vázquez, B. M. E., Rodríguez, H. S. A., Mendoza, E. M. y Padrón, C. E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticilllium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. Rev. Mex. Fitopatol. 23: 183-190.

March, G., Marinelli A., Oddino C., Kearney M. 2002. Evaluación de fungicidas "Curasemillas". Campaña agrícola. Instituto de Fitopatología y Fisiología vegetal. Syngenta. Argentina.

Méndez, G. R. 2003. Sensibilidad a bencimidazoles y propiedades fúngicas de plantas nativas de la península de Yucatán en *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico Agropecuario No.2 Conkal, Yucatán, México. 114 p.

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. Rev. Mex. Fitopatol. 20: 94-97.

Quevedo, R., L. Nuñez y B. Moreno. 2007. Contribución al estudio químico y de bioactividad de dos especies nativas: (*Croton bogotanus*. Cuatr. y *Croton funckianus*. Cuatr.) euphorbiaceae. Scientia et Technica. 13: 391-393.

Rico- Guerrero, L. 2002. Búsqueda de Resistencia Natural en Plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del Complejo Fúngico que causa Pudrición de Raíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México. 91 p.

Rico- Guerrero, L., Guerrero- Aguilar, B., López- Vázquez, A., Muñoz- Sánchez, C.I., Guevara- Olvera, L., Guevara- González, R.G., Torres- Pacheco, I. y González-Chavira, M. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Memorias XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Querétaro, Querétaro, México. Resumen F-134.

Ruiz, Lau. N., Medina, F. y Martínez,-M. 2011. El chile habanero: su origen y usos. p. 70. [Consulta: 10 de marzo 2015]. Disponible en: http: www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/62_3/PDF/Habanero.pdf.

SIAP. 2014. Producción Agrícola. [Consulta: 25 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo.

Vargas- Díaz, A. A., Gamboa- Angulo, M., Medina- Baizabal, I. L., Pérez- Brito, D., Cristóbal- Alejo, J. y Ruíz- Sánchez, E. 2014. Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y Espectro de Actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. Rev. Mex. Fitopatol. 32: 01-11.

Velásquez- Valle, R., y Amador- Ramírez, M., Medina- Aguilar, M., y Lara- Victoriano, F. 2007. Presencia de Patógenos en Almácigos y Semilla de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. Rev. Mex. Fitopatol. 25: 75-79.

Wang, C., J. Zhang, H. Chen, Y. Fan, and Z. Shi. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. Tropical Plant Pathology 35: 137-143.

CAPITULO 2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN SEMILLAS DE *Capsicum* spp. Y SU SENSIBILIDAD *in vitro* A EXTRACTOS VEGETALES

Christian Lucelly **Pérez- Chablé[1],** Jairo **Cristóbal- Alejo[1],** María Marcela **Gamboa-Angulo[2],** Arturo **Reyes- Ramírez[1].**

[1]División de estudios de Posgrado e Investigación, Instituto tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico S/N, Conkal, Yucatán, C.P. 97345.; [2]Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Calle 43 #130. Colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200. Mérida, Yucatán. E-mail: Christian.perez@itconkal.edu.mx.

RESUMEN

En México, la producción de chile (*Capsicum* spp.) es afectada por agentes causantes de enfermedades, principalmente hongos, que ocasionan cuantiosas pérdidas de producción. Los hongos se alojan en la semilla y pueden causar diferentes daños, si estas semillas germinan pueden ser portadoras de hongos patógenos. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar hongos en semillas de *Capsicum* spp. y su sensibilidad *in vitro* a extractos vegetales con propósitos de control biorracional. Un total de 80 semillas de cada tipo de chile se sembraron, previa desinfestación con hipoclorito de sodio al 2 % en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar, se incluyeron 20 semillas por caja petri con cuatro repeticiones e incubaron a 28 ºC en oscuridad total, repetido en dos ocasiones. Cuatro y siete días después de la siembra se cuantificaron y aislaron los hongos que se desarrollaron en el medio de cultivo. Se hicieron cultivos puros y de acuerdo con los crecimientos fúngicos, se identificaron a nivel género por métodos tradicionales y a nivel especie mediante secuencia de la región ITS1- 5.8s- ITS2 del ADN ribosomal. Se evaluaron seis extractos a 2 mg. mL^{-1} contra las cepas identificadas. Se identificaron tres géneros como contaminantes o saprófitos: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. y dos especies como hongos fitopatógenos, *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata*. Las semillas

de *C. chinense* tuvieron mayor número de crecimiento fúngico y los hongos con mayor frecuencia sin importar la especie de chile fueron *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp. Los extractos de *Mosannona depressa* (T y R), *Calea Jamaicensis* (planta completa), *Croton chichenensis* (R)y *Acalypha gaumeri* (R) mostraron efecto antifúngico del 100% sobre las cepas aisladas de semillas de *Capsicum* spp.

Palabras clave: *Capsicum* spp., enfermedades, valor germinativo, identificación.

Abstract

In Mexico, the production of chili (*Capsicum* spp.) is affected by disease-causing agents, mainly fungi, which cause large production losses. The fungi lodge in the seed and can cause different damages, if these seeds germinate they can be carriers of pathogenic fungi. The objective of this work was to identify fungi in seeds of *Capsicum* spp. and its *in vitro* sensitivity to plant extracts for biorational control purposes. A total of 80 seeds of each type of chili were sown, after disinfestation with 2% sodium hypochlorite in Papa-Dextrose-Agar culture medium, 20 seeds were included per petri dish with four repetitions and incubated at 28 ° C in total darkness , repeated twice. Four and seven days after planting, the fungi that developed in the culture medium were quantified and isolated. Pure cultures were made and according to fungal growths, they were identified at the genus level by traditional methods and at the species level by sequence of the ITS1-5.8s-ITS2 region of the ribosomal DNA. Six extracts at 2 mg. mL^{-1} were evaluated against the identified strains. Three genera were identified as contaminants or saprophytes: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. and two species such as phytopathogenic fungi, *Fusarium equiseti* and *Curvularia lunata*. The seeds of *C. chinense* had a greater number of fungal growth and the fungi more frequently regardless of the species of chili were *Aspergillus* sp. and *Cladosporium* sp. extracts of *Mosannona depressa* (T y R), *Calea Jamaicensis* (whole plant), *Croton chichenensis* (R) and *Acalypha gaumeri* (R) showed 100% antifungal effect on isolated strains of *Capsicum* spp.

Keywords: *Capsicum* spp., Diseases, germination value, identification.

2.1 INTRODUCCIÓN

Los patógenos en semillas se transmiten como contaminantes adheridos a la cubierta de la semilla o internamente (Waller *et al.*, 2002). Éstos pueden sobrevivir hasta 10 años como esporas o estructuras de reposo dentro y sobre la semilla (OMAFRA, 2009); por lo que son fuente de inóculo para el siguiente ciclo de cultivo. En campo, los daños por hongos transmitidos por semilla causan disminución de germinación y emergencia, poco después de la germinación la muerte de plántulas. Las que sobreviven tienen menor vigor y son susceptibles a otros fitopatógenos (González y Trevathan, 2000). En la actualidad, el control de hongos fitopatógenos requiere de aplicar técnicas alternativas, ya que el manejo tradicional con fungicidas sintéticos ha ocasionado diversos problemas, toxicidad a los que aplican los productos (Whalen *et al*., 2003), detención de exportaciones por residuos en producto de consumo y contaminación al ambiente (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 2002) y afectación de organismos benéficos (Anderson *et al*., 2003). Otro aspecto importante es que los hongos fitopatógenos han generado resistencia al ingrediente activo de algunos fungicidas sintéticos, como respuesta a la presión de selección por las altas dosis y aplicaciones continuas (Cooke *et al*., 2003; Leroux, 2003). En el marco de la agricultura sostenible los extractos vegetales con actividad antifungica, son una alternativa promisoria para el control de hongos fitopatógenos, debido a que son biodegradables, de elevada efectividad, de bajo costo y no contaminan (Martínez *et al*., 2010; Moo-Koh *et al*., 2014).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en los laboratorios de Fitopatología y Microbiología del Instituto Tecnológico de Conkal, y de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Las semillas de chile habanero (*Capsicum Chinense*), chile dulce y chile xcatik (*C. annuum*) se colectaron con productores locales. Se obtuvieron siete lotes: tres de chile habanero, dos de chile dulce y dos de xcatik.

2.2.1 Aislamiento de hongos

Al azar, 80 semillas de cada lote de semillas se Utilizaron para aislar los hongos. Todas las 80 semillas se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril, se sembraron en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) e incubaron a 28 ºC en oscuridad hasta la presencia de crecimiento micelial. Cuatro y siete días después de la siembra se cuantificaron y reaislaron los crecimientos fúngicos. Se hicieron cultivos puros y se transfirieron fragmentos de 5 mm de los crecimientos a nuevas cajas de PDA e incubaron en las mismas condiciones hasta observar crecimiento y esporulación. Se hicieron cultivos monospóricos a partir de cultivos puros por suspensión de esporas de cada hongo, en 10 mL de agua destilada estéril que fueron vertidos en una caja Petri con agar agua (AA), se dejaron sedimentar por 10 segundos, se decantó el agua, y la caja se incubó en condiciones ambientales de laboratorio por 24 h. De las esporas germinadas, algunas fueron transferidas individualmente a cajas con PDA y se incubaron hasta obtener abundante esporulación. Los conidios de cada hongo se conservaron en glicerol al 25 % (Moreno *et al.*, 2005).

2.2.2 Identificación de hongos

Para la identificación morfológica de los hongos aislados, se consideraron las características macroscópicas y microscópicas de los crecimientos fúngicos como: color, elevación, forma, micelio, tipo de hifas y la clase de esporas (Barnett y Hunter, 2006).

Para la identificación molecular se realizó la extracción del ADN mediante el Kit ZRFungal/Bacterial DNA MiniPrepTM de PROMEGA. Se empleó micelio con un crecimiento de 13 días a 28 °C; las cajas con el micelio del hongo se rasparon con un portaobjeto estéril y se lavaron con agua estéril. La visualización del ADN se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). La cuantificación del ADN se realizó con un NanoDrop™ Lite Spectrophotometer de Thermo Scientific. Para la amplificación se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando los ITS1 e ITS4 (White *et al*., 1990) para la identificación de hongos. Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y la secuenciación de los amplificados se enviaron a la empresa Macrogen, EE.UU. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el software CAP3, y se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI para su identificación a nivel de especie.

2.2.3. Pruebas de patogenicidad con *Fusarium* spp.

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron 20 plantas de 60-70 días después del trasplante y dos cepas de *Fusarium* spp., se procedió a realizar una herida en el cuello de la planta y el micelio se inoculó en la herida, posteriormente se cubrió y selló con parafilm. Se procedió a evaluar a los seis y siete días después de la inoculación, hasta la presencia de los síntomas.

2.2.4 Preparación de los extractos acuosos

Para la preparación de los extractos acuosos (EA) se empleó material seco de raíces de *Acalypha gaumeri*, *Croton chichenensis* y *Parathesis cubana*, tallo y raíz de *Mosannona depressa* y planta completa de *Calea jamaicenses*. Se pesaron 1.5 g (3 %) de material seco y se le adicionaron 25 mL de agua destilada calentada a ebullición. Ya fría la mezcla se eliminaron los residuos sólidos por filtración a través de papel Whatman No.1. Se realizó una segunda filtración a través de un filtro milipore (0.22 µm) para eliminación de hongos y bacterias contaminantes (Rodríguez *et al*., 2012). Se obtuvieron un total de siete EA.

2.2.5 Preparación de los extractos etanólicos

Para la obtención de los extractos etanólicos crudos (EE), el material vegetal seco y molido de cada una de las partes (hoja, tallo y raíz) de las seis especies, se mezclaron por separado con etanol, y se extrajeron por sonicación (frecuencia de 20 KHz, Cole-Parmer), por 20 minutos en tres ocasiones sucesivas. Posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotaevaporador (Ika ® RV10) con el baño a 40°C y se dejó secar a temperatura ambiente. Los EE crudos obtenidos, se transfirieron a viales y se obtuvo el porcentaje de rendimiento de cada uno de ellos con base al material seco y molido. En total se obtuvieron siete EE los cuales se almacenaron a -17.5°C en un congelador hasta su uso en los bioensayos (Godoy- Rodriguez, 2019).

Para el bioensayo, los extractos crudos etanólicos (40 mg) se disuelvieron en 400 µl de DMSO-Tween 20 al 0.5 %.

2.2.6 Efectividad *in vitro* antifúngica de extractos vegetales

Previo a la evaluación *in vitro* de los extractos se realizó una evaluación preliminar con la técnica de minidiscos de agar-extracto utilizando la técnica de UK Patent Application GB 2396349 (Boehlendorf, *et al*., 2004) modificada por Godoy- Rodriguez (2019).

Para los ensayos se utilizó PDA estéril, el cual se mezcló con el extracto etanólico a evaluar a 20 $mg.mL^{-1}$ (Cristóbal *et al.*, 2013). Con los extractos que presentaron actividad antifúngica en la prueba de minidiscos, se hizo una mezcla a una concentración de 2 $mg.mL^{-1}$. La mezcla se vació en cajas Petri, después de 24 h de verificar la esterilidad del medio de cultivo, se depositó en el centro de la caja Petri un disco de cultivo de PDA (diámetro 5 mm) con los hongos en estudio, las cajas se sellaron y se conservaron a temperatura ambiente para su posterior evaluación, también se consideró un testigo sin extracto (Vargas- Díaz *et al*., 2014).

Se consideraron como variables de respuesta de efectividad del extracto: Inhibición de crecimiento micelial (ICM), de esporulación (IE) y de germinación de conidios (IGC).

Para la determinación de la ICM, las colonias se midieron de manera longitudinal y transversal con un vernier digital cada 24 horas hasta que el testigo sin extracto cubrió por completo la caja Petri. La efectividad de cada extracto se estimó con la fórmula de Abbott (1925) $E = [(Test – Trat) / Test] * 100$. Donde: E= Efectividad (%), Test = Crecimiento micelial del testigo (mm), Trat = Crecimiento micelial del tratamiento (mm) y 100 = Constante.

Para evaluar la IE esporulación, a ada tratamiento que presentó crecimiento micelial se de agregaron 9 mL de agua destilada estéril, se raspó la superficie con un portaobjetos

estéril para ayudar al desprendimiento de esporas, la solución se filtró con gasas estériles y se depositó en un tubo Falcon estéril de 50 mL. Posteriormente, se colocaron 100 µL de esta solución en un vial estéril y se adicionaron 900 µL agua destilada estéril, se agitaron y se transfirieron 36 µL a la cámara de Neubauer y se determinó el número de esporas de cada tratamiento con la fórmula de Höller *et al*. (1999), NE = [(X / 0.1) * 1000* 9]. Donde: NE = Número de esporas (mL), X = Promedio de esporas por campo, 0.1 = Profundidad de la cámara, 1000 = Constante y 9 = mL de agua que se agrega para hacer la dilución.

Para evaluar la IGC se cuantificó la emisión del tubo germinativo, se consideró una caja de Petri con extracto vegetal mezclado al medio de cultivo PDA (según cada tratamiento) se dividió en cuatro cuadrantes y en cada uno se colocaron 5 µL de una solución de conidios de cultivos anteriores previamente valorada, luego se colocó un cubreobjetos estéril y se contabilizó el número de esporas en cada cuadrante; la germinación de esporas se evaluó cada hora hasta que en el testigo (PDA sin extracto) germinó en un 100%.

2.2.7 Diseño experimental

El diseño experimental que se empleó fue completamente al azar. Con los datos de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, de esporulación y de germinación de esporas, se realizaron análisis de varianza previa transformación de los datos mediante la fórmula: y=arsin (sqrt(y/100)); la separación de medias se realizó con el método de Tukey ($P \leq 0.05$). Los análisis se realizaron con ayuda del paquete estadístico InfoStat para Windows®.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Aislamiento e identificación de hongos de semillas de *Capsicum* spp.

Se encontraron siete géneros de hongos en los aislamientos y se identificaron como: *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Beltrania* sp., *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. sin embargo, por su diferente capacidad patogénica y por la frecuencia de su presencia en sus aislamientos, para este estudio se trabajó con *Fusarium* sp. reportado en semillas de *Capsicum* sp. (Velásquez *et al.*, 2007) y fitopatógeno en plántulas de chile (Vasquez-López *et al*., 2009) y con *Curvularia* sp. reportado como causante de manchas foliares y pudrición de raíces en *C. chinense, C. frutescens* (Cristóbal *et al.*, 2013; Orozco y González, 2016).

Cuadro 1. Incidencia de hongos en semillas de *Capsicum* spp.

Semilla analizada	**Incidencia (%) Hongos**	**Géneros identificados**
Habanero *(C. chinense)*	13.32	*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp.
Xcatic *(C.annuum)*	3.12	*Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Beltrania* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp.
Dulce *(C. annuum)*	3.12	*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp.

2.3.2 Identificación molecular de hongos aislados de semillas de *Capsicum* sp.

Con la extracción de ADN se logró una amplificación por PCR cercana a 500 pb con los iniciadores ITS1 e ITS4, lo que permitió realizar la identificación molecular de los hongos aislados.

Cuadro 2. Identificación molecular de hongos fitopatógenos aislados de semillas de *Capsicum* spp.

Código de cepas	Hospedante	Identificación morfológica	Identificación molecular		
			Homología	Identidad (%)	N° de acceso
ITC F01	*C. annumm*	*Fusarium* sp.	*F. equiseti*	99	KU041631.1
ITC F02	*C. annumm*	*Fusarium* sp.	*F. equiseti*	99	KJ412501.1
ITC C01	*C. chinense*	*Curvularia* sp.	*C. lunata*	99	MH183196.1
ITC C02	*C. chinense*	*Curvularia* sp.	*C. lunata*	99	MH858245.1
ITC C03	*C. annumm*	*Curvularia* sp.	*C. lunata*	99	JX412501.1

Las cepas de *Fusarium* sp. (ITC F01) y *Fusarium* sp. (ITC F02), aisladas de semillas de *C. annuum,* correspondieron a *Fusarium equiseti*, esta especie, está asociada con pudrición de raíces y cuellos de plántulas y marchitez vascular en *Capsicum* spp. (González *et al*., 2004). Las cepas de *Curvularia* sp. (ITC C01), *Curvularia* sp. (ITC C02) y *Curvularia* sp. (ITC C03), aisladas de semillas de *C. chinense* y *C. annuum* correspondieron a *Curvularia lunata,* especie causante de manchas foliares en *C. frutense* (Pei *et al.,* 2017), enrrollamiento de hojas y posterior defoliación (Orozco y Gonzalez, 2016) y antracnosis en *C. annumm* (Pearson *et al*., 1984).

2.3.3 Patogenicidad de cepas aisladas de semillas de chile

A partir de los siete días de la inoculación, las plantas de *C. chinense* inoculadas con los aislamientos de *F. equiseti* (ITC F01), presentaron el síndrome característico de esta especie como son: clorosis, inhibición de crecimiento, manchas foliares, necrosis de tallo y raíz (Black *et al.*, 1991; Jamiołkowska, 2008), con lo que se confirmó la patogenicidad del hongo. En otros estudios *Fusarium* sp., indujo en plantas de chile cambios en la coloración del follaje, presencia de lesiones negras, de aspecto hundido y bordes irregulares en las raíces (Velázquez *et al*., 2001).

2.3.4 Efectividad de los extractos vegetales

Solo los extractos etanólicos mostraron actividad antifúngica contra ambas especies de hongos; los extractos de *A. gaumeri*, *M. depressa* (R) y *M. depressa* (T) mostraron actividad contra ambos hongos, mientras que *C. jamaicensis*, *C. chichenensis* y *P. cubana* mostraron actividad solo contra *C. lunata* (ITC C02). La actividad antifúngica de los extractos etanólicos en comparación con los extractos acuosos, está relacionado con la naturaleza del extracto. Los extractos etanólicos contienen compuestos poco polares además de los polares y tienen buena difusión en el medio sólido (Martinez *et al*., 2010).

Cuadro 3. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos vegetales mediante el ensayo de minidiscos contra hongos aislados de semillas de *Capsicum* spp.

Especie	Extracto	Cepa				
		ITCF01	ITCF02	ITCC01	ITCC02	ITCC03
Acalypha gaumeri	EE	+	+	+	+	+
Croton chichenensis	EE	-	-	+	+	+
Calea jamaicensis	EE	-	-	-	+	+
Mosannona depressa R	EE	-	+	+	+	+
Mosannona depressa T	EE	+	+	+	+	+
Parathesis cubana	EE	-	-	+	+	+
Acalypha gaumeri	EA	-	-	-	-	-
Croton chichenensis	EA	-	-	-	-	-
Calea jamaicensis	EA	-	-	-	-	-
Mosannona depressa R	EA	-	-	-	-	-
Mosannona depressa T	EA	-	-	-	-	-
Parathesis cubana	EA	-	-	-	-	-
PDA		+	+	+	+	+
DMSO+ Tween 20		+	+	+	+	+
Sportak		-	-	-	-	-

EE= Extracto etanólico; EA= Extracto acuoso. (+)= Con actividad antifúngica;(-)= Sin actividad antifúngica

En el medio de cultivo con el extracto de *M. depressa* (T) no hubo crecimiento micelial, lo cual se consideró de acción fungicida contra *F. equiseti* (ITC F01) (Figura 1). Este extracto, también tuvo efecto fungicida contra *Penicillium oxalicum* (Godoy-Rodriguez, 2019). La acción fungicida que muestran este tipo de extractos se debe a la presencia de

metabolitos como flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides, entre otros (Maneemegali y Naveen, 2010). En el caso de *M. depressa* (T), un estudio mostró la presencia 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno conocido como aliltetrametoxibenceno; responsable de la actividad antifúngica con una Concentración Mínima Inhibitoria de 400 y 250 µg.mL^{-1} contra *T. mentagrophytes* y *F.oxysporum*, respectivamente (Jimenez-Arellanes *et al*., 1996).

En el extracto etanólico de *A. gaumeri* se observó a partir del día ocho, crecimiento micelial de *F. equiseti* (ITC F01), por lo que se le adjudicó un efecto fungistático (Figura 1). Esta actividad del extracto efecto también lo reportaron contra *A. chrysanthemi* (Vargas- Díaz *et al*., 2014). Los extractos de *P. cubana, C. chichenensis* y *C. jamaicensis* también tuvieron un efecto fungistático en el crecimiento micelial de *F. equiseti*.

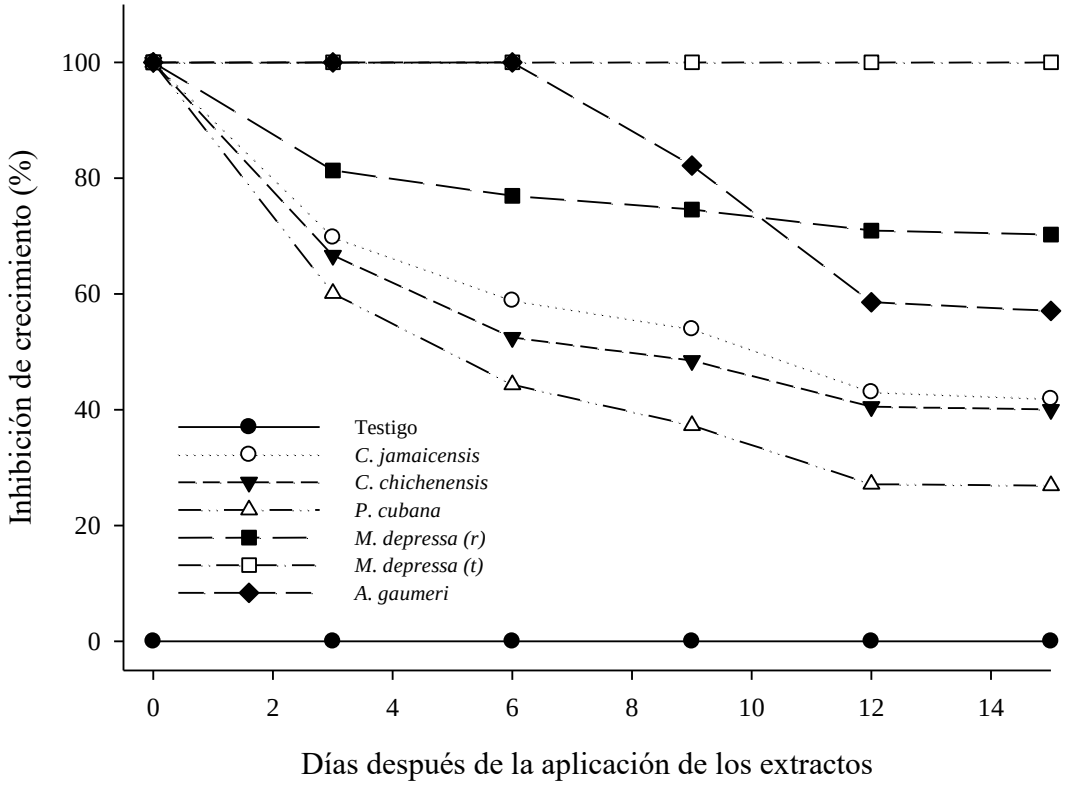


Figura 1. Inhibición *in vitro* de crecimiento de *Fusarium equiseti* (ITC F01) con extractos etanólicos.

Con la cepa de *C. lunata* (ITC C02) se estimaron efectos fungicidas con los extractos etanólicos de *C. jamaicensis, C. chichenensis, A. gaumeri, M. depressa* (R) y *M. depressa* (T), y efecto fungistático con el extracto etanólico de *P. cubana*, en este último se observó crecimiento micelial, a partir del día tres (Figura 2). La selectividad fungicida de los extractos sugieren que no solo depende del efecto del extracto, sino de la sensibilidad de los hongos, ya que un estudio con el extracto etanólico de *M. depressa y P. cubana* contra *P. oxalicum*, reportó con el primer extracto un efecto fungicida y con el segundo una actividad fungistática (Godoy-Rodriguez, 2019).

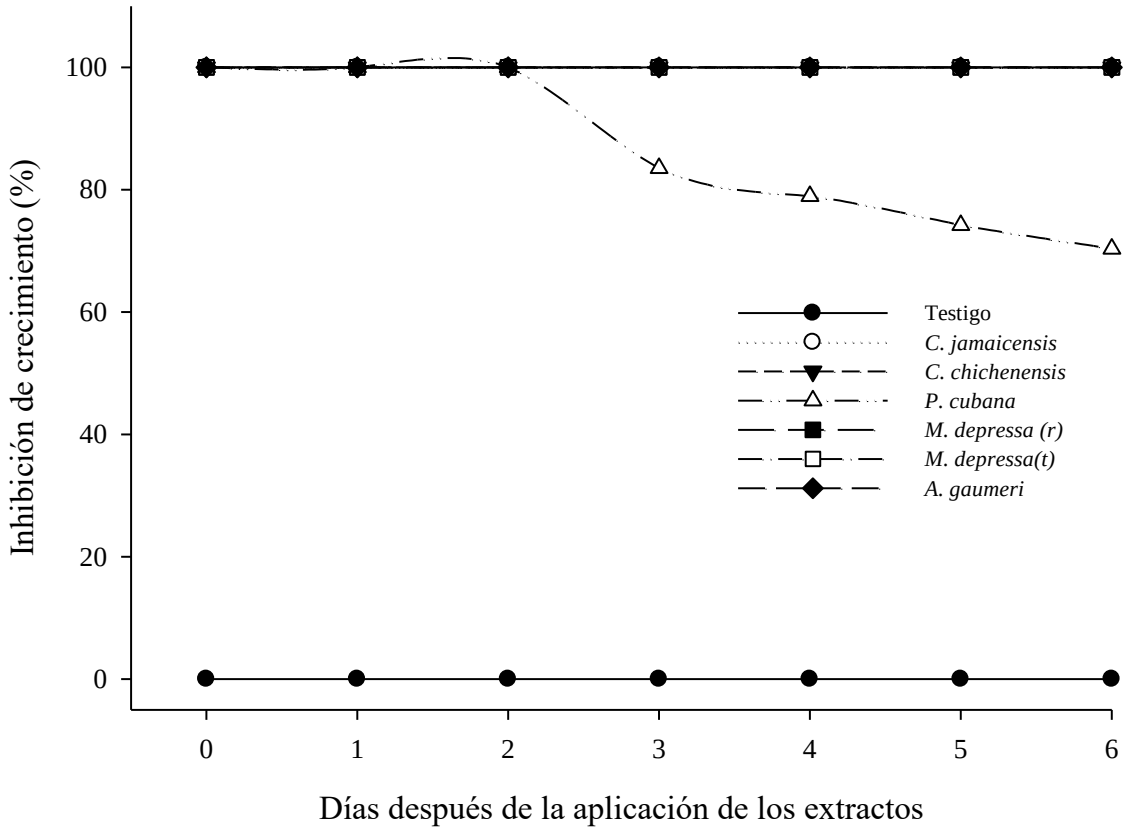


Figura 2. Inhibición *in vitro* de crecimiento de *Curvularia lunata* (ITC C02) con extractos etanólicos.

En la inhibición de crecimiento micelial, los extractos etanólicos de *C. jamaicensis, C. chichenensis, A. gaumeri* y *M. depressa* (T), mostraron una efectividad del 100 % en la cepa de *C. lunata* (ITC C02) mostrando un efecto fungicida, ya que impidió su reproducción, lo que es importante para el control de estos fitopatógenos (Bautista *et al.*, 2004) mientras que el extracto etanólico de *M. depressa* (R) fue efectivo en un 76 %. En la cepa de *F. equiseti* (ITC F01) el extracto etanólico de *M. depressa* (T) mostro 100% de efectividad en cuanto a inhibición del crecimiento micelial, mientras que los extractos de *M. depressa* (R) y *A. gaumeri* fueron efectivos en 70- 80 %. Estos resultados respaldan lo reportado por Vargas- Díaz *et al*., (2014) donde mencionaron que el extracto de *A. gaumeri* mostró un 78 % de inhibición de crecimiento micelial de *A. chrysanthemi* y coinciden con los resultados obtenidos por Godoy-Rodriguez (2019) donde rerpotó con la aplicación del extracto etanólico de *M. depressa* (T) un 100 % de efectividad en cuanto a la inhibición de crecimiento micelial sobre *P. oxalicum*.

Cuadro 4. Efectividad extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* (ITC F01) y *Curvularia lunata* (ITC C02)

Extracto	**Especie de hongo**	
	***F. equiseti* (ITC F01)**	***C. lunata* (ITC C02)**
A. gaumeri	79.41 ±3.05b	100 ±0.00a
C. chichenensis	39.18 ±4.2c	100 ±0.00a
C. jamaicensis	44.36 ±4.04c	100 ±0.00a
M. depressa (R)	72.25 ±1.81b	100 ±0.00a
M. depressa (T)	100 ±0.00a	100 ±0.00a
P. cubana	27.72 ±7.05d	76.07 ±0.71b
Testigo	0 ±0.00e	0 ±0.00c

Medias con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

En algunos tratamientos, la efectividad de los extractos etanólicos en la esporulación y germinación de esporas no se evaluó porque los hongos no esporularon, aun cuando las cepas se cultivaron en medios específicos para su esporulación (Carvalho *et al.*, 2008).

En cuanto a la esporulación y germinación de conidios, se estimó con los extractos de *C. jamaicensis, C. chichenensis, A. gaumeri*, *M. depressa* (R) y *M. depressa* (T) inhibición del 100 % contra *F. equiseti* (ITC F01) y *C. lunata* (ITC C02). El extracto de *P. cubana* inhibió en un 100 % la esporulación y germinación de conidios de *F. equiseti* (ITC F01) pero no fue igual de efectivo contra *C. lunata* (ITC C02) porque en este hongo, el extracto inhibió un 56 % la esporulación y un 94 % la germinación de esporas. Con lo que se

demuestra la selectividad antifúngica del extracto. Para propósitos de control, es importante que los productos antifúngicos impidan esta fase del ciclo de vida; claves en la reproducción y diseminación de los hongos (Bautista *et al.*, 2004). Estudios previos reportaron con el extracto etanólico de *A. gaumeri* una inhibición en la esporulación y en la germinación de conidios de 78 % y de 69 %, respectivamente contra *A. chrysanthemi* (Vargas- Díaz *et al.*, 2014). Mientras que contra *Colletotrichum* sp. y *Fusarium* sp. fue efectivo en un 50 % (Gamboa-Angulo *et al*., 2008).

Cuadro 5. Efectividad extractos vegetales sobre la inhibición de la esporulación de *Fusarium equiseti* (ITC F01) y *Curvularia lunata* (ITC C02)

Extracto	**Especie de hongo**	
	***F. equiseti* (ITC F01)**	***C. lunata* (ITC C02)**
A. gaumeri	100 ±0.00a	100 ±0.00a
C. chichenensis	100 ±0.00a	100 ±0.00a
C. jamaicensis	100 ±0.00a	100 ±0.00a
M. depressa (R)	100 ±0.00a	100 ±0.00a
M. depressa (T)	100 ±0.00a	100 ±0.00a
P. cubana	100 ±0.00a	56.25 ±1.70b
Testigo	0 ±0.00b	0 ±0.00c

Medias con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 6. Efectividad extractos vegetales sobre la germinación de conidios de *Fusarium equiseti* (ITC F01) y *Curvularia lunata* (ITC C02)

Extracto	**Especie de hongo**	
	***F. equiseti* (ITC F01)**	***C. lunata* (ITC C02)**
A. gaumeri	100 ±0.00a	100 ±0.00a
C. chichenensis	100 ±0.00a	100 ±0.00a
C. jamaicensis	100 ±0.00a	100 ±0.00a
M. depressa (R)	100 ±0.00a	100 ±0.00a
M. depressa (T)	100 ±0.00a	100 ±0.00a
P. cubana	100 ±0.00a	94.04 ±1.19b
Testigo	0 ±0.00b	0 ±0.00c

Medias con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

2.4 CONCLUSIONES

Las semillas de *C. chinense* tuvieron mayor número de crecimiento fúngico y los hongos con mayor frecuencia sin importar la especie de chile fueron *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp.

La capacidad inhibitoria *in vitro* de extractos etanólicos de *A. gaumeri*, *M. depressa* (R) y *M. depressa* (T) fue mayor que la capacidad inhibitoria de los extractos de *C. chichenensis* y *C. jamaicensis*, ya que los primeros inhibieron el crecimiento micelial, esporulación y germinación en *F. equiseti* (ITC F01) y *C. lunata* (ITC C02), mientras que los extractos de *C. chichenensis* y *C. jamaicensis* solo inhibieron el crecimiento de *C. lunata* (ITC C02).

Los extractos etanólicos de *M. depressa* (T), *M. depressa* (R), *C. jamaicensis*, *C. chichenensis* y *A. gaumeri* mostraron un efecto antifúngico de 100 % contra *F. equiseti* (ITC F01) y *C. lunata* (ITC C02) aisladas de semillas de *Capsicum* spp.

No se registró actividad antifúngica de los extractos en su fase acuosa.

2.5 LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 2001. Fitopatología. Ed. Limusa, 2a. Ed., México. 734-741 pp.

Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Nicely, P.A. Vlaming, V. de, Connor, V. Richard, N., and Tjeerdema, R.S 2003. Integrated assessment of the impacts of agricultura drainwater in the Salinas River (California, USA) Environmental Pollution 124: 523-532.

Bautista, S., Hernandez, L., and Barrera, N. 2000. Antifungal screening of plantas of the state of Morelos, Mexico against four fungal postharvest phatogens of fruits and vegetables. Rev. Mex. Fitopatol. 18: 36-41.

Bautista, B., S., M. Hernández L., and E. Bosque M. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Rev. Mex. Fitopatol. 22: 178-186.

Black, L.L., Green, S.K., Hartman, G.L., and Poulos, J.M. 1991. Pepper Diseases. A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. AVRDC Publication No. 91-347. Taipei, Taiwan. 98 p.

Boehlendorf, B., Neff, S., Schuez, T., Louis-Pierre, Winkler, T., Dobler, M. Huang, Y. 2004. Compounds obtained from a fungal microorganism and derivatives thereof. UK Patent Application GB 2396349 A.

Carvalho, D., D. C., E. Alves, T. R. S. Batista, R. B. Camargos, and E. A. G. L. Lopes. 2008. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. Braz. J. Microbiol. 39: 792-798.

Cooke, D.E.L., Young, V., Birch, P.R.J., Toth, R., Gourlay, F., Day, J.P., Carnegie, S.F., and J. Duncan, M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). Plant Pathology. 52: 181- 192.

Cristóbal- Alejo, J., Navarrete- Mapen, Z., Herrera- Parra, E., Mis- Mut, M., Tun- Suárez, J, M., y Ruiz- Sánchez, E. 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. Revista de Protección Vegetal. 28: 138-144.

Gamboa- Angulo, M., J. Cristobal- Alejo, I. Medina- Baizabal, F. Chí- Romero, R. Mendez- Gonzalez, P. Sima´-Polanco, and F. May- Pat. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. World J Microbiol Biotechnol. 24: 1955–1959.

Gamboa, A. M., Cristóbal, A. J., Herrera, P. E., Simá, P. P., and S. Peraza, S. 2009. *Colletotrichum gloeosporioides* control with plant extracts from the Yucatan penninsula. 8th Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting on Biopesticides and RSEQ- GEQPN Grupo Especializado de Química de Productos Naturales (RSEQ –GEQPN) Congress. La Palma, Canary Islands, Spain. 24-26 September.

Godoy- Rodriguez, T. 2019. Actividad antifúngica de plantas nativas de la península de Yucatán para el control de fitopatógenos poscosecha de *Capsicum* spp. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.

Gonzalez, M.S., and L. Trevathan, E. 2000. Identity and pathogenicity of fungi associated with root and crown rot of soft red winter wheat grown on the upper coastal plain land resource area of Mississippi. Journal of Phytopathology. 148: 77-85.

González, E., Yáñez, M., Santiago, V., and Montero, A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, el Verde, Puebla. Agrociencia. 38: 653-661.

Höller, U., G König, and A. Wright. 1999. Three new metabolites from marine derivated fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microphaeropsis*. J. Nat. Prod. 62: 114-118.

Jamiołkowska A., 2008. Pathogenicity of some isolates of *Colletotrichum coccodes* and *Fusarium* spp. to sweet pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Phytopathol. Pol. 49: 65–71.

Jimenez- Arellanes, A., Mata, R., Lotina- Henssen, B., Anaya- Lang, A., and Velasco-Ibarra, L.1996. Phytogrowth- Inhibitory Compounds from *Malmea depressa*. Journal of Natural Products. 2: 202-204.

Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. Comptes Rendus Biologies. 326: 9-21.

Maneemegalai, S., and T. Naveen. 2010. Evaluation of antibacterial activity of flower extracts of *Cassia auriculata* L. Ethnobotanical Leaflets 14: 82-92.

Martínez, T. S., , E. Alvarez, T. Mamani, O., Vila, J. y Mollinedo, P.. 2010. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. Rev. Boliv. Quím. 27: 13-18.

Moo- Koh, F., J. Cristóbal, A., A. Reyes- Ramírez, J. Tun- Suárez, R. Sandoval- Luna, J. Ramírez- Pool. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. Agrociencia. 48: 833-845.

Moreno- Velázquez, M., Yáñez- Morales, M., Rojas- Martínez, R., Zavaleta- Mejía, E., Trinidad- Santos, A. y Arellano- Vázquez, J. 2005. Diversidad de Hongos en Semilla de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su Caracterización Molecular. Rev. Mex. Fitopatol. 23: 111-118.

OMAFRA, Ontario Ministry of Rural Affairs. 2009. Diseases of Field Crops: Cereal Diseases. *In*: Brown, C. (ed). Agronomy Guide for Field Crops. Publication 811. OMAFRA. Ontario, Canada. 300 p.

Orozco- Zambrano, L., Torres- González, C. 2016. Evaluación, diagnóstico y biocontrol de fitopatógenos de *Capsicum frutescens* (Solanaceae) en Guacarí, Valle del Cauca. Cali, Colmbia. Universidad del Valle. Biblioteca digital Universidad del Valle.

Pearson, M. N., Bull, P. B., and Speke, H. 1984. Anthracnose of *Capsicum* in Papua New Guinea; varietal reaction and associated fungi. International Journal of Pest Management. 30: 230-233.

Pei, Y., S. Tao, Y Y. Sun,T. Feng, and H. Long. 2017. First Report of *Capsicum frutescens* leaf spot caused by *Curvularia lunata* in China. Plant Disease. 102. 10.1094/PDIS-04-17-0597-PDN.

Ramírez- Legarreta, M.R. y J. Jacobo- Cuéllar, L. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. Rev. Mex. Fitopatol. 20: 168-173.

Rodríguez, P., A. T., M. A. Ramírez A., S. Bautista B., A. Cruz T., y D. Rivero. 2012. Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Rev. Científica UDO Agríc. 12: 91-96.

Seifert, K. A., Samson, R. A., De Waard, J. R., Houbraken, J., Levesque, C. A., Moncalvo, J. M., Seize, G. J. and P. Hebert, D. N. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. PNAS. The National Academy of Sciences of the USA 104: 3901-3906.

Vargas- Diaz, A., M. Gamboa, L. Medina, D. Pérez, J. Cristóbal y E. Ruiz S. 2014. Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas Contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. Rev. Mex. Fitopatol. 32: 01-11.

Vásquez López, A., Tlapal Bolaños, B., Yáñez Morales, M. de J., Pérez Pacheco, R. y Quintos Escalante, M. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. Rev. fitotec. Mex. 32: 127-134.

Velásquez Valle, R., Y Medina Aguilar, M., & Luna Ruiz, J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte- Centro de México. Rev. Mex. Fitopatol. 19: 175-181.

Velásquez- Valle, Rodolfo, Amador- Ramírez, Mario Domingo, Medina- Aguilar, María Mercedes, y Lara- Victoriano, Faustino. 2007. Presencia de patógenos en almácigos y semilla de chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. Rev. Mex. Fitopatol. 25: 75-79.

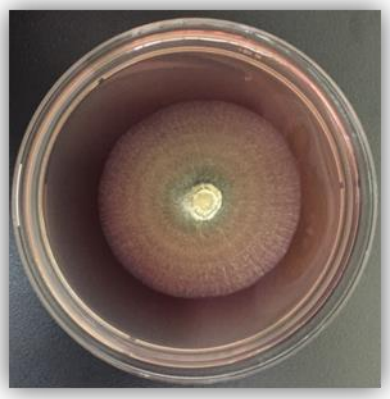
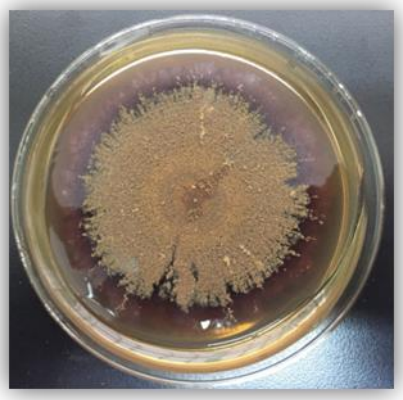
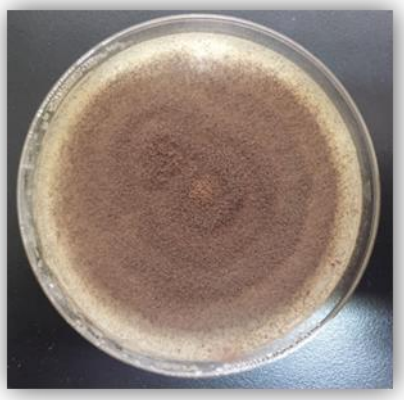
Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. Rev Mex Biodivers. 87: 3

Whalen, M.M., Wilson, S., Gleghorn, C., and Loganathan, B.G. 2003. Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. Environmental Research 92: 213-220.

White, T., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

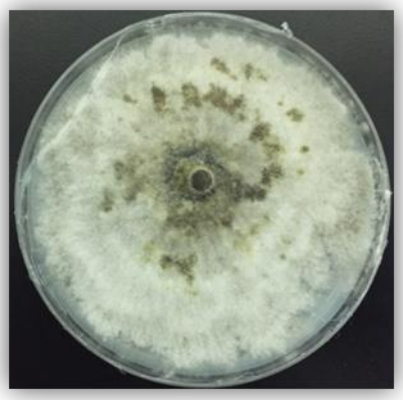
ANEXO GENERAL

ANEXO 1. Hongos saprofitos o secundarios, aislados de semilas de chile y su identificación morfotaxonómica.

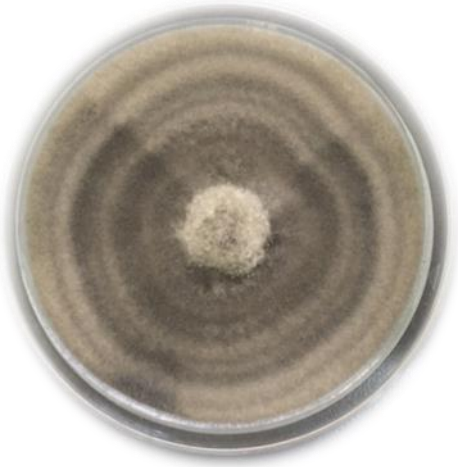
Hospedante	Cepa	Identidad
Capsicum annuum		*Chaetomium* sp.
Capsicum annuum *Capsicum chinense*		*Penicillium* sp.
Capsicum annuum *Capsicum chinense*		*Aspergillus* sp.

Capsicum annuum *Beltrania* sp.

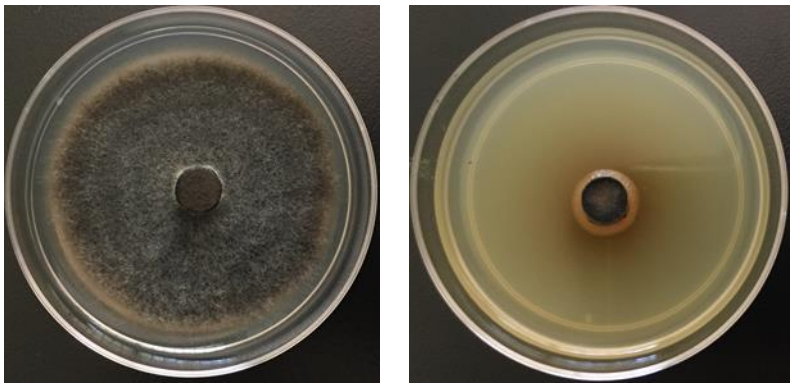
Capsicum annuum *Cladosporium* sp.



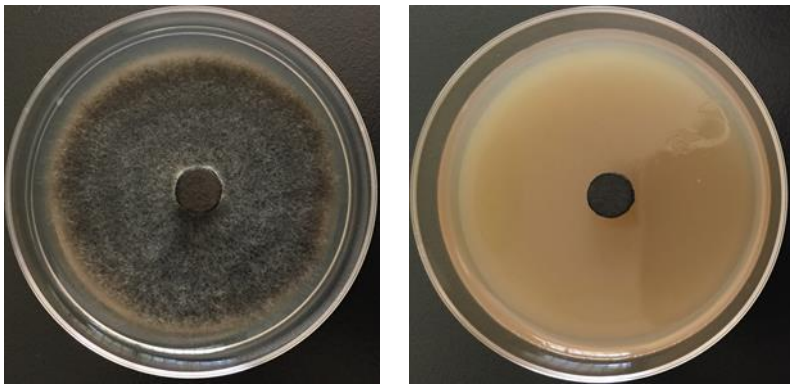
ANEXO 2. Hongos Fitopatógenos, aislados de semilas de chile y su identificación morfotaxonómica.

Hospedante	Cepa	Identidad
Capsicum annuum *Capsicum chinense*		*Curvularia lunata*
Capsicum annuum		*Fusarium equiseti*

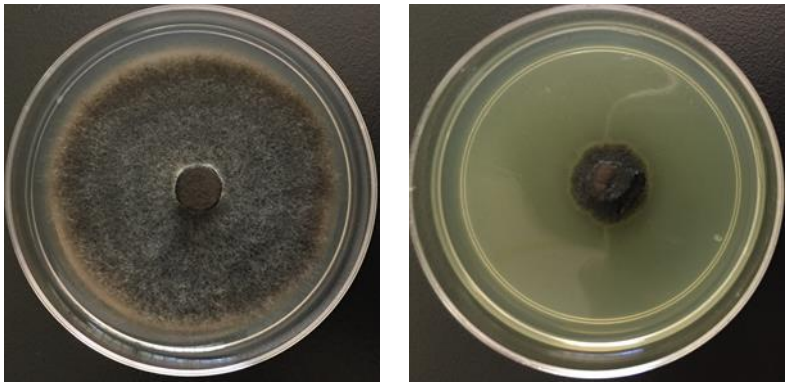
Anexo 3. Efecto de los extractos etanólicos en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* (Izquierda: Testigo), (Derecha: Extracto etanólico).



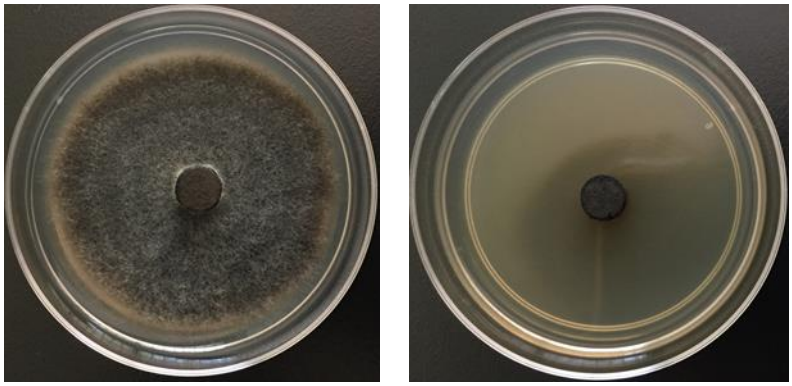
Calea jamaicensis



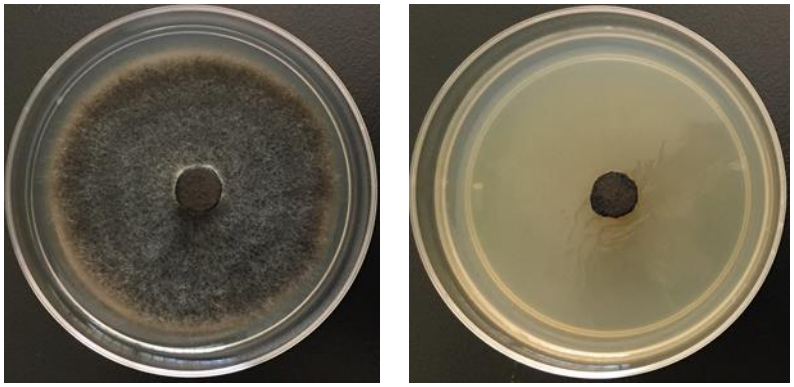
Croton chichenensis



Paratesis cubana

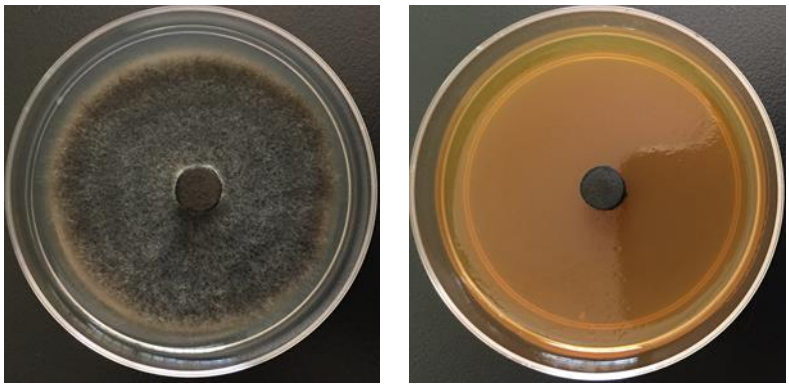


Mosannona depressa (Raiz)



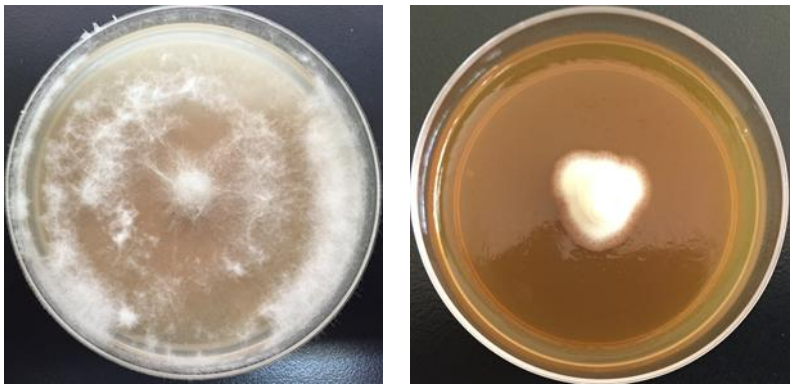
Mosannona depressa

(Tallo)

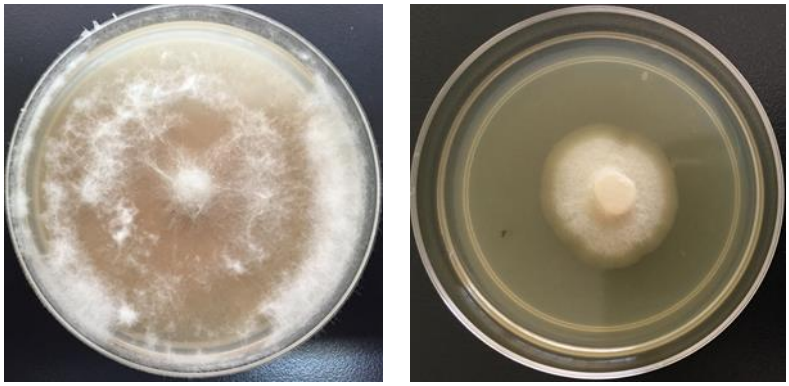


Acalypha gaumeri

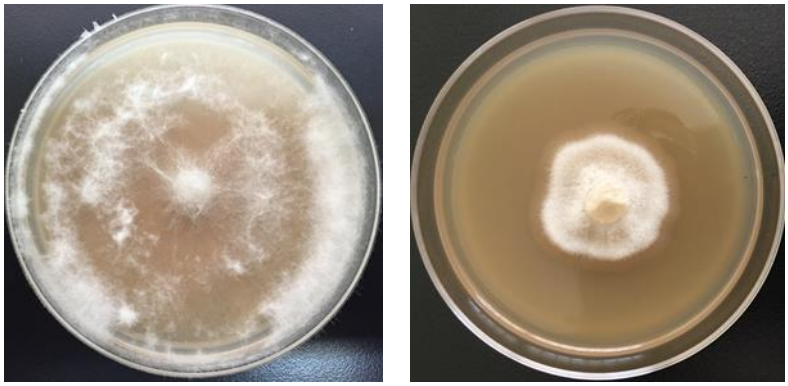
Anexo 4. Efecto de los extractos etanólicos en el crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* (Izquierda: Testigo), (Derecha: Extracto etanólico).



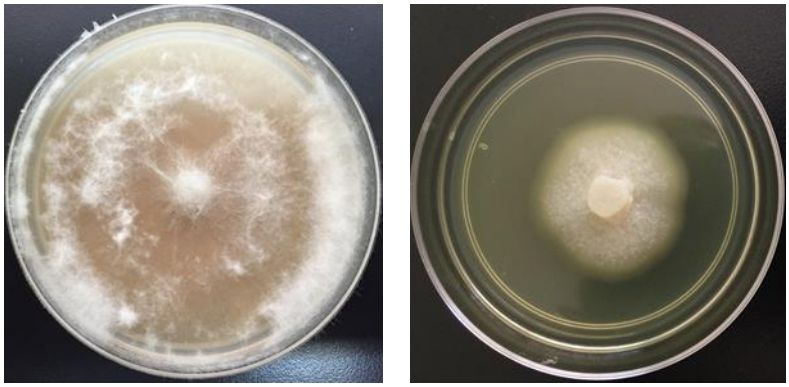
Acalypha gaumeri



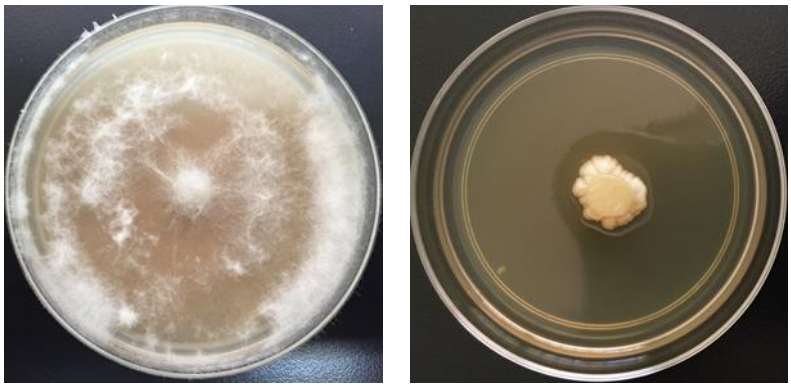
Calea jamaicensis



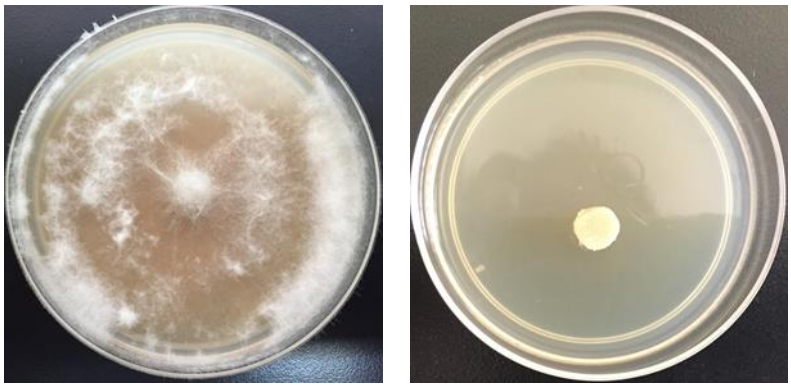
Croton chichenensis



Paratesis cubana



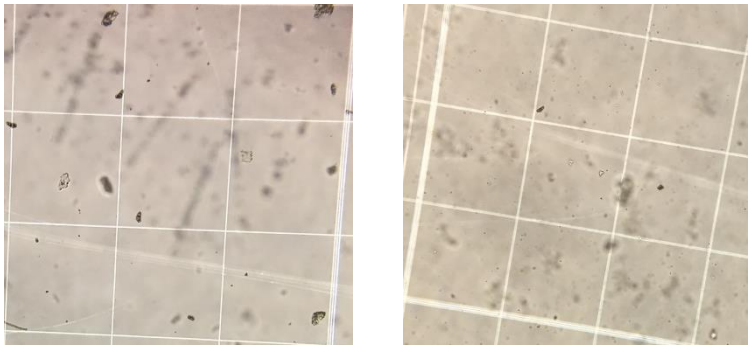
Mosannona depressa (Raíz)



Mosannona depressa

(Tallo)

Anexo 5. Efecto de los extractos etanólicos en la esporulación de *Curvularia lunata* (Izquierda: Testigo), (Derecha: Extracto etanólico).



Parathesis cubana