

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ÁREA INTEGRADA

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE PIMIENTO *Capsicum annuum*, EN LAS REGIONES DE SALAMÁ BAJA VERAPAZ Y LAGUNA DE RETANA JUTIAPA Y ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.**

RONI ALEXZANDER MIJANGOS CHEX

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ÁREA INTEGRADA

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE PIMIENTO *Capsicum annuum*, EN LAS REGIONES DE SALAMÁ BAJA VERAPAZ Y LAGUNA DE RETANA, JUTIAPA Y ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

RONI ALEXZANDER MIJANGOS CHEX

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	MSc. FRANCISCO JAVIER VÁSQUEZ VÁSQUEZ
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. WALDEMAR NUFIO REYES
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. WALTER ANTONIO REYES SANABRIA
VOCAL TERCERO	MSc. DANILO ERNESTO DARDÓN ÁVILA
VOCAL CUARTO	P. FORESTAL AXEL ESAÚ CUMA
VOCAL QUINTO	P. CONTADOR CARLOS ALBERTO MONTERROSO GONZÁLES
SECRETARIO	MSc. EDWIN ENRIQUE CANO MORALES

Guatemala, noviembre de 2009

Guatemala, noviembre de 2009

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de graduación: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE PIMIENTO *Capsicum annum*, EN LAS REGIONES DE SALAMÁ BAJA VERAPAZ Y LAGUNA DE RETANA JUTIAPA” Y ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO**, como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

**“ID Y ENSEÑAD A TODOS”**

Roni Alexzander Mijangos Chex

## ACTO QUE DEDICO

**A:**

**A DIOS** Por darme la vida, sabiduría y fuerza para cumplir uno de mis primeros sueños.

**MIS PADRES** Francisco Mijangos Roquel por enseñarme lo mejor en esta vida con su ejemplo de trabajo y responsabilidad. María Juanita Chex Otzoy, por su ejemplo de paciencia y humildad y a los dos por enseñarme lo que nunca hubiese aprendido en cuatro paredes, la universidad de la vida, por ser ellos quienes constantemente me han apoyado y me dan voz de aliento para salir adelante en cada uno de mis tropiezos.

**MIS HERMANOS** Aroldo, Giovany, Evelyn y Rosy por el apoyo incondicional y por los momentos de alegría e inolvidables en nuestras vidas.

**MIS SOBRINOS** Marielos, David Alexander, José Alejandro, Luis Francisco, Flor de María, Luis Ángel, José Julián y Andrea Guadalupe, por enseñarme y recordarme la inocencia de un niño.

**MI ABUELA** María Juana Vda. de Chex con mucho cariño y respeto.

**MIS TIOS** Con todo respeto y cariño, por sus sabios consejos.  
Gracias por estar conmigo y apoyarme cuando lo he necesitado.

**MIS AMIGOS** Byron Quina, Mich, Danny Cúmez, Ángel Mario Roquel, Julián Caná, Prof. Julián Pablo, Dina Cuxil, Lidia López, Carmen Chirix, Maribel, Werner Ochoa, Byron Gonzales, Soren Ramírez, Antonio Hernández, Juan Carlos Cabrera, Ileana del Rosario, Londy Mejia, Barbará Porta, Teresa Guerra, María del Carmen Santos, María Eugenia Díaz, Chahim, Silvano Canil, Juvencio Chom, Gerson Cordón, Manlfredo López, Carlos González, Jorge Mejicanos, Emilio Farfán, Raúl Leiva, Cesar, Mazariegos. Por demostrarme su amistad incondicional ya que fueron parte importante para culminar este sueño.

## **TRABAJO DE GRADUACION QUE DEDICO A;**

Mi patria            Guatemala

Mi Pueblo            San Juan Comalapa, La Florencia de América.

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Agronomía

Mis docentes

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por las pruebas recibidas en mi vida, por no dejarme caer y por ser la luz de mi existencia.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, unidad académica donde obtuve los conocimientos necesarios para mi formación profesional y por tantos recuerdos pasados en él.

A mis asesores Ing. Gustavo Álvarez y al Ing. Amílcar Sánchez. Por su ayuda y valiosas observaciones en todas las etapas del trabajo y el apoyo en la etapa final de mi formación académica.

A mi familia por el apoyo incondicional en mi vida estudiantil por brindarme el amor, la paciencia ya que son un ejemplo a seguir.

A mis amigos por enseñarme lo más precioso la amistad y por brindarme su apoyo, por sus palabras de aliento y por cada uno de esos momentos de alegría.

A la familia López Cordón por abrirme las puertas de su casa y de su corazón.

A mis compadres Byron y Magali por depositar su confianza en mí.

A los Doctores María Paloma Abad, Luis Álvarez Barnaola y Ana Pérez, de la Universidad Politécnica de Valencia, por sus valiosos conocimientos compartidos y asesoría en el desarrollo de mi investigación.

A Ligia Sirin gracias por estar conmigo y apoyarme cuando más te he necesitado, gracias por tu amor y tus palabras de aliento.

Sr. Julio Peña y Sr. Pedro Echeverría, por su apoyo durante la realización de mi Ejercicio Profesional Supervisado en el Centro de Diagnóstico Parasitológico.

## TABLA GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN GENERAL .....	vi
CAPÍTULO I. ....	1
DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	
1.1 Presentación .....	2
1.2 Marco Referencial .....	3
1.3 OBJETIVOS .....	7
1.4 METODOLOGÍA .....	7
1.5 RESULTADOS .....	7
1.6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	8
1.7 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	10
CAPÍTULO II. ....	11
INVESTIGACIÓN CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO DE <i>Phytophthora capsici</i> L. EN CHILE PIMIENTO <i>Capsicum annuum</i> , EN LAS REGIONES DE SALAMÁ BAJA VERPAZ Y LAGUNA DE RETANA JUTIAPA. ....	11
2.1 PRESENTACIÓN .....	12
2.2 MARCO TEÓRICO .....	13
2.2.1 MARCO CONCEPTUAL .....	13
2.2.2 MARCO REFERENCIAL .....	25
2.3 OBJETIVOS .....	30
2.3.1 ESPECÍFICOS .....	30
2.4 HIPÓTESIS .....	31
2.5 METODOLOGÍA .....	32
2.5.1 Trabajo de Campo .....	32
2.5.2 Fase de laboratorio .....	34
2.5.2 Ensayo prueba de patogenicidad .....	48
2.6 RESULTADOS .....	52
2.6.1 Incidencia por zonas productoras .....	56
2.7 CONCLUSIONES .....	69
2.8 RECOMENDACIONES .....	70
2.9 BIBLIOGRAFÍA .....	71
2.10 APÉNDICE .....	74



CONTENIDO	PÁGINA
CAPÍTULO III. ....	76
SERVICIOS REALIZADO EN ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.....	76
3.1 PRESENTACIÓN.....	77
3.2 SERVICIO ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.....	78
3.2.1 Objetivos.....	78
3.2.2 Metodología.....	78
3.3 SERVICIO II APOYO TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO AL PROYECTO FODECYT 01-2007, TITULADO “DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE OOMYCETOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE EXPORTACIÓN EN LA REGIÓN CENTRAL DE GUATEMALA” USAC-UPV.....	82
3.4 REFERENCIAS BIBIOGRAFICAS.....	85
3.5 ANEXOS.....	86

### INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1: Equipo de laboratorio C-15, CDP-FAUSAC.....	5
Cuadro 2: Equipo de laboratorio C-2.....	6
Cuadro 3: Equipo de laboratorio C-27.....	6
Cuadro 4: Análisis FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas).....	8
Cuadro 5: Cantidad de reactivos utilizados en el proceso de PCR.....	43
Cuadro 6: Programa de PCR para los cebadores (GTG)5 y (GT)7.....	44
Cuadro 7: Programa de PCR para los Cebadores (TCG)5 y (CGA)5.....	44
Cuadro 8: Programa de PCR para el Cebador (CA)7.....	45
Cuadro 9: Programa de PCR para el Cebador (CCA)7.....	45
Cuadro 10: Programa de PCR para el Cebador (AG)7.....	46
Cuadro 11: Áreas Muestreadas con presencia de <i>Phytophthora capsici</i> , coordenadas latitud-longitud y numeración correlativa.....	53
Cuadro 12: cebadores utilizados para la secuenciación y las temperaturas utilizados para la reacción de sus ciclos o fases.....	61
Cuadro 13: Listado de muestras que resultaron positivos en la prueba de patogenicidad realizada en el laboratorio de Fitopatología.....	65

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 14: Listado de muestras que resultaron negativas en la prueba de patogenicidad realizada en el laboratorio de Fitopatología. ....	66

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1: Esporangio de tipo papilado característico de <i>Phytophthora capsici</i> . Con presencia de hifas ramificadas .....	15
Figura 2: Formación reproductiva en <i>Phytophthora</i> : A: Esporangio. B: Zoospora. C: Clamidospora. D: Oospora. Fuente: Agrios .....	16
Figura 3: Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla. Fuente P. Rodríguez .....	19
Figura 4: Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. ....	20
Figura 5: Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima, (72°C).....	20
Figura 6: Mapa del departamento de Jutiapa. ....	26
Figura 7: Mapa del departamento de Baja Verapaz. ....	29
Figura 8: Puntos de depresión en parcelas de chile pimiento. ....	32
Figura 9: A. Plantación de chile pimiento con síntomas de marchitez. B. Identificación de la muestra colectada en bolsa plástica y toma de coordenadas. ....	33
Figura 10: Selección del material. Recuperando el suelo adyacente a las raíces para el aislamiento.....	34
Figura 11: Método cultivo trampa para aislamiento de <i>Phytophthora capsici</i> . A. Desinfección de la manzana; B. Perforaciones en distintas partes de la manzana; C. Suelo para inocular con <i>Phytophthora capsici</i> ; D. Se le agrega agua destilada a cada uno de las perforaciones; E. Se sellan las perforaciones de la manzana inoculada con cinta adhesiva; D Se identifica y se deja a temperatura ambiente. ....	36
Figura 12: Forma de distribución en pequeñas fracciones de manzana en medio selectivo. ....	37
Figura 13: A. Solución de suelo estéril; B. Semilla de manzana con micelio. ....	38
Figura 14: Especificación pictográfica de las características de crecimiento para identificar especies de <i>Phytophthora</i> desarrolladas en medio PDA según Erwin y Riveiro. ....	39
Figura 15: Conservación de los aislados de <i>P. capsici</i> , proveniente de las 32 cepas aisladas. Contenidos en tubo plástico medio V-8 y aceite mineral. ....	40
Figura 16: A. Llenado de tubos con ADN, con la ayuda de una micropipeta. B. colocación en el termociclador. ....	43

Figura 17: A. Se cargó con ADN, los espacios vacíos en el gel. B. Se retiró el gel de agarosa del transiluminador de UV se observa las bandas de ADN.....	47
Figura 18: A. Preparación de la bandeja pilonera B. Siembra de semillas de chile pimiento.....	49
Figura 19: Plántulas de chile pimiento para ser inoculadas con cepas de <i>P. capsici</i> .....	49
Figura 20: A. Llenado de maceta con sustrato estéril lista para ser inoculado, B. Placa con medio V-8, cortados en pequeños fragmentos. C. Inoculación de cada cepa de <i>Phytophthora</i> . B. Forma de distribución. ....	50
Figura 21: A. Siembra de 10 plántulas en cada maceta. B. Prueba de patogenicidad de cepas de <i>Phytophthora capsici</i> .....	51
Figura 22: Zona productora de chile pimiento Laguna de Retana, (Jutiapa).....	52
Figura 23: Uno de los sitios muestreados bajo invernadero en la comunidad San Juan, Salamá, Baja Verapaz. ....	52
Figura 24: Mapa de localización con presencia de <i>Phytophthora capsici</i> , en la Laguna de Retana, (Jutiapa). ....	54
Figura 25: Mapa de localización con presencia de <i>Phytophthora capsici</i> , en el municipio de Salamá Departamento de Baja Verapaz. ....	55
Figura 26: Síntoma ocasionado por <i>P. capsici</i> en plantas de chile pimiento <i>Capsicum annuum</i> en la Laguna de Retana Jutiapa.....	56
Figura 27: Presencia de micelio dentro del fruto de chile pimiento en la Laguna de Retana Jutiapa. ....	57
Figura 28: Pudrición de raíces, sistema radicular poco desarrollado, en chile pimiento en la Laguna de Retana.....	57
Figura 29: Marchitamiento de plantas de chile pimiento bajo invernadero en la comunidad San Juan, Salamá, Baja Verapaz. ....	58
Figura 30: Sintomatología del daño causado en la base del tallo por la presencia de <i>Phytophthora capsici</i> , observada durante los muestreos.....	58
Figura 31: Cepa desarrollada con <i>P. capsici</i> , en medio de cultivo PDA.....	59
Figura 32: Cepa desarrollada con <i>P. capsici</i> , en medio de cultivo Agar V-8 para esporulación. ....	59
Figura 33: A. Esporangios aislado de las cepas de San Juan, Salamá, B. Esporangios aislados de las cepas de La Laguna de Retana, Jutiapa. ....	60
Figura 34: Gel de agarosa, mostrando resultado de electroforesis, producto de PCR, carril PM corresponde al marcador de peso y las bandas en los carriles 1-32 corresponden a la amplificación usando el cebador GTG.....	62
Figura 35: Gel de agarosa, mostrando resultado de electroforesis, producto de PCR, carril PM corresponde al marcador de peso y las bandas en los carriles 1-32 corresponden a la amplificación usando el cebador TCG.....	62
Figura 36: Gel de agarosa, mostrando resultado de electroforesis, producto de PCR, carril PM corresponde al marcador de peso y las bandas en los carriles 1-32 corresponden a la amplificación usando el cebador CGA. ....	62

- Figura 37: Dendograma obtenida del análisis de bandas amplificadas con cebadores de Microsatélites con genoma de *P. capsici* aislado de plantas de chile pimiento. .... 63
- Figura 38: Al lado izquierdo de las figuras se observa el daño causado por..... *Phytophthora capsici*, en las plantas inoculadas. Figura A. poco desarrollo de la planta, muestra proveniente de la Laguna de Retana, Jutiapa, Figuras B, C, D, poco desarrollo radicular, marchitamiento de la planta, muestra proveniente de la comunidad San Juan, Salamá, Baja Verapaz. A la derecha plantas testigos. .... 67
- Figura 39: Efecto del daño ocasionado por *Phytophthora capsici*. A. Muerte total de la planta, colectado en la Laguna de Retana, B. Ausencia de las plantas en la maceta, colectada en San Juan, Salamá. C. y D. ausencia y marchitamiento de la planta, colectada en La Paz, Salamá. .... 68
- Figura 40: capacitación a grupo de agricultores de la comunidad a cargo de Ingenieros, Auxiliar de cátedra y estudiante de EPS. .... 86

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE PIMIENTO *Capsicum annum*, EN LAS REGIONES DE SALAMÁ BAJA VERAPAZ Y LAGUNA DE RETANA, JUTIAPA Y ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.**

**RESUMEN GENERAL**

El presente informe integrado es parte del trabajo de graduación, se especifican los contenidos de las tres fases del Ejercicio Profesional Supervisado (EPSA), las cuales fueron: Diagnóstico, Investigación y Servicios. Esta actividad se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico Parasitológico, Sub-área de Protección de Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (CDP-FAUSAC).

El primer capítulo fue la realización del diagnóstico del CDP-USAC en función de evaluar a detalle el funcionamiento general de las condiciones que un laboratorio de diagnóstico debe reunir según normas internacionalmente aceptadas todo ello se llevó a cabo durante el periodo de ejecución del EPS, agosto del 2,008 a octubre del 2,009.

El segundo capítulo fue la realización de la investigación en dos zonas de producción de chile pimiento, en La Laguna de Retana, Jutiapa y Salamá, Baja Verapaz, la investigación tuvo como finalidad, la Caracterización molecular y diagnóstico patológico de *Phytophthora capsici* L. Los resultados fueron el aislamiento de 32 cepas en donde se demuestra la diversidad genética que existe dentro de la población bajo estudio.

En el capítulo tres se describen los servicios prestados en el Centro de Diagnostico Parasitológico la cual incluye: servicio de asistencia técnica a productores en protección vegetal en el municipio de San Juan Comalapa departamento de Chimaltenango que es parte de la extensión universitaria. Así como el apoyo técnico y administrativo al proyecto FODECYT 01-2007 denominado “Detección y caracterización de especies de Oomycetes asociados a cultivos de exportación en la región central de Guatemala”, uno de los componentes fue obtener un listado general de lugares con cultivos de exportación y agente causantes de pérdidas económicas.

## **CAPÍTULO I.**

**DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE  
GUATEMALA**

## 1.1 Presentación

El trabajo realizado para la investigación agrícola en aspectos de diagnóstico de enfermedades causadas por hongos, nematodos, bacterias, artrópodos y malezas. En el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (CDP-FAUSAC) es un aporte a la solución de la problemática nacional relacionado a esa rama de estudio de la Agronomía.

El Centro de Diagnóstico Parasitológico es una entidad de servicio que obedece a un programa de la Facultad de Agronomía para prestar asistencia al sector dedicado a la producción agrícola y forestal en Guatemala y así cooperar con la actividad productiva.

El diagnóstico consistió en presentar las condiciones y estructura administrativa del CDP-FAUSAC durante el período de ejecución de EPS.

Dentro de los servicios que ofrece el CDP se encuentra, análisis de laboratorio, manejo integrado de plagas, manejo integrado de cultivos, entre otros. Se enfatiza que es una institución que puede ampliar sus expectativas en cuanto a prestación de servicios, siendo su personal altamente calificado el mejor recurso con que cuenta y dentro de la misión de la facultad de Agronomía estipula que: Contribuye con el desarrollo nacional y regional generando servicios de excelencia por medio de sus programas de investigación y extensión.

## **1.2 Marco Referencial**

### **1.2.1 Ubicación**

El Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la de San Carlos de Guatemala se encuentra ubicada en la ciudad Universitaria, zona 12, Ciudad de Guatemala, edificio T-8 tercer nivel laboratorios C-2, C-15, C-26 y C-27.

La prestación de servicios inicia en el año 1989, siendo aprobado oficialmente en 1990, según los artículos de la propuesta de prestación de servicios educativos, científicos y tecnológicos y por la Junta Directiva de la Facultad de Agronomía en la Resolución No. 735-96, punto sexto del acta 46-96, con la finalidad de proyectar las actividades investigativas de la Universidad hacia la sociedad que necesita el apoyo técnico y científico para mejorar sus actividades, así como colaborar con los procesos académicos y la generación de recursos para su auto desempeño.

### **1.2.2 Infraestructura**

Cuenta con varios laboratorios para el desarrollo de cada actividad, tomando en cuenta que estas áreas están designadas también para docencia universitaria.

En el Laboratorio C-15 se encuentra el área de recepción de muestras, y se realiza el procesamiento preliminar de las mismas, así como la extracción de nematodos, esterilización de cristalería y medios de cultivo así como la entrega de resultados.

En el Laboratorio C-2 que cuenta con dos áreas: una en donde se encuentra el equipo óptico de mayor precisión, específicamente estereoscopios y microscopios, aquí es donde se realizan las observaciones y determinación de los agentes patogénicos por medio de la observaciones microscópica, otra área independiente, en donde está ubicada la campana de flujo laminar, para llevar realizar llenado de medios de cultivo, siembras y aislamientos de especímenes de interés.



En el Laboratorio C-26 se llevan a cabo los diagnósticos bacteriológicos. En esta área se halla una campana de flujo laminar, así como incubadoras, refrigeradores, ollas para esterilizar y licuadoras.

En el Laboratorio C-27, que también está designado para la labor docente, se encuentra el área de determinación y diagnóstico entomológico.

### **1.2.3 Recurso Humano**

Está conformado por profesores titulares y auxiliares de la Subárea de Protección de Plantas, así como del personal de laboratorio.

#### **• Diagnóstico de Hongos**

- Ing. Agr. Gustavo Álvarez Valenzuela
- Aux. de cátedra Ana Cristina Barrillas
- Estudiante EPS Soren Ramírez
- Técnico en Laboratorio Pedro Echeverría

#### **• Diagnóstico de Nematodos**

- Ing. Agr. Gustavo Álvarez Valenzuela
- Estudiante EPS Soren Ramírez
- Técnico en laboratorio Pedro Echeverría

#### **• Diagnóstico de Insectos**

- Ing. Agr. Samuel Córdova
- Ing. Agr. Álvaro Hernández
- Aux. de Mauricio Franco
- Técnico en laboratorio Lucrecia Pineda

### 1.2.4 Costos

El costo de cada análisis ejecutado es de Q75.00 y es realizado a empresas agrícolas, cooperativas, gremiales, asociaciones y agricultores individuales.

Los fondos acumulados por el pago de diagnósticos son propiedad de la Facultad de Agronomía, y se utilizan para recuperar el material y depreciación de equipo empleado, con un 20% para la USAC, 35% para la FAUSAC, 40% para el pago del técnico y 5% para gastos administrativos.

Estos fondos son administrados con un sistema privativo, empleando una cuenta a nombre del Centro de Diagnostico Parasitológico, para evitar trámites burocráticos que entorpecerían la adquisición de materiales y equipo utilizado y necesario para continuar la actividad.

### 1.2.5 Recursos físicos

Para la recepción de muestras, su procesamiento preliminar, extracción de nematodos y entrega de resultados, esterilización de cristalería y medios de cultivo, el laboratorio C-15 cuenta con el siguiente equipo y recursos descrito en el Cuadro 1.

**Cuadro 1:** Equipo de laboratorio C-15, CDP-FAUSAC.

CANTIDAD	EQUIPO
1	Cámara refrigerada para muestras vegetales
1	Autoclave
1	Destilador de agua
1	Horno para esterilización con calor seco
1	Horno de microondas
1	Cámara nebulizadora para extracción de nematodos
2	Refrigeradoras
1	Incubadora
1	Centrifugadora
1	Pesa monoplato
3	Computadoras
	Cristalería: matraces, beakers, erlenmeyer, tubos de ensayo, de diversas capacidades, cajas de Petri, vidrios de reloj e instrumental de laboratorio y accesorios, como mecheros, pinzas, embudos, etc.

En cuanto a análisis fitopatológicos y de nematodos se refiere, así como para el aislamiento y purificación de colonias de especímenes de interés, se cuenta con el equipo siguiente en el laboratorio C-2:

**Cuadro 2:** Equipo de laboratorio C-2.

<b>CANTIDAD</b>	<b>EQUIPO</b>
3	Microscopios de investigación
2	Estereoscopios de investigación
2	Incubadoras
1	Refrigerador
1	Campana de flujo laminar
	Cristalerías: beakers, mecheros, cajas de Petri, tubos de ensayo, cubre objetos, porta objetos etc.

Para el diagnóstico entomológico, el laboratorio C-27 cuenta con el siguiente equipo

**Cuadro 3:** Equipo de laboratorio C-27

<b>CANTIDAD</b>	<b>EQUIPO</b>
2	Microscopios de investigación
2	Estereoscopios de investigación
1	Equipo de computo con impresora
1	Refrigerador
	Cristalería variada, instrumental de laboratorio y accesorio.

### **Medios de cultivo y reactivos.**

Como parte de las actividades realizadas para la ejecución del diagnóstico, se utilizan en diversidad de reactivos inorgánicos y reactivos orgánicos: sales, ácidos, azúcares, extractos de origen animal y vegetal, colorantes, alcoholes, gelatinas, medios de cultivo generales, semiselectivos y selectivos, etc.

### **1.3 OBJETIVOS**

Determinar y priorizar los principales problemas existentes en el Centro de Diagnóstico de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Determinar las fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas del Centro de Diagnostico.

Definir las áreas específicas de trabajo con que cuenta el Centro de Diagnóstico, en base a las actividades desempeñadas.

### **1.4 METODOLOGÍA**

Para determinar la situación general del Centro de Diagnostico durante el Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) se definieron 2 aspectos:

- Obtención de información acerca del funcionamiento, puntos críticos y aspectos positivos del Centro de Diagnostico, a través de entrevistas personales con los técnicos de laboratorio, así como profesores y auxiliares, quienes son los directamente vinculados a las actividades allí realizadas.
- Actualización del inventario del equipo y reactivos del Centro de Diagnostico, durante el periodo de ejecución del EPS.

Durante las entrevistas se requirió tanto de la opinión, aportes y datos que pudieran ser útiles para el diagnóstico, en cuanto al servicio que se presta, y con esa base establecer las fortalezas y debilidades.

### **1.5 RESULTADOS**

Como parte del proceso de diagnóstico se realizaron entrevistas personales con los miembros del Centro de Diagnostico directamente involucrados con su funcionamiento operativo, es decir, con técnicos de laboratorio, auxiliares y profesores.

A través de esas entrevistas se reunió información pertinente a los aspectos positivos así como los que en algún momento representan puntos críticos en cuanto al cumplimiento de las funciones de esta entidad.

**Cuadro 4:** Análisis FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas).

<b>FORTALEZAS</b>	<b>OPORTUNIDADES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Realiza una actividad totalmente de servicio</li> <li>➤ Cuenta con profesionales calificados.</li> <li>➤ Infraestructura adecuada.</li> <li>➤ Respaldo institucional.</li> <li>➤ Manejo presupuesto propio.</li> <li>➤ Centro de referencia nacional.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Oportunidad de crecimiento.</li> <li>➤ Puede dar asesoría técnica; pequeños y grandes productores, profesionales e instituciones.</li> <li>➤ Cobertura de proyectos de investigación a nivel nacional e internacional.</li> <li>➤ Expandirse a los centros regionales.</li> </ul>
<b>DEBILIDADES</b>	<b>AMENAZAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ No posee equipo especializado para diagnóstico de enfermedades causadas por virus.</li> <li>➤ No se realiza la suficiente labor de divulgación de las actividades y servicios.</li> <li>➤ Incompatibilidades en el equipo de trabajo.</li> <li>➤ Instalaciones USAC puede ser cerrada por diferentes motivos, feriados, asuetos, fenómenos políticos internos y externos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fenómenos políticos.</li> <li>➤ Otras instituciones privadas prestan los mismos servicios.</li> <li>➤ Mayor divulgación de otros centros privados.</li> <li>➤ Otras instituciones cuentan con equipos más especializados para el análisis y diagnóstico.</li> </ul>

## 1.6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El Centro de Diagnostico Parasitológico realiza diagnostico de enfermedades causado por hongos, bacterias, nematodos y para ello cuenta con personal calificado e instalaciones para el análisis.

- Tomando en cuenta la información recabada en el análisis FODA, realizado para diagnosticar problemas en el CDP, abarcó una gama amplia de aspectos administrativos, organizacionales y académicos. Esto permitió que la información generada fuera dirigida a describir la situación actual del Laboratorio de manera integral.
- Se identificaron cuatro problemas principales, entre los cuales se encuentra la interrupción de actividades normales por motivo de manifestaciones políticas internos y externos. Poca divulgación del Centro de Diagnostico, e incompatibilidad en el equipo de trabajo.
- Se recomienda la capacitación constante del personal de apoyo del Centro Diagnostico Parasitológico, para que preste un mejor servicio y amplíe las expectativas de la institución.
- Compilar todos los manuales de procedimientos del laboratorio, así como los protocolos específicos y manuales de buenas prácticas de laboratorio, e implementarlos en todas las especialidades.

## 1.7 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrera, A. 1996. Sistemas de Documentación para Laboratorios Farmacéuticos. Guatemala, Editorial Universitaria. 182 p.
2. FAO, IT. 2006. Normas internacionales para medidas fitosanitarias: directrices para vigilancia. Roma, Italia, FAO, Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. 11 p.
3. Porta, B. 2009. Diagnóstico de *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. asociados a pudriciones radiculares y de tallo en hortalizas de exportación en el departamento de Chimaltenango. Tesis Inga. Agra. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 160 p.
4. Reyes, L. 2008. Prospección de enfermedades de raíces y tallos en el cultivo de flores de corte en San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis Inga. Agra. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 132 p.

## **CAPÍTULO II.**

**INVESTIGACIÓN. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE PIMIENTO *Capsicum annuum*, EN LAS REGIONES DE SALAMÁ BAJA VERAPAZ Y LAGUNA DE RETANA JUTIAPA.**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PATHOLOGICAL DIAGNOSIS OF *Phytophthora capsici* L. ON CHILLI PEPPER *Capsicum annuum*, AT THE REGIONS OF SALAMÁ, BAJA VERAPAZ AND LAGUNA DE RETANA, JUTIAPA.**



## 2.1 PRESENTACIÓN

El incremento de la demanda de chile pimiento *Capsicum annuum* L. en Guatemala hace que la especie sea de importancia en el sector hortícola con cerca de 5,000 Hectáreas cultivadas al año, las cuales se concentran en las mayores zonas productoras, que son el Progreso, Jutiapa y Salamá Baja Verapaz (9).

El estudio se llevó a cabo en dos regiones, la primera conocida como: la Laguna de Retana, Jutiapa y la segunda en Salamá, Baja Verapaz, en las aldeas de San Nicolás, La Paz y San Juan Cachil. Estas zonas son de mayor importancia, donde se cultiva chile pimiento.

En las regiones antes mencionadas, *Phytophthora capsici* causa pérdidas totales o parciales en chile pimiento, ya que ataca en cualquier fase de desarrollo de la planta. El patógeno habita en el suelo y afecta raíces, tallo y fruto.

El estudio consistió en aislar cepas de *Phytophthora capsici* en chile pimiento, además de realizar un diagnóstico patológico y la caracterización molecular a través del uso de marcadores moleculares tipo microsatélites.

Las 32 cepas aisladas se sometieron a pruebas de patogenicidad. De las que se obtuvo como resultado 17 inóculos positivos, de los cuales 6 pertenecen al área de la Laguna de Retana, Jutiapa y 11 a las comunidades de Salamá, Baja Verapaz.

Para la caracterización molecular se usaron los cebadores (GTG)5, (TCG)5, (CA)7, (AG)7 y (CCA)5. Ya que estos son específicos para *Phytophthoras*. Utilizando marcadores moleculares tipo microsatélites. El análisis confirmó la presencia de *Phytophthora capsici*, y que existe gran diversidad genética en la población en estudio.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 MARCO CONCEPTUAL

#### 2.2.1.1 El género *Phytophthora*.

##### A. Descripción

El género *Phytophthora* (del griego Phyton: planta; Phtheiro: destructor) fue creado por de Bary en 1876 (1)

En el cultivo de chile, la incidencia de la enfermedad de la marchitez es causada *Phytophthora capsici* Leo., constituye a nivel mundial uno de los principales problemas que afectan la productividad del cultivo. Se estima que el efecto de esta enfermedad disminuye la densidad de plantación (12).

*Phytophthora capsici* habita en el suelo y afecta principalmente las raíces y la base del tallo de la planta, aunque también puede atacar las partes aéreas. Los síntomas iniciales son necrosamiento y pudrición de raíces secundarias y terciarias que son las que se encargan de la absorción de agua, luego se presenta la marchitez de plantas y posteriormente pudrición de frutos. La muerte de la planta es ocasionada por el avance del hongo a través del pedúnculo del fruto, ramas y tallo (12).

Bajo condiciones favorables de temperatura entre 25 a 28 °C y alta humedad en el suelo, *P. capsici* es sumamente agresivo, capaz de destruir campos enteros de los hospedantes mencionados en corto tiempo. Sobrevive de un ciclo a otro en el suelo en forma de oosporas (12).

##### B. Clasificación Taxonómica

PHYLUM	Oomycota
ORDEN	Peronosporales
GENERO	<i>Phytophthora</i>
ESPECIE	<i>Phytophthora capsici</i> Leo. (8).

El phylum Oomycota, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos poseen dos flagelos en las zoosporas y los gametos masculinos con paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia del agua (12).

Los oomycetos están más relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Son organismos que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente (12).

La mayoría de las especies de Oomycetes se reproducen sexual y asexualmente: la reproducción asexual es por medio de las zoosporas móviles cuyos flagelos son característicos y distintivos de las especies. La reproducción sexual es oogámica. El gameto femenino (oogonio) es relativamente grande, en forma de huevo no flagelado y es fecundado por el gameto masculino (anteridio) que es notablemente más pequeño y flagelado (12).

### **C. Morfología**

La determinación de algunas especies de *Phytophthora*, parece ser relativamente simple, pero las diferencias morfológicas con otras especies del mismo género son tan pequeñas y algunas características tan variables, que incluso los expertos consideran que el género es difícil de clasificar, más aún para los que no están relacionadas con la taxonomía de este grupo. Razón, es necesario acudir a las técnicas de patrones isoenzimáticos y RFLPs de DNA nuclear mitocondrial, para diferenciar las especies (12).

Erwin y Ribeiro (1996), estableció una primera clave para separar 11 especies de *Phytophthora*, utilizando características como el tipo de anteridio, la prominencia de las papilas sobre el esporangio, el tamaño y la relación longitud y ancho del esporangio, la presencia y tamaño de las clamidosporas y el tamaño y abundancia de las oosporas: El tamaño de los esporangios no parece ser relevante, dado que éste varía con las condiciones de crecimiento (12).

Las estructuras somáticas (talos) está conformado por micelio y están compuestos hifas ramificados y cenocíticos (no septados), excepto en cultivos viejos, en los cuales algunas veces se pueden observar septas. En cultivos jóvenes, el citoplasma fluye libremente dentro del micelio (12).

Las hifas se ramifican en ángulos aproximados de 90 grados y algunas veces se constriñen en la base. Aunque hay especies que tienen patrones de micelio característicos, éstos no son lo suficientemente útiles para diferenciar especies; como tampoco lo son el crecimiento y la forma de la colonia y el hinchamiento de las hifas (9).

Las esporangiosporas son esporas asexuales que se crecen sobre pedúnculos llamados esporangióforos, los cuales difieren ligeramente de las hifas vegetativas, su desarrollo es indeterminado y se ramifican simpodialmente, lo cual es propio de *Phytophthora infestans*. Los esporangios se diferencian porque en *Phytophthora* cada uno tiene un pedúnculo, cuya longitud varía con la especie, en rangos de medio a corto como en *P. infestans*, en el cual pueden liberar hasta 36 zoosporas.

El engrosamiento apical sobre el esporangio, el cual tiene forma de limón, se denomina papila, de cuyo extremo emergen las esporangiosporas móviles denominadas zoosporas (12).



**Figura 1:** Esporangio de tipo papilado característico de *Phytophthora capsici*. Con presencia de hifas ramificadas

Fuente M. Cúndom y M. Cabrera

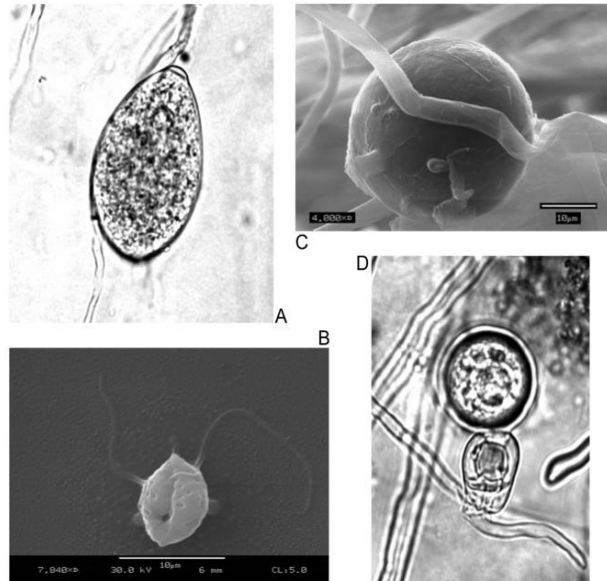
Las zoosporas presentan dos flagelos uno en forma de látigo y el otro en forma de pincel. La zoospora está conformada por varias partes: el kinetosoma (cuerpo basal de la

zoospora), la zona de transición que une el flagelo con el kinetosoma, y el sistema del microtúbulo, que permite anclar el flagelo a la zoospora (12).

#### D. Reproducción

Los procesos sexuales involucran la producción del oogonio y el anteridio, los cuales surgen de las puntas del micelio que se contactan. Si el oogonio crece sobre el anteridio, éste se denomina anfiginio y si el anteridio rodea al oogonio, en su parte basal cerca al pedicelo, se conoce como paraginio (12).

#### F. Ciclo de vida de *phytophthora spp.*



**Figura 2.** Formación reproductiva en *Phytophthora*: **A:** Esporangio. **B:** Zoospora. **C:** Clamidospora. **D:** Oospora. **Fuente:** Agrios

#### G. Diversidad genética

Los genes son las unidades físicas y funcionales del material hereditario que determina un carácter específico de un miembro de cualquier especie y que se transmite de generación en generación. Es decir, cada gen posee información sobre una o varias características físicas y funciones reguladoras. Sin embargo, los genes de los diferentes miembros de una misma especie no son copias exactas, sino que estos pueden poseer genes distintos, lo que da origen la diversidad genética.

La diversidad genética es la variación que existe entre los individuos de todas las especies de la tierra y es una de las formas de la diversidad biológica. Se refiere a la variación en la composición de la información genética o unidades hereditarias (genes) contenida en todas las especies vivientes, encontradas en un área específica y que pueden reproducirse entre sí a través del tiempo.

## **H. Niveles de la diversidad genética**

### **1) Diversidad entre las poblaciones reproductivas**

Ésta se da entre los individuos de una población, ya que no siempre los individuos de una misma especie son exactamente iguales. Tal es el caso del ser humano, como otras especies, presenta variabilidad para un determinado número de caracteres, tanto anatómicos como fisiológicos (color y tipo de ojos, de piel y tipo de cabello).

### **2) Diversidad entre las especies**

Ésta se presenta entre los organismos de una misma especie, que poseen un determinado acervo genético, conocido también como “pool genético”.

#### **Técnicas moleculares para diferenciar especies**

La adaptación de la tecnología de biología molecular, se ha constituido en una herramienta importante para confirmar la validez de las especies determinadas utilizando características morfológicas porque permiten detectar posibles diferencias genéticas que se desarrollan por la evolución relativamente rápida del patógeno, debido a la eficacia patogénica en muchos huéspedes, que en ocasiones no son acompañadas de cambios morfológicos (12).

## **I. Marcadores moleculares**

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (19).

Con la llegada de las técnicas modernas de la biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel del ADN.

Un marcador molecular recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana (12).

#### **J. Ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos:**

Entre las principales ventajas de los marcadores moleculares descritas por Ferreira y Grattapaglia (1998).

El nivel de polimorfismo de los marcadores moleculares es generalmente alto para cada locus estudiado facilitando la construcción de mapas genéticos. A diferencia del mucho esfuerzo y planificación que son necesarios para construir mapas genéticos a partir de marcadores morfológicos, puesto que el número reducido de marcadores restringe la cobertura total del genoma. El limitado polimorfismo que presentan estos marcadores, generalmente hace que el investigador deba recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamientos genéticos (12).

Pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo de la planta. Mientras que los marcadores morfológicos presentan la desventaja de ser identificados, en su mayoría, solamente a nivel de planta entera o adulta (12).

#### **K. Técnica PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction) Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Puede ser, por ejemplo, ADN nuclear total (16).

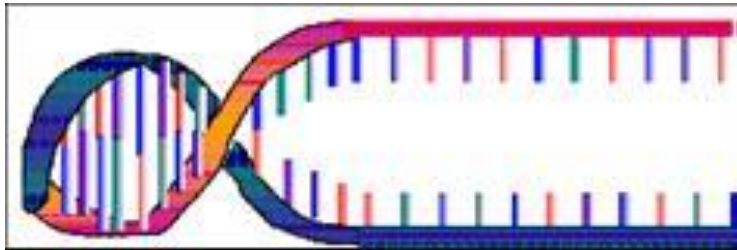
El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos de temperaturas (16).

### 1) Las etapas de un ciclo de reacción

Tres son los pasos a seguir y a repetir por cada ciclo de la PCR. A éstos comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión. Si de trabajar con ADN genómico se trata, regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización a 94°C, para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos. Después de concluida ésta, se repiten los diferentes ciclos en los que tanto la temperatura como el tiempo serán específicos del producto a amplificar y del origen del ácido nucleico que servirá, como ya se mencionó, de plantilla o molde a copiar por la polimerasa utilizada (15).

### 2) Desnaturalización

El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen.



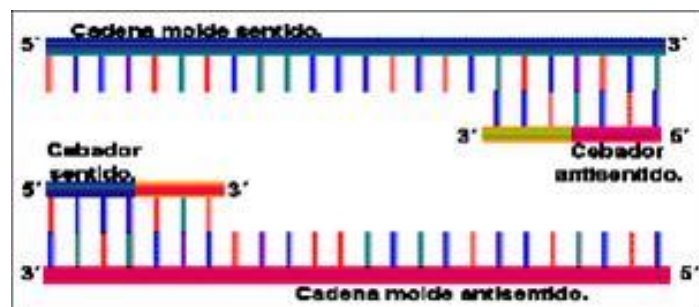
**Figura 3.** Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla. Fuente P. Rodríguez

Ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo (15).



### 3) Alineamiento

El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas. Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde (15).

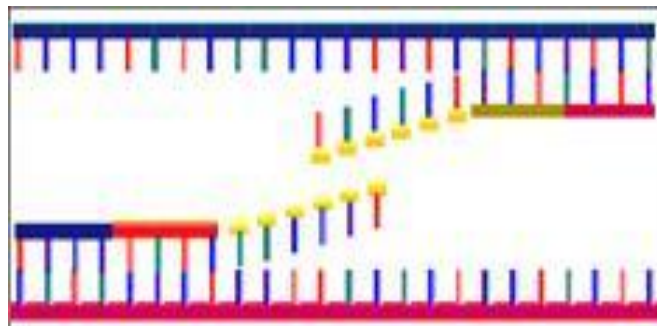


**Figura 4.** Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno.

Fuente P. Rodríguez.

### 4) Extensión

Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, en dirección 5'→3'. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores (15).



**Figura 5.** Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima, (72°C).

Fuente P. Rodríguez.

## 5) **Microsatélites**

Los microsatélites o SSRs, iniciales de su nombre en inglés (Simple Sequence Repeats), son secuencias cortas de DNA, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas cierto número de veces y que se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (22).

Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (22).

## 6) **Características**

La razón principal del incremento del uso de los SSRs como una herramienta molecular es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o PIC (Polymorphic Information Content) en comparación con otras técnicas como RFLPs y RAPDs. Poseen, además, muy valiosos atributos que incluyen:

- Ser altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
- Ser técnicamente simples: la tecnología del PCR puede fácilmente y rápidamente ser utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.
- Ser una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de DNA son requeridas.
- Ser analíticamente simples: los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles.
- Ser muy abundantes: los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kbp.
- Ser ampliamente aplicables: los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros, y
- Ser de fácil intercambio de datos entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los iniciadores (22).

## 7) Electroforesis en gel de agarosa

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleico...) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones (11).

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (22).

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 grados C y formar un gel, semisólido al enfriarse.

### 2.2.1.2 Chile pimiento (*Capsicum annuum* L.)

#### A. Taxonomía y morfología

REINO	Plantae
PHYLUM	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Solanales
FAMILIA	Solanaceae
GÉNERO	<i>Capsicum</i>
ESPECIE	<i>Capsicum annuum</i> L. (2)

**B. Origen:** en un estudio citogenética Barbará Pickersgill (1971) estableció que el *Capsicum annuum*, se desarrolló de material ancestral con un karotipo asociado con plantas del sur de México y Guatemala. Las especies domesticadas evolucionaron de diferentes especies espontáneas.

**C. Planta:** herbácea perenne, con ciclo de cultivo anual de porte variable entre los 0,5 metros (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 metros (gran parte de los híbridos cultivados en invernadero) (9).

**D. Sistema radicular:** pivotante y profundo (dependiendo de la profundidad y textura del suelo), con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 centímetros y 1 metro (9).

**E. Tallo principal:** de crecimiento limitado y erecto. A partir de cierta altura (“cruz”) emite 2 ó 3 ramificaciones (dependiendo de la variedad) y continua ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo (los tallos secundarios se bifurcan después de brotar varias hojas, y así sucesivamente) (9).

**F. Hoja:** entera, lampiña y lanceolada, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro (liso y suave al tacto) y de color verde más o menos intenso (dependiendo de la variedad) y brillante. El nervio principal parte de la base de la hoja, como una prolongación del pecíolo, del mismo modo que las nervaciones secundarias que son pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto (9).

**G. Flor:** las flores aparecen solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y constan de una corola blanca. La polinización es autógena, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia que no supera el 10% (9).

**H. Fruto:** baya hueca, semicartilaginosa y deprimida, de color variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco); algunas variedades van pasando del verde al anaranjado y al rojo a medida que van madurando. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde escasos gramos hasta más de 500 gramos. Las semillas se encuentran insertas en una placenta cónica de disposición central. Son redondeadas, ligeramente reniformes, de color amarillo pálido y longitud variable entre 3 y 5 centímetros (9).

### **2.2.1.3 Postulados de Koch**

El año 1882 representa una fecha crucial en la historia de la microbiología y de la patología: el médico alemán Robert Koch, mediante estudios sobre la etiología de la tuberculosis, había sepultado la teoría espontánea de la vida o abiogénesis, según la cual los seres vivientes aparecían de repente en la materia orgánica.

#### **A. Postulados**

En su versión más sencilla, dichos postulados contemplan cuatro enunciados que, acompañados de la experimentación, ayudan a resolver la cuestión de la causa de las enfermedades (19).

- El microorganismo debe estar presente en todos los individuos con la misma enfermedad.
- El microorganismo debe ser recuperado del individuo enfermo y poder ser aislado en medio de cultivo.
- El microorganismo proveniente de ese cultivo debe causar la misma enfermedad cuando se inoculara a otro huésped.
- El individuo experimentalmente infectado debe contener el microorganismo (19).

## 2.2.2 MARCO REFERENCIAL

### A. Descripción del sitio experimental

La investigación de campo se realizó en las principales zonas de producción de chile pimiento siendo estas zonas: El Progreso, Jutiapa, Laguna de Retana y Salamá, específicamente en las aldeas: San Nicolás La Paz y San Juan Cachil (Baja Verapaz).

#### 1) Jutiapa

Cabecera	Jutiapa
Fecha de Fundación	1,852
Región	Región IV o Suroriental
Extensión Territorial	3,216 km <sup>2</sup>
Población	389,085 hab.
Temperatura	máxima 28 grados Mínima 15 grados
Altitud	906 msnm
Idioma	Español

El desarrollo de la agricultura en la región Sur Oriental de Guatemala ha evolucionado a pasos agigantados en los últimos 10 años, lo que ha significado el incremento en la producción agrícola, principalmente en los cultivos de tomate, chile pimiento, chile jalapeño y pepino, los cuales han contribuido al desarrollo económico de la zona principalmente en El Progreso, Jutiapa (20).

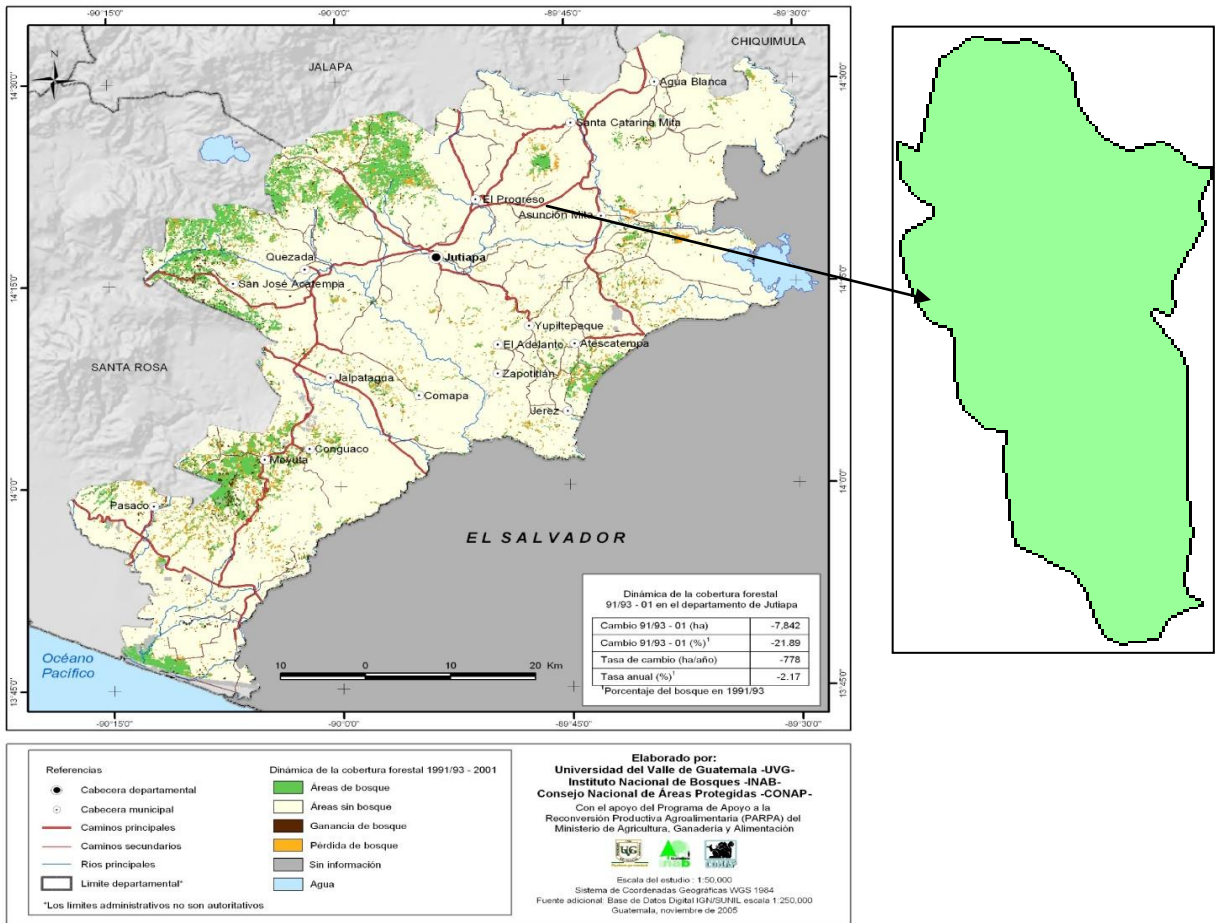


Figura 6. Mapa del departamento de Jutiapa.  
Fuente INAB

## 2) Salamá

Es una ciudad de Guatemala, perteneciente al departamento de Baja Verapaz. Es la cabecera del departamento (21).

Población:	31,818 habitantes aprox.
Región;	Región II o Norte
Extensión territorial:	776 km <sup>2</sup> .
Altura:	960 metros sobre el nivel del mar.
Distancia de la ciudad capital:	147 km.
Clima:	Templado
Idiomas:	Español y Achi

Importancia: está ubicada en el valle de Urrán. Su etimología es Tz'alam Ha', que significa en Quiche Río de Tablas o Tablas sobre el agua, y es la cabecera del departamento.

Grupo étnico

Conviven dos grupos étnicos: achi'es y ladinos.

Indígena	56.7%
No Indígena	43.3%

### a) Producción agrícola y ganadera

El municipio de Salamá se caracteriza por su potencial forestal, ganadero y agrícola, los productos básicos, además de satisfacer necesidades internas son comercializados en diferentes lugares del país, siendo los principales productos:

Productos Agrícolas: maíz, frijol, caña de azúcar, cítricos, tomate, chile pimiento, pepino, papaya, soya, café, plantas ornamentales y follajes. Maderas de diferentes clases como: cedro, nogal, caoba y pino

Ganado Vacuno.



**b) Topografía**

El mayor porcentaje de las tierras del municipio de Salamá son de topografía quebrada con pendientes hasta de un 50%.

**c) Condiciones climáticas**

Precipitación: 750mm anuales; Temperatura Media: 20.9° C, Temperatura Máxima: 38.9° C Temperaturas Mínima: 0.2° C; Humedad Relativa media del 70.9%; Los vientos predominantes son del Este y su velocidad media de 5.0Km/hora con máximos hasta de 29.5Km/hora. El número de horas de sol al año es de 2,333.3 promedio.

**d) Centros poblados**

1 Ciudad con nueve barrios.

71 caseríos

55 aldeas

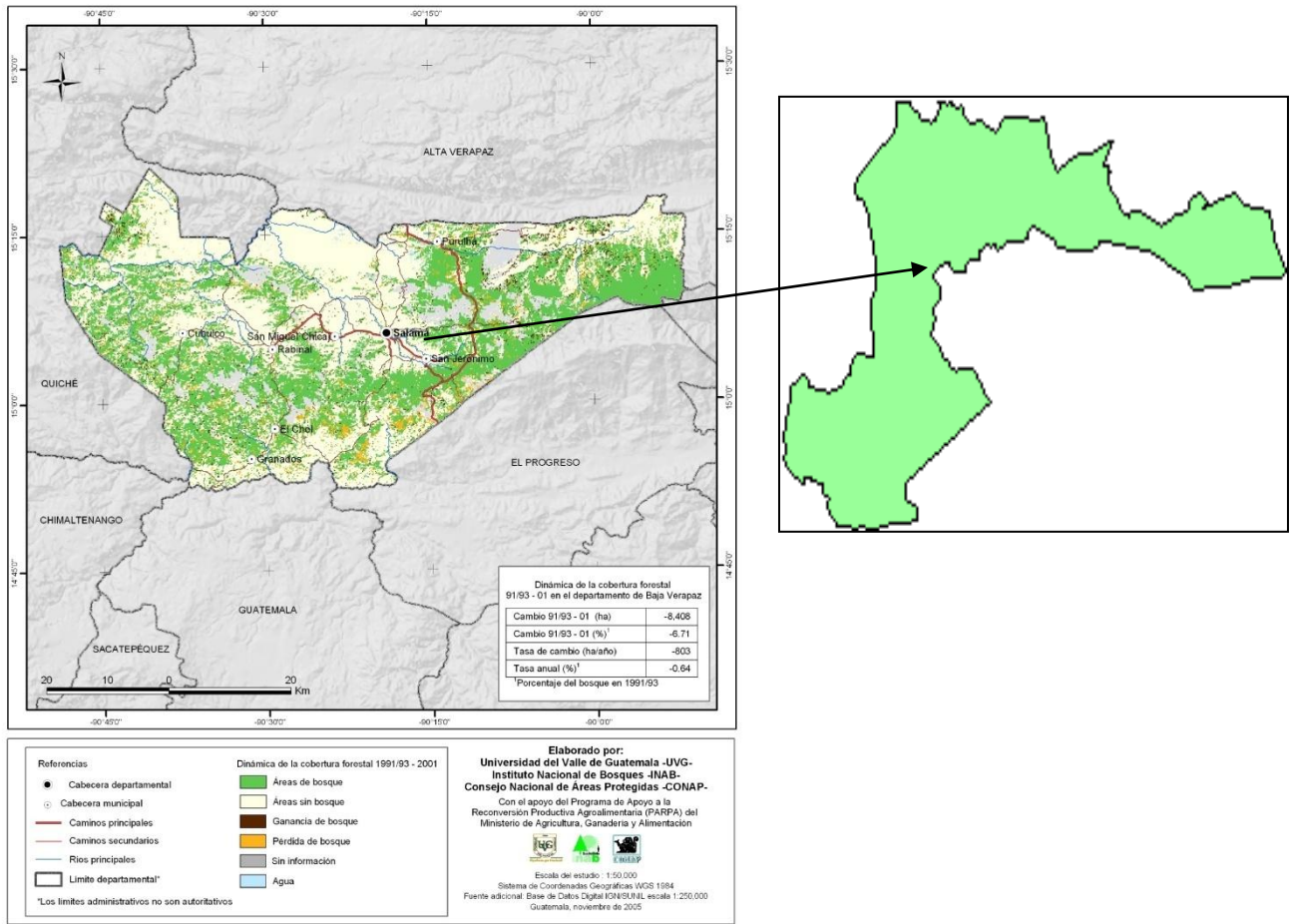


Figura 7. Mapa del departamento de Baja Verapaz.  
 Fuente INAB

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 ESPECÍFICOS

- a) Establecer la presencia de *Phytophthora capsici* en el cultivo de chile pimiento en los municipios de Salamá, Baja Verapaz y la Laguna de Retana, El Progreso, Jutiapa,.
  
- b) Estudiar la diversidad genética que existe en la población en estudio de *Phytophthora capsici*.

## 2.4 HIPÓTESIS

*Phytophthora capsici* es el agente causal de la marchitez del chile pimiento en las muestras colectadas en las dos zonas de producción: Laguna de Retana, El Progreso, Jutiapa y Salamá, Baja Verapaz, en las cuales se encuentran variaciones genéticas dentro de los individuos de la misma población

## 2.5 METODOLOGÍA

### 2.5.1 Trabajo de Campo

#### a) Población objetiva

El muestreo se enfocó a plantas de chile pimiento con síntomas de marchitez, pudrición de tallos y raíces. Las regiones bajo estudio fueron: Laguna de Retana, Jutiapa y Salamá, Baja Verapaz. Se consideró a estas zonas por ser de alta producción de Chile pimiento, *Capsicum annuum* L.

#### b) Toma de muestra

Se realizaron los recorridos en las parcelas para muestrear y a la vez observar plantas con marchitez y pudrición de tallo y raíz provocadas posiblemente por *Phytophthora capsici*. El muestreo que se llevo a cabo es no probabilístico ya que fue un muestreo a criterio.

El muestreo dirigido o a criterio se inicio con una inspección visual, en búsqueda de signos o síntomas antes mencionados y se trasladaron al laboratorio para su respectivo análisis.



**Figura 8.** Puntos de depresión en parcelas de chile pimiento.

### c) Obtención de muestra

El criterio utilizado para recolección de las muestras fue el que la planta presentará síntomas de marchitez o pudrición en el tallo o raíz, por tratarse de una enfermedad localizada. Para la obtención de las muestras se necesitó contar con un equipo mínimo de campo (bolsa plástica, pala, rastrillo, machete, marcador y otros).

*Phytophthora capsici* ataca el sistema radicular y parte del cuello basal del tallo. Por tratarse de patógeno localizado se tomó la muestra de toda la planta incluyendo rizósfera y suelo adyacente a profundidad no menor a 10 cm.

### d) Manejo de la muestra

- **Traslado del material enfermo al laboratorio**

El material recolectado se empacó en bolsas plásticas debidamente identificado, se colocaron en hielera para ser transportada al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, para realizar el proceso de aislamiento.

Simultáneamente a la toma de la muestra se localizaron las coordenadas del muestreo por medio de GPS (Sistema de Posicionamiento Geográfico) por sus siglas, para la realización del mapa y observación de la distribución de la enfermedad en la zona de muestreo.

Se tomaron fotografías en las zonas de muestreo para obtener la mayor cantidad de información y a la vez que contribuyó con el proceso de investigación.



**Figura 9. A.** Plantación de chile pimiento con síntomas de marchitez. **B.** Identificación de la muestra colectada en bolsa plástica y toma de coordenadas.



## 2.5.2 Fase de laboratorio

### a) Preparación de la muestra

En el laboratorio se procedió a recuperar el suelo adherido a las raíces, sobre papel periódico, que posteriormente sirvieron para la inoculación en cultivo trampa.

Se procedió a lavar las raíces con agua corriente para eliminar las partículas de suelos adheridas a la misma.

Una vez realizado el lavado de las raíces, éstas fueron secadas sobre papel adsorbente por espacio de 15 a 25 minutos aproximadamente.

Una vez eliminado el exceso de humedad se procedió a separar la raíz del tallo.

Se identificó las muestras con los mismos códigos obtenidos en el campo.



R. MIJANGOS

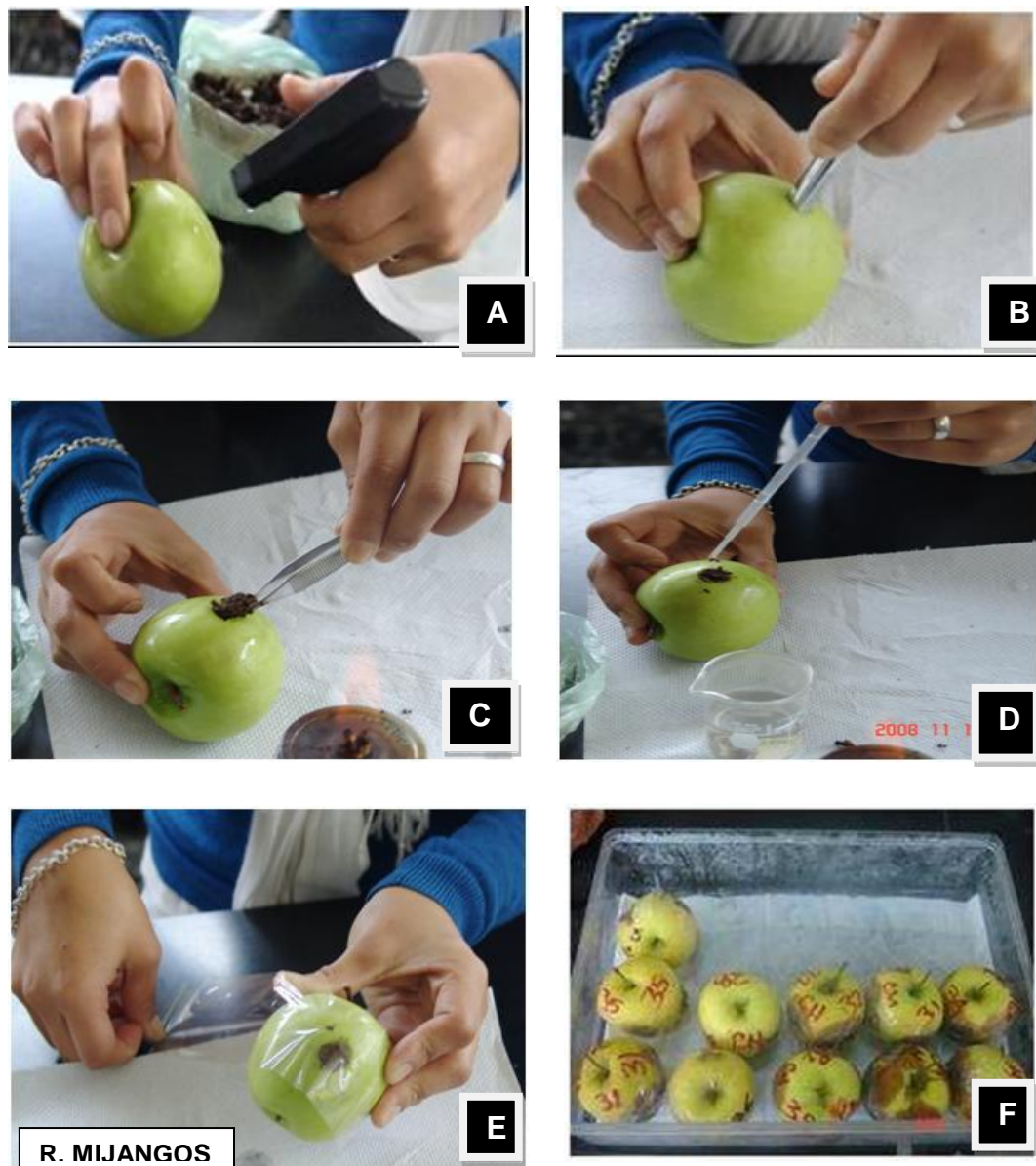
**Figura 10.** Selección del material. Recuperando el suelo adyacente a las raíces para el aislamiento.

**b) Aislamiento de *Phytophthora capsici*****➤ Cultivo trampa**

Del suelo recolectado de la rizósfera de cada muestra se procedió a la homogenización, para que la muestra fuera más representativa para el respectivo análisis.

- Se desinfecto la manzana con alcohol al 95% con la ayuda de un atomizador. (Figura 11A)
- Se utilizaron manzanas verdes a las cuales se les hicieron 4 perforaciones en distintas partes, a una profundidad de 1.5 cm, esta perforación se realizó con un sacabocado especial. (Figura 11B)
- Se agregaron aproximadamente de 5 a 10 gramos de suelo en cada una de las perforaciones. (Ver figura 11C)
- Se le agregó agua destilada aproximadamente de 1 a 2 cc a cada uno de las perforaciones esto se realizó con la ayuda de una pizeta. (Ver figura 11D)
- Las perforaciones fueron cubiertas con cinta adhesiva, y cada y una de las manzanas fue debidamente identificado con los mismos códigos del campo. (Ver figura 11E)
- Las manzanas se dejaron a temperatura ambiente por 72 horas hasta que formaron lesiones (pudrición), alrededor del área inoculada. (Ver figura 11D)





**Figura 11.** Método cultivo trampa para aislamiento de *Phytophthora capsici*. **A.** Desinfección de la manzana; **B.** Perforaciones en distintas partes de la manzana; **C.** Suelo para inocular con *Phytophthora capsici*; **D.** Se le agrega agua destilada a cada uno de las perforaciones; **E.** Se sellan las perforaciones de la manzana inoculada con cinta adhesiva; **F.** Se identifica y se deja a temperatura ambiente.

### c) Aislamiento en medio de cultivo selectivo

De las manzanas que resultaron con pudriciones de color marrón y una lesión firme se procedió a purificarlas con un medio selectivo PARPBH, siguiendo los siguientes pasos:

- Se desinfectó el área de trabajo así como los materiales a utilizar (navaja, pinzas, agujas disección y otros) con alcohol al 95%. Se utilizaron mecheros con alcohol al 95% con el propósito de trabajar con la mayor asepsia posible.
- Cada una de las manzanas que resultaron positivas se, partieron en cuatro porciones equitativas.
- En las lesiones observadas del tejido interno en las zonas de avance (parte sana y enferma) se tomaron porciones de aproximadamente 3 a 5 mm. el procedimiento se efectuó con la ayuda de bisturí, pinza o aguja de disección.
- Acto seguido se precedió a la siembra de 6 a 9 trozos de manzana en cajas plásticas petri conteniendo medio selectivo.
- De la siembra obtenida en cajas petri se dejó a temperatura ambiente en un periodo de 72 horas y se observó el crecimiento de las colonias.



**Figura 12.** Forma de distribución en pequeñas fracciones de manzana en medio selectivo.

#### **d) Siembra en solución de suelo**

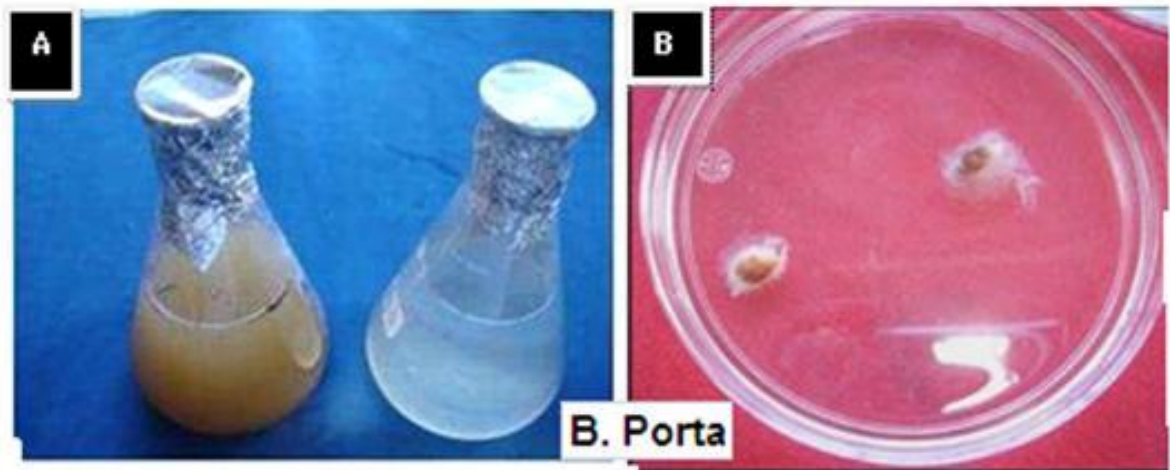
Esta técnica se utiliza para obtener estructuras reproductivas, como esporangios.

En un erlenmeyer de 1000 ml con agua destilada se diluyó 50 gr de suelo, se agitó y posteriormente se dejó reposar por 24 horas.

Transcurrido las 24 horas se procedió a extraer 50 ml de solución de suelo y se diluyó en 950 ml de agua destilada. Para ser esterilizado en la autoclave por 15 min a 125 °C (Ver Figura 13A).

En una caja petri se le agregaron de 5 a 8 ml de solución de suelo para introducir semillas de manzana cubierta con micelio y se dejaron desarrollar por espacio de 24 a 36 horas a temperatura ambiente. Las cajas petri fueron debidamente identificadas, observando periódicamente el crecimiento del micelio (Ver Figura 13B).

Una vez obtenido micelio se procede a realizar montajes para observar las estructuras reproductivas.



**Figura 13. A.** Solución de suelo estéril; **B.** Semilla de manzana con micelio.

#### e) Re-asilamiento de la colonia

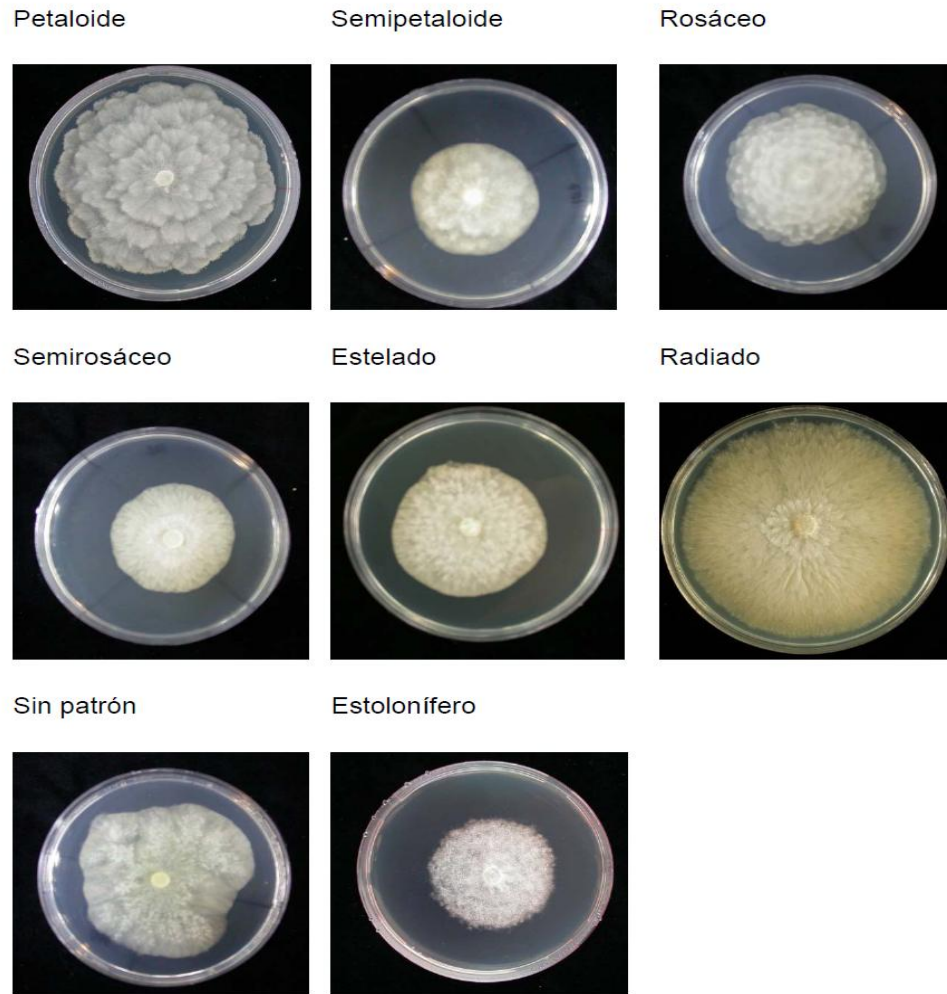
De las colonias a obtenidas en medio selectivo PARPBH se re-aislaron en PDA (agar patata dextrosa) colocando un disco de 5 mm realizado con el sacabocado especial, esto se realiza para obtener colonias puras de *P. capsici*.

Ya re-aisladas las colonias se colocaron en el centro de la placa (PDA) se sella con parafilm y se deja incubando por 48 a 72 horas, para su conservación y extracción de ADN. Se deja transcurrir tal tiempo con el objeto de observar y documentar los patrones de crecimiento característico de cada especie (petaloide, rosáceo, radiado, estolonífero, etc).

Simultáneamente se procede a la siembra de medio de cultivo V8, para estimular la producción de estructuras reproductivas.

**f) Patrones característicos de cepas de *Phytophthoras***

En la figura (14) se observan diferentes patrones de crecimiento característicos de *Phytophthoras sp.* Puede utilizarse como parámetro de identificación.



**Figura 14.** Especificación pictográfica de las características de crecimiento para identificar especies de *Phytophthora* desarrolladas en medio PDA según Erwin y Riveiro.

**g) Conservación de los aislamientos**

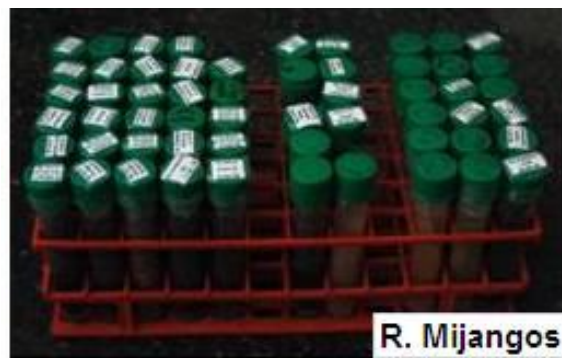
*Phytophthora capsici* es muy sensible a los cambios de temperatura, por lo tanto los aislamientos no deben de mantenerse a temperaturas menores de 15° y no mayores de

23° C. Para la conservación de *P. capsici* existen varias formas de hacerlo, en este caso se utilizó un tubo plástico esterilizable de 12 ml con tapa de rosca (Ver Figura 15).

Se preparó medio de agar V-8 y se procedieron a llenar los tubos aproximadamente 8 ml de medio. Se esterilizó en autoclave y se dejó que solidificará, con una inclinación de 45° (aproximadamente).

Se introdujo un disco de 5mm proveniente de la cepa de PDA. Se dejó incubado y se observó periódicamente hasta que tuviera un crecimiento de micelio.

Una vez crecido el micelio se le agregó aceite mineral tratando de cubrir el área de crecimiento y esto logró que conservara las cepas en condiciones controladas. (Incubadora a temperaturas mayores de 15°C y menores de 23°C).



**Figura 15.** Conservación de los aislados de *P. capsici*, proveniente de las 32 cepas aisladas. Contenidos en tubo plástico medio V-8 y aceite mineral.

#### **h) Diagnóstico molecular**

Se realizó el diagnóstico molecular de todas las cepas aisladas de *Phytophthora capsici*, para esto se utilizó la técnica de microsatélites.

#### **i) Cultivo de micelio:**

Cada aislado de *Phytophthora capsici* cultivado en medio de PDA durante 7 días del paso (6.5) en donde se obtuvieron placas puras se procedieron a extracción de ADN.

#### **j) Extracción de ADN:**

Materiales y Metodología

ADN proveniente de micelio



Buffer de extracción de ADN

Bisturí

Mechero de alcohol

Alcohol 70%, 90%

Tubos eppendorf 1.5ml

Marcador permanente

Gradillas

Micropipeta 1000  $\mu$ L

Pistilo kontes

Vortex

Centrífuga

Isopropanol 95%

Alcohol 70%

Solución de TE

Papel mayordomo

- Se realizó un raspado del micelio haciendo uso de un bisturí debidamente desinfectado y se colocó en un tubo de 1.5 ml estéril y debidamente identificado.
- El tubo con micelio se sumergió en nitrógeno líquido. A continuación se esperó que evapore el nitrógeno líquido.
- Se maceró con un pistilo de kontes, hasta que el micelio quedara completamente lisado.
- Se agregaron 400  $\mu$ l de buffer de extracción.
- Se homogenizó el micelio con la solución extracto, usando un pistilo de kontes.
- En el vortex se dejó durante 20 segundos para que mezclara bien. Se recomienda dejar a temperatura ambiente por una hora.
- Se le dejó centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Se agregaron  $\frac{3}{4}$  del volumen (unos 300  $\mu$ l) de isopropanol al 95% y se mezcló.
- Centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para lograr precipitar el ADN.
- Se lavó la pastilla de ADN con alcohol al 70%.

- Se agregaron 50 ul de TE y se espero que el precipitado se disolviera.
- Se guardaron los tubos a -20°C.

**k) Amplificación por PCR:**

El ADN de todas las cepas aisladas de *Phytophthora capsici* fueron evaluadas mediante la técnica de PCR usando un par de cebadores para microsatélites, cuya secuencia fueron las siguientes:

DBDA 5'CA CA CA CA CA CA CA 3'

YHY 5'GT GT GT GT GT GT G 3'

HBH 5'AG AG AG AG AG AG AG A 3'

DDB 5'CCA CCA CCA CCA CCA 3'

DHB 5'TCG TCG TCG TCG TCG 3'

DHB 5'CGA CGA CGA CGA CGA 3'

GTG 5'GTG GTG GTG GTG 3'

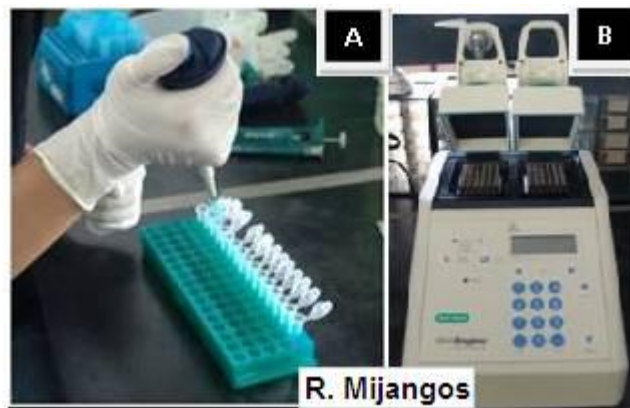
- Se colocó hielo triturado dentro de una hielera para mantener las soluciones bajo condiciones de baja temperatura.
- Los tubos conteniendo los componentes correspondientes para la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa PCR ((Taq polimerasa, Buffer, Primer o cebador, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y dNTPs) fueron extraídos del congelador y colocados en la hielera que contiene el hielo. Esto con el fin de no dañar los componentes para llevar a cabo el proceso del PCR.
- Dentro de un tubo plástico de 1.5 ml de capacidad, se agregaron las cantidades totales para la preparación de la mezcla maestra (Máster mix) y con la ayuda de una micropipeta se mezcló todo el contenido.
- Se identificaron los tubos de 0.2 ml., correspondientes a cada muestra de ADN atrabajado.
- Posteriormente se les agregó 0.5 micro-litros de ADN dentro de los tubos plásticos de 0.2 ml. de capacidad.
- Se Agregaron 24 micro-litros de la solución maestra (Máster mix) al tubo de 0.2 ml que contiene la muestra de ADN.

- Se colocó rápidamente dentro del termociclador.

Nota: estos pasos se realizó con cada uno de los cebadores utilizados para el estudio.

**Cuadro 5** Cantidad de reactivos utilizados en el proceso de PCR.

COMPONENTE	[ ]	CANTIDAD UNITARIA ( $\mu$ l) (C.U.)	NÚMERO DE MUESTRAS DE ADN (n)	CANTIDAD TOTAL ( $\mu$ l) (C.U.)* (n)
H <sub>2</sub> O		12.8	32	396.8
Solución dNTP	2.5 mM	2.5		77.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5		77.5
Solución Buffer		2.5		77.5
Primer	10 pmol	3.0		93
Taq polimerasa	0.5 U	0.2		6.2
ADN		1.5		
TOTAL DE MEZCLA		25.0		



**Figura 16.** **A.** Llenado de tubos con ADN, con la ayuda de una micropipeta. **B.** colocación en el termociclador.



El termociclador fue programado de la siguiente manera:

**Cuadro 6.** Programa de PCR para los cebadores (GTG)5 y (GT)7

PROCESO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Iniciación)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	56 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido

Fuente: R. Mijangos

**Cuadro 7.** Programa de PCR para los Cebadores (TCG)5 y (CGA)5

PROCESO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Iniciación)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	61 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido

Fuente: R. Mijangos.

**Cuadro 8.** Programa de PCR para el Cebador (CA)7

PROCESO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Iniciación)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	41 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido

Fuente: R. Mijangos

**Cuadro 9.** Programa de PCR para el Cebador (CCA)7

PROCESO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Iniciación)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	64 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido

Fuente: R. Mijangos

**Cuadro 10.** Programa de PCR para el Cebador (AG)7

PROCESO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Iniciación)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	50 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido

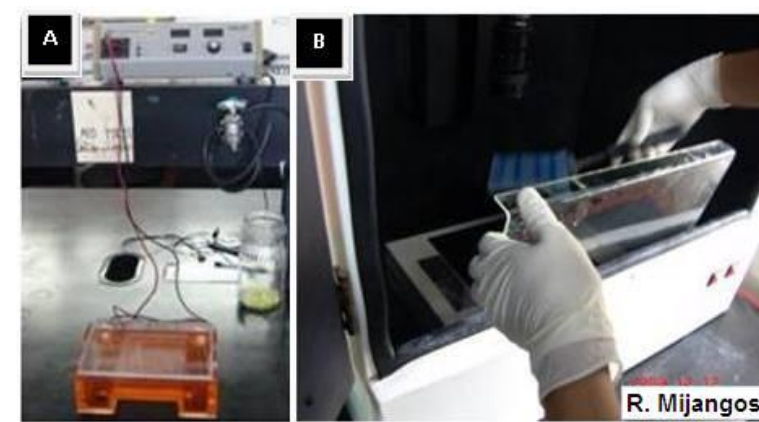
Fuente: R. Mijangos

### I) Electroforesis

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa a 1.5% y puesto en electroforesis, posteriormente el gel fue sumergido en bromuro de etidio para su tinción y las bandas, visualizadas con luz UV.

- Se pesaron 0.75 gramos de agarosa, esto con el fin de tener el 1.5% del volumen total a utilizar para llenar el molde deseado.
- Se introdujo la agarosa pesada a un erlenmeyer de 500 ml. de capacidad y se agregó el volumen de la solución TBE 0.5X (50 ml).
- Se calentó la solución preparada con la ayuda del horno de microondas, hasta que desaparición los restos de agarosa.
- Se esperó hasta que el contenido del erlenmeyer estuviera tibio.
- La bandeja contenedora del gel de agarosa se colocó en dirección perpendicular al sistema horizontal de electroforesis.
- Se insertó en el molde de electroforesis los peines que formaron los pozos en los cuales fueron colocados los ADN amplificados.
- Los peines fueron retirados con mucho cuidado y delicadeza para no romper los pozos.
- El sistema de electroforesis se llenó con la solución de TBE 0.5X.

- Se cortó una porción de papel parafilm. Retirándole la cubierta protectora y sobre este fue colocado 2.5  $\mu$ l de una solución buffer de carga tipo III con la ayuda de una micropipeta.
- Se vertió sobre el buffer de carga tipo III, 6  $\mu$ l de ADN proveniente del proceso de PCR.
- Los pozos fueron llenados con la mezcla de 2.5  $\mu$ l de la solución buffer de carga tipo III y 6  $\mu$ l de ADN.
- Se colocó la tapa del sistema horizontal de electroforesis y se conectó a la fuente de poder para seguidamente encenderla y graduarla a 110 voltios.
- Se dio tiempo de movilización de los fragmentos de ADN a través del gel de agarosa durante 30 minutos aproximadamente.
- El gel de agarosa se retiró del sistema de electroforesis y se tiñó con bromuro de etidio aproximadamente 10 minutos durante el proceso, fue de forma obligatoria utilizar guantes de látex debido a que el reactivo es considerado cancerígeno.
- Transcurrido los 10 minutos se retiró el gel de agarosa del bromuro de etidio y se observó las bandas de ADN en el transiluminador de luz ultravioleta.
- Posteriormente los resultados fueron interpretados en el gel de agarosa realizando un cuadro de lectura de las bandas para observar la descripción de la variación.



**Figura 17. A.** Se cargó con ADN, los espacios vacíos en el gel. **B.** Se retiró el gel de agarosa del transiluminador de UV se observan las bandas de ADN.

## 2.5.2 Ensayo prueba de patogenicidad

### A. Materiales y métodos

Se procedió a realizar la prueba de patogenicidad con todos los aislamientos obtenidos de las muestras, para comprobar si los aislamientos afectan al chile pimiento. Para comprobar si dichos aislamientos corresponden a la especie patógena en el cultivo con síntomas que fueron sujeto de muestreo, de donde se aislaron inicialmente. Para comprobar los postulados de Koch.

Para tal fin, se procedió a obtener plantas sanas de chile pimiento. Los que fueron sembrados en bandejas y se procedió a inocular.

Durante el proceso de investigación se procedió a prepara el inóculo de cada uno de los aislamientos, en medio Avena Agar (Agar V-8 Avena). Las que fueron inoculados en las plantas sanas obtenidas en las bandejas piloneras.

Para el re-aislamiento del patógeno se utilizó la metodología “cultivo trampa” con manzanas verdes, semillas de chile pimiento, bandejas piloneras, macetas, sustrato estéril para la germinación, agua destilada, cinta adhesiva, parafilm y cámara fotográfica.

### B. Obtención y propagación del inóculo de *Phytophthora capsici*.

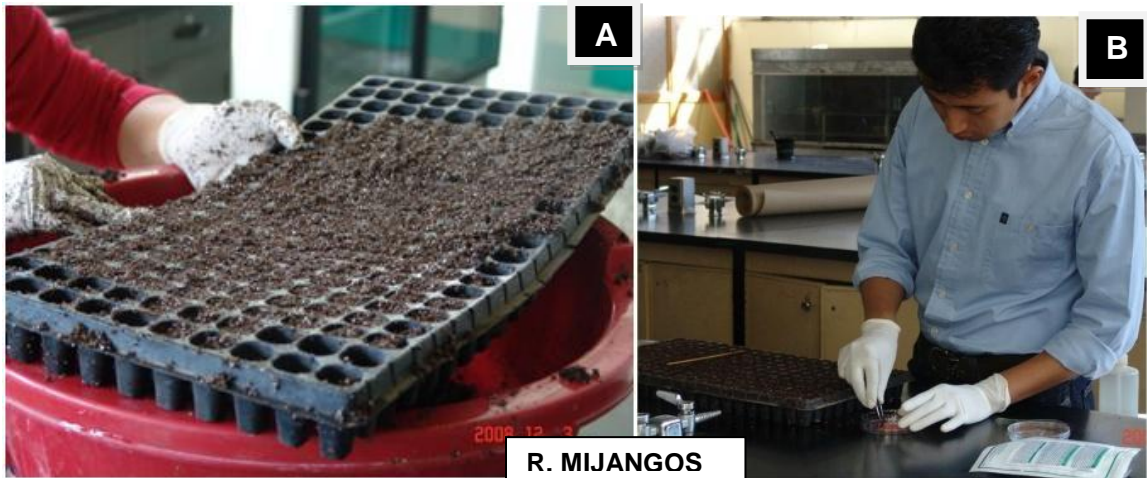
De cada uno de las cepas de *Phytophthora capsici* sembradas en medio de cultivo PDA, se repicó en medio de cultivo Agar V-8 Avena.

Se dejó incubar aproximadamente 8 días hasta que presentara crecimiento de micelio, se procedió a inocular trozos del aislamiento en macetas donde se sembraron plantas sanas.

### C. Obtención de plántulas sanas para prueba de patogenicidad

Se utilizaron semillas de chile pimiento para obtención de plántulas.

Se colocó una semilla por cada uno de los agujeros de la bandeja pilonera con sustrato estéril para obtener plántulas sanas, Las que fueron inoculadas posteriormente. (Ver figuras 18A y 18B)



**Figura 18.** A. Preparación de la bandeja pilonera B. Siembra de semillas de chile pimienta.

Cuando las plantas desarrollaron las primeras hojas verdaderas, se procedió a trasplantarlas a macetas, seleccionando plántulas que presentara mejor desarrollo (Ver Figura 19).



**Figura 19.** Plántulas de chile pimienta para ser inoculadas con cepas de *P. capsici*.

#### D. Inoculación de la cepa *Phytophthora capsici* a las plántulas

Las macetas fueron llenadas con sustrato estéril (Turba más Vermiculita) a  $\frac{3}{4}$ , cada cepa de *Phytophthora capsici* con medio Agar V-8, fue cortado en pequeños cuadros de 1 cm aproximadamente (Ver Figura 20).



**Figura 20.** A. Llenado de maceta con sustrato estéril lista para ser inoculado, B. Placa con medio V-8, cortados en pequeños fragmentos. C. Inoculación de cada cepa de *Phytophthora*. D. Forma de distribución.



Inoculada cada una de las macetas se regaron dos veces al día con agua estéril a capacidad de campo. (Ver Figura 21)



**Figura 21.** A. Siembra de 10 plántulas en cada maceta. B. Prueba de patogenicidad de cepas de *Phytophthora capsici*.

Se determinó el desarrollo final de las plántulas con aspectos fisiológicos y morfológicos. Esta evaluación se realizó a los 20 días después del inóculo. Pasado los 20 días de la inoculación del aislamiento, se procedió a re-aislar y purificar el patógeno causante del marchitamiento de la planta. Las plantas con síntomas de marchitamiento, pudrición de raíz o tallo, fueron sometidas a re-aislamiento, siguiendo la metodología del cultivo trampa específica para *Phytophthora*.



## 2.6 RESULTADOS

Se realizó un muestreo en dos zonas productoras de chile pimiento, obteniendo 90 muestras para su análisis, dando como resultado 32 cepas de *Phytophthora capsici*. Los muestreos se realizaron en parcelas a campo abierto e invernaderos en las dos zonas bajo estudio (Ver Figura 22).



**Figura 22.** Zona productora de chile pimiento Laguna de Retana, (Jutiapa).

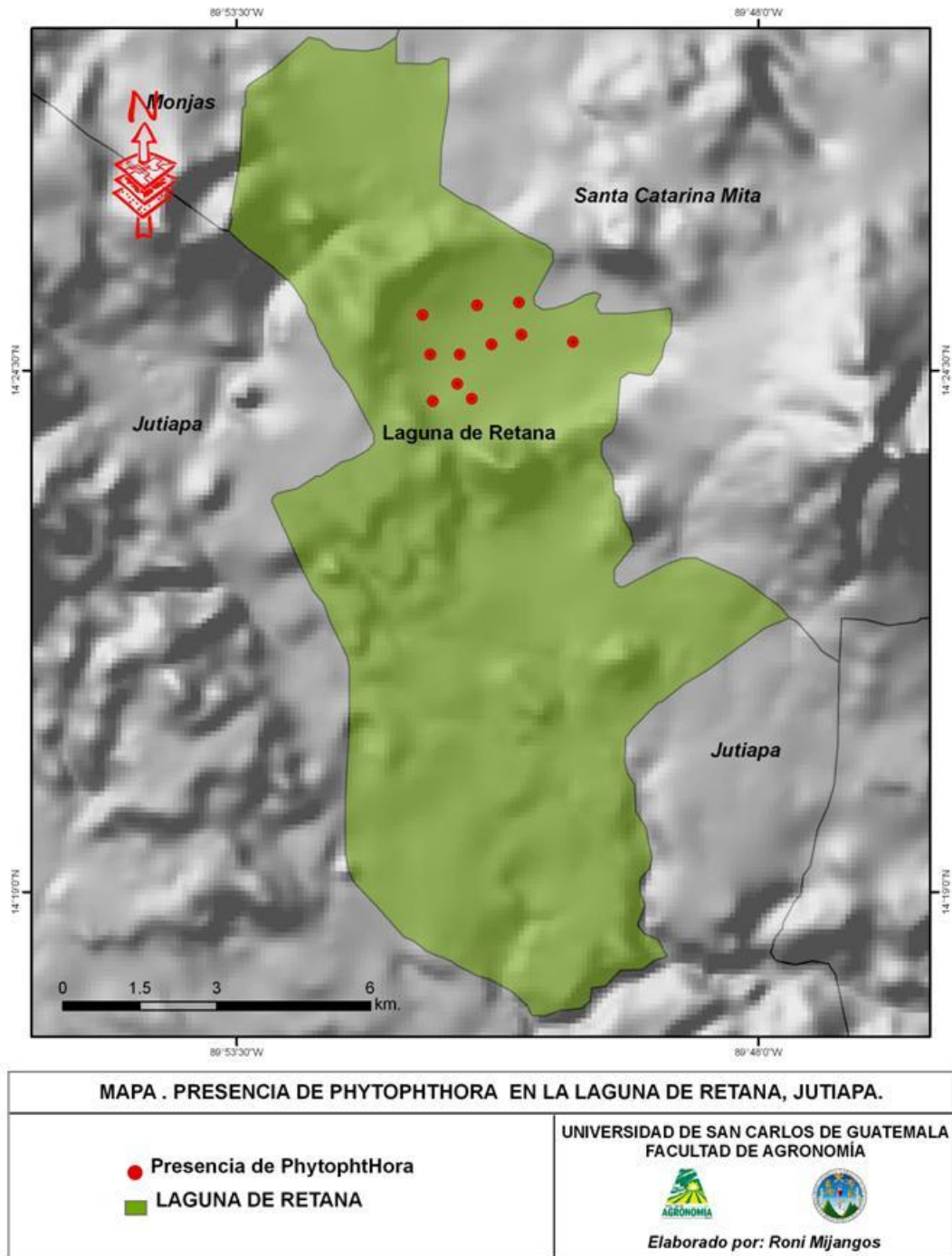


**Figura 23.** Uno de los sitios muestreados bajo invernadero en la comunidad San Juan, Salamá, Baja Verapaz.

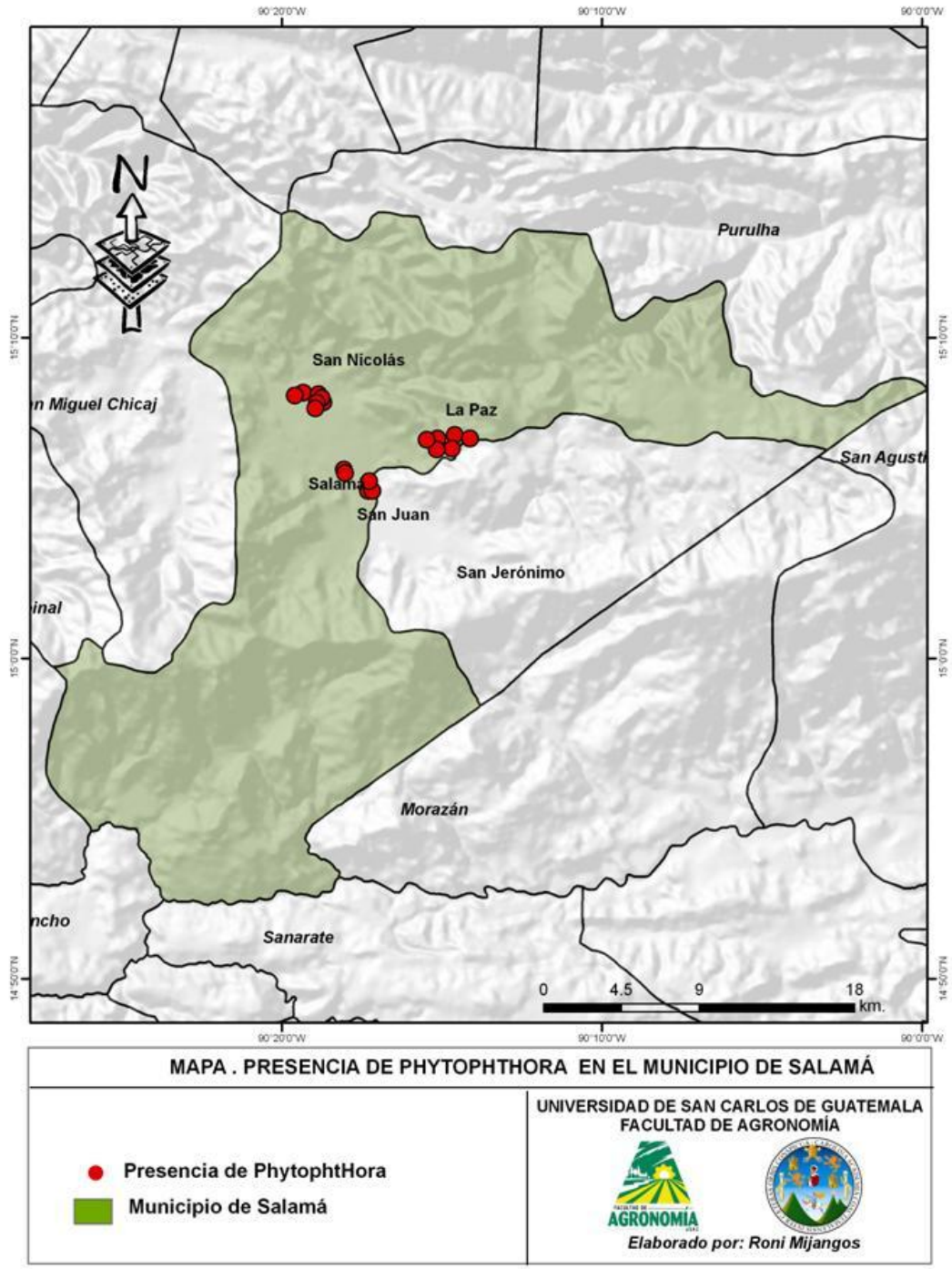
En el cuadro (11), De los 90 aislamientos se obtuvo que 32 de ellos fueron positivos a la presencia de *Phytophthora capsici* en las zonas de muestreo.

**Cuadro 11.** Áreas muestreadas con presencia de *Phytophthora capsici*, coordenadas latitud-longitud y numeración correlativa.

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADO		PATOGENO AISLADO
			LATITUD	LONGITUD	
<b>JUTIAPA</b>					
1	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4103996	-89,8373073	<i>Phytophthora capsici</i>
2	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4103996	-89,8373073	<i>Phytophthora capsici</i>
3	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4103996	-89,8373073	<i>Phytophthora capsici</i>
4	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4028376	-89,8338229	<i>Phytophthora capsici</i>
5	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4103996	-89,8373073	<i>Phytophthora capsici</i>
6	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4103996	-89,8373073	<i>Phytophthora capsici</i>
7	Laguna Retana	Chile Pimiento	14° 24'59.38"	89° 50'59.15"	<i>Phytophthora capsici</i>
8	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4103996	-89,8373073	<i>Phytophthora capsici</i>
9	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4028376	-89,8338229	<i>Phytophthora capsici</i>
10	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4027157	-89,8338671	<i>Phytophthora capsici</i>
11	Laguna Retana	Chile Pimiento	+14,4027157	-89,8338671	<i>Phytophthora capsici</i>
<b>BAJA VERAPAZ</b>					
12	Salamá	Chile Pimiento	15° 06'12.00"	90° 18'50.34"	<i>Phytophthora capsici</i>
13	San Juan	Chile Pimiento	15° 06'12.00"	90° 18'50.34"	<i>Phytophthora capsici</i>
14	San Juan	Chile Pimiento	15° 06'12.00"	90° 18'50.34"	<i>Phytophthora capsici</i>
15	San Juan	Chile Pimiento	15° 06'12.00"	90° 18'50.34"	<i>Phytophthora capsici</i>
16	San Juan	Chile Pimiento	15° 06'12.00"	90° 18'50.34"	<i>Phytophthora capsici</i>
17	San Juan	Chile Pimiento	15° 06'10.16"	90° 16'15.27"	<i>Phytophthora capsici</i>
19	San Juan	Chile Pimiento	15° 06'10.16"	90° 16'15.27"	<i>Phytophthora capsici</i>
20	San Nicolás	Chile Pimiento	15° 06'14.79"	90° 18'50.20"	<i>Phytophthora capsici</i>
21	San Nicolás	Chile Pimiento	15° 06'14.79"	90° 18'50.20"	<i>Phytophthora capsici</i>
22	San Nicolás	Chile Pimiento	15° 06'14.79"	90° 18'50.20"	<i>Phytophthora capsici</i>
23	San Nicolás	Chile Pimiento	15° 06'14.79"	90° 18'50.20"	<i>Phytophthora capsici</i>
24	San Nicolás	Chile Pimiento	15° 06'14.79"	90° 18'50.20"	<i>Phytophthora capsici</i>
25	San Nicolás	Chile Pimiento	15° 06'14.79"	90° 18'50.20"	<i>Phytophthora capsici</i>
26	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>
27	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>
28	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>
29	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>
30	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>
31	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>
32	La Paz	Chile Pimiento	15° 07'58.98"	90° 14'44.56"	<i>Phytophthora capsici</i>



**Figura 24.** Mapa de localización con presencia de *Phytophthora capsici*, en la Laguna de Retana, (Jutiapa).  
 Fuente: R. Mijangos



**Figura 25.** Mapa de localización con presencia de *Phytophthora capsici*, en el municipio de Salamá Departamento de Baja Verapaz.  
Fuente: R. Mijangos



## 2.6.1 Incidencia por zonas productoras

### A. Laguna de Retana Jutiapa

Durante el estudio en la zona productora de la Laguna de Retana se obtuvo 45 aislamientos, de los cuales 11 dieron positivos con presencia de *Phytophthora capsici*, en el cultivo de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Cuadro 7).

- **Síntomas observados**

Los síntomas de campo generalmente son marchitamiento de la planta, pudrición de raíces, amarillamiento en el cuello del tallo, sistema radicular poco desarrollado, defoliación, clorosis, muerte prematura, frutos pequeños y bajo condiciones de alta humedad el patógeno penetra en el fruto. En algunos casos desarrollo de micelio dentro del fruto, a toda esta sintomatología se le conoce como tristeza o marchitamiento del chile (Ver Figura 26, 27 y 28).



**Figura 26.** Síntoma ocasionado por *P. capsici* en plantas de chile pimiento *Capsicum annuum* en la Laguna de Retana Jutiapa.



**Figura 27.** Presencia de micelio dentro del fruto de chile pimiento en la Laguna de Retana Jutiapa.



**Figura 28.** Pudrición de raíces, sistema radicular poco desarrollado, en chile pimiento en la Laguna de Retana.



## B. Salamá Baja Verapaz

De las muestras procedentes Salamá, se obtuvo 45 aislamientos de los cuales 20 dieron positivos con *Phytophthora capsici*.

Las muestras fueron recolectadas bajo invernaderos y en la cual los síntomas fueron pudrición de raíces, marchitamiento de la planta, poco desarrollo radicular defoliación de hojas (Ver figura 29).



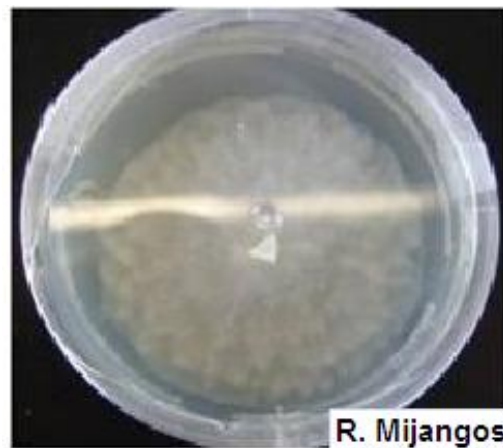
**Figura 29.** Marchitamiento de plantas de chile pimiento bajo invernadero en la comunidad San Juan, Salamá, Baja Verapaz.



**Figura 30.** Sintomatología del daño causado en la base del tallo por la presencia de *Phytophthora capsici*, observada durante los muestreos.

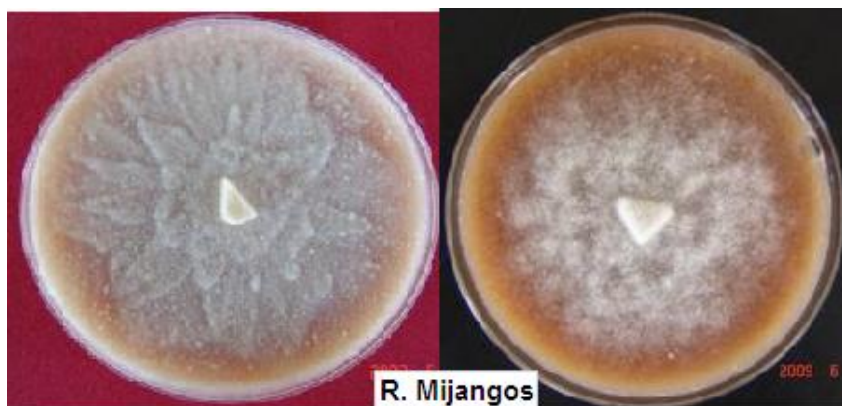
### C. Aislamientos de cepas *Phytophthora capsici*

De los aislamientos realizados de suelo, raíz, tallo y fruto, fueron aislados en medio de cultivo, Agar Patata Dextrosa (PDA) con el objeto de observar y documentar el patrón de crecimiento característico de la especie, se pudo observar que el crecimiento es típico de *Phytophthora capsici*. Con un patrón de crecimiento semipetaloide (ver fig. 31) y esta misma sirvió para la realización de extracción de ADN, y conservación en cepario.



**Figura 31.**Cepa desarrollada con *P. capsici*, en medio de cultivo PDA.

Para obtener colonias para esporulación se realizó siembra en medio de cultivo Agar V-8 para estimular la producción de estructuras sexuales y asexuales y así se pudo comparar con la descripción pictográfica de las características de crecimiento de especies de *Phytophthoras* (Ver Figura 32).



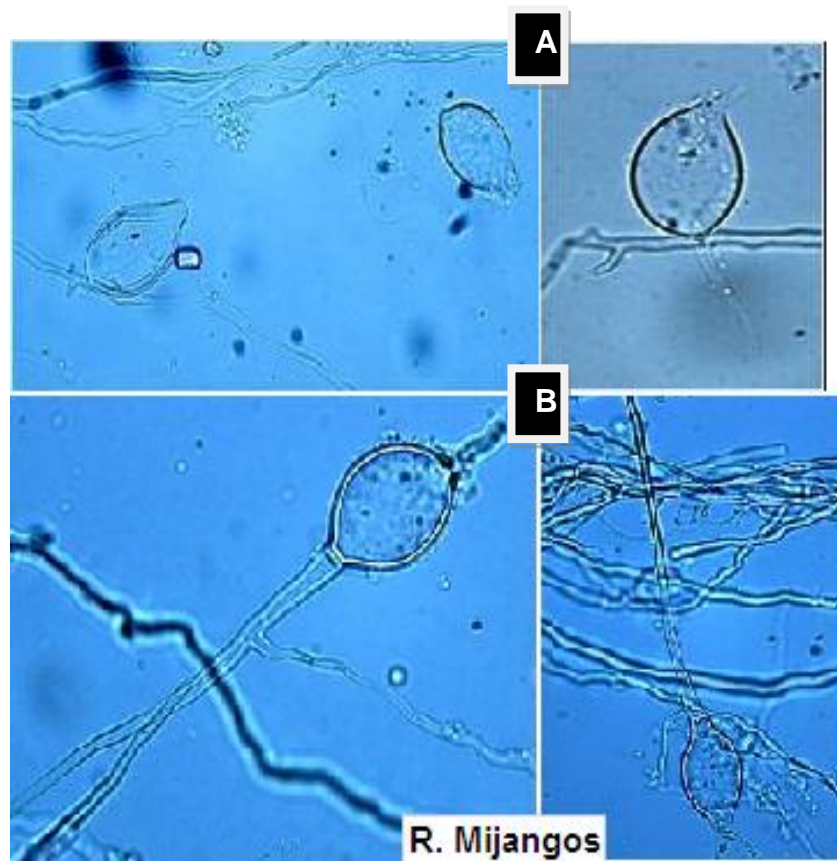
**Figura 32.**Cepa desarrollada con *P. capsici*, en medio de cultivo Agar V-8 para esporulación.



#### D. Descripción de los aislados de *P. capsici* obtenidos en Chile pimiento

Según Erwin, D. y Ribeiro, O. los esporangios de *P. capsici* son la mayoría papilados, pero en algunos casos se muestran semipapilados, ocasionalmente los esporangios pueden tener dos o tres ápices. La forma de los esporangios pueden ser de forma subesféricos, ovoides, elipsoides o tener formas distorsionadas.

Por las características morfológicas observadas en microscopio se pudo identificar que si pertenecen a *Phytophthora capsici*. La formación de oosporas, esporangios tipo papilados, forma ovoidal todas estas estructuras sexuales se observó después de 5 a 7 días de su aislamiento (Figura 33).



**Figura 33.** **A.** Esporangios aislado de las cepas de San Juan, Salamá, **B.** Esporangios aislados de las cepas de La Laguna de Retana, Jutiapa.

## F. Caracterización molecular de cepas

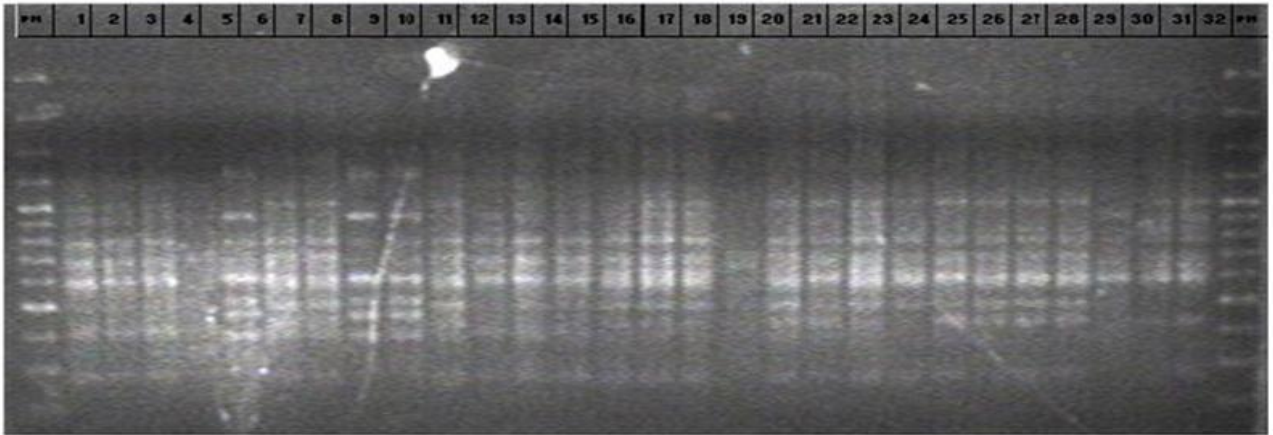
Se realizó el diagnóstico molecular de todas las cepas aisladas mediante la técnica de PCR usando el par de cebadores para microsatélites, ya que ésta estima la diversidad genética de la población en estudio, se evaluaron 7 cebadores. Cada uno de los cebadores se programó a distintas temperaturas para la reacción de la polimerasa de la amplificación del ADN (Ver cuadro 8).

**Cuadro 12:** cebadores utilizados para la secuenciación y las temperaturas utilizados para la reacción de sus ciclos o fases.

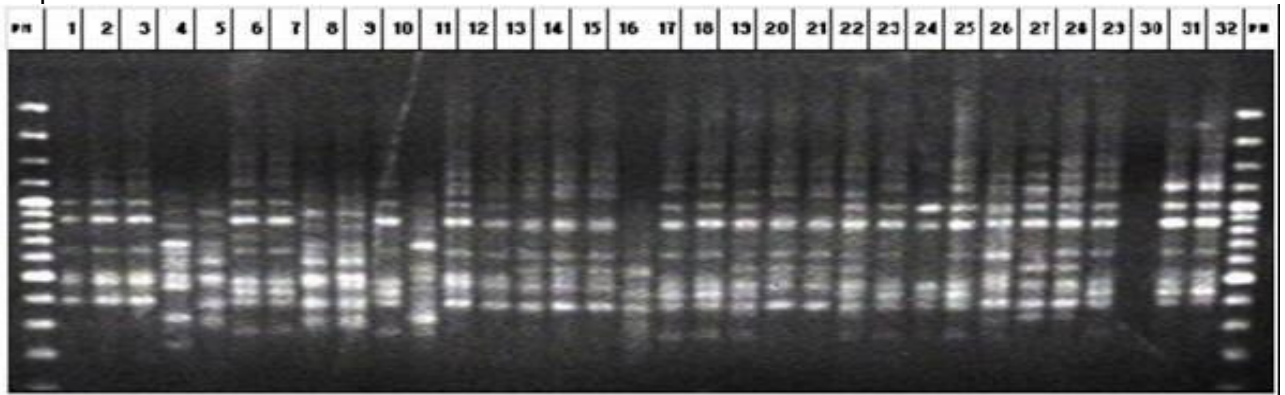
Nombre del cebador	Secuencia cebador	Temperatura
DBDA	CA CA CA CA CA CA CA	41 °C
YHY	GT GT GT GT GT GT G	56°C
HBH	AG AG AG AG AG AG AG A	50°C
DDB	CCA CCA CCA CCA CCA	64°C
DHB	TCG TCG TCG TCG TCG	61°C
DHB	CGA CGA CGA CGA CGA	61°C
	GTG GTG GTG GTG GTG	56°C

## G. Análisis de secuencias de ADN

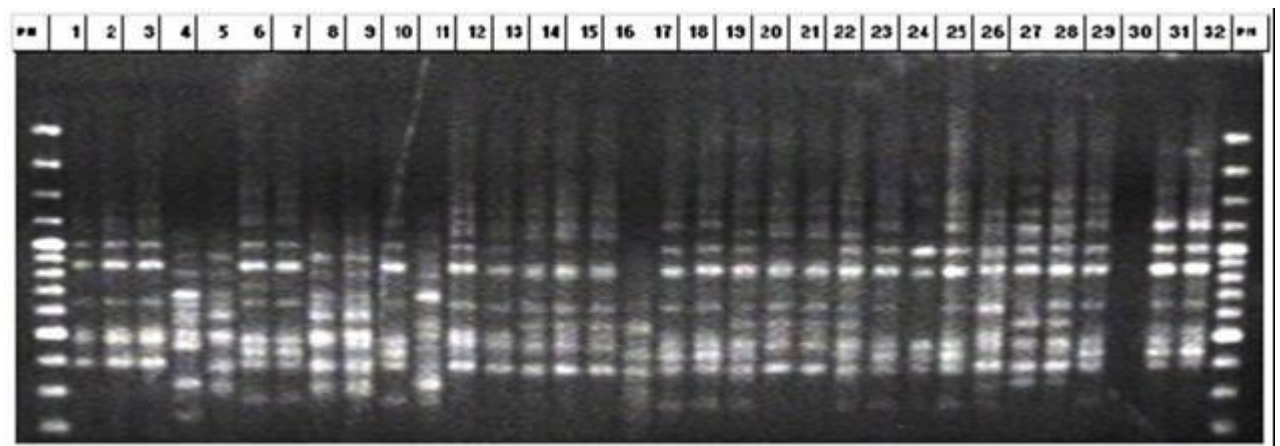
Se puede observar en las figuras 34, 35 y 36 las diferentes amplificaciones de ADN de las cepas aisladas de Chile pimiento, de los siete cebadores evaluados 3 cebadores produjeron bandas polimórficas GTG, TCG, Y CGA, ya que se observan con facilidad los diferentes fragmentos y distintas longitudes, evidentes por medio de electroforesis, en estos cebadores se observaron mejores las separaciones de las moléculas o fragmentos de los ácidos nucleicos.



**Figura 34.** Gel de agarosa, mostrando resultado de electroforesis, producto de PCR, carril PM corresponde al marcador de peso y las bandas en los carriles 1-32 corresponden a la amplificación usando el cebador GTG.



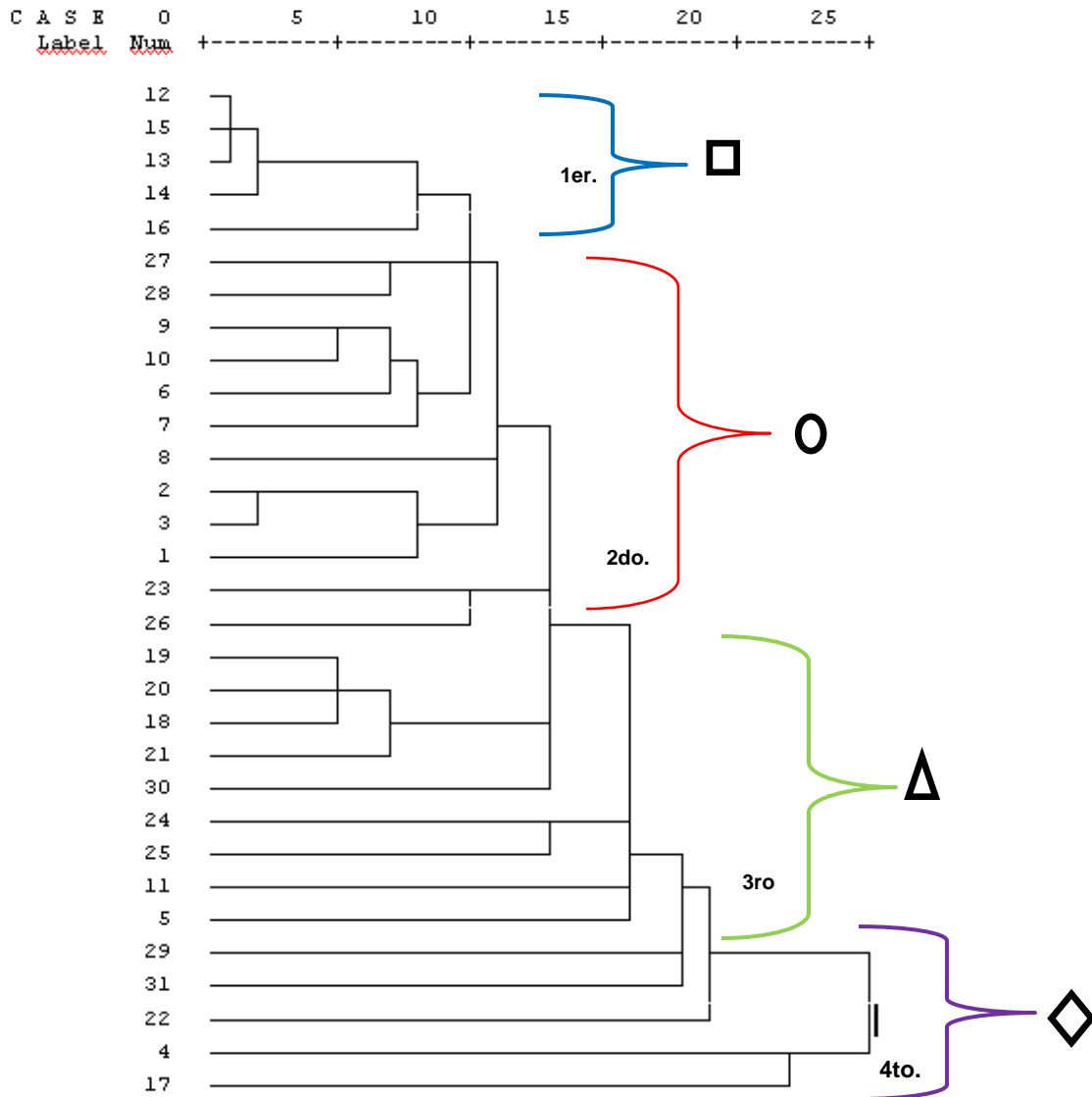
**Figura 35** Gel de agarosa, mostrando resultado de electroforesis, producto de PCR, carril PM corresponde al marcador de peso y las bandas en los carriles 1-32 corresponden a la amplificación usando el cebador TCG.



**Figura 36** Gel de agarosa, mostrando resultado de electroforesis, producto de PCR, carril PM corresponde al marcador de peso y las bandas en los carriles 1-32 corresponden a la amplificación usando el cebador CGA.

### H. Árbol Filogenético de cepas de *Phytophthora capsici*.

El dendograma fue elaborado con el programa SSPS calculando la matriz primaria de similitud por medio de un coeficiente de distancia (distancia euclídea) y el método del conglomerado del vecino más próximo.



**Figura 37** Dendograma obtenida del análisis de bandas amplificadas con cebadores de Microsatélites con genoma de *P. capsici* aislado de plantas de chile pimienta.  
Fuente R. Mijangos

Descripción de los grupos siguientes:

El primer grupo  $\square$  se encuentran conglomerados a menor distancia entre ellos y los aislados provienen del municipio de Salamá y de la comunidad de San Juan, Salamá. Esto quiere decir que los aislados son provenientes de la misma zona.

El segundo grupo  $\circ$  está conformado por 10 aislamientos los primeros tres (27, 28, 29) perteneces a la comunidad La Paz, Salamá y el resto proveniente de Laguna de Retana. En donde ya se obtienen aislamiento de las dos zonas de investigación.

El tercer grupo  $\triangle$  está conformado por 9 aislamientos provenientes de Salamá, las muestras 23, 20, 21, 24 y 25 de la comunidad de San Nicolás. Las muestras 19 y 18 de San Juan y las muestras 26 y 30 La paz todas de una misma zona de muestreo.

El cuarto grupo  $\diamond$  está conformado por los últimos 6 aislamientos las muestras 11, 5 y 4 provenientes de Laguna de Retana. Mientras la muestra 17 de San Juan Salamá y las últimas muestras 29, 31 y 22 procedente de La Paz, Salamá.

Se puede observar el dendograma formado por los resultados del programa SSPS acerca de las bandas desarrolladas por los microsátélites en las pruebas de PCR sobre los 32 aislados de *Phytophthora capsici* recolectados en las dos áreas de producción de chile pimiento. En la parte izquierda del dendograma encontramos las 32 muestras recolectadas mientras que en la parte superior la similitud que hay entre ellas.

El dendograma muestra una figura escalonada que muestra un extremo y varios conglomerados de materiales aislados en donde no es posible establecer límites definitivos, por lo que se puede deducir que no existe ningún grupo bien definido, en que los materiales de *Phytophthora capsici* se mezclan entre sí. Por lo que puede decir que existe diferencia genética entre la población.

La variabilidad genética que existe es alta ya que prácticamente todos los aislados mantiene polimorfismo. Es posible que estas divisiones se deba a la variabilidad de razas que existe entre la misma especie de *Capsicum annum* en cada zona bajo estudio.

### I. Pruebas de patogenicidad de chile pimiento

Para confirmar si la especie *Phytophthora capsici* es patógeno naturales se procedió a realizar pruebas de patogenicidad. Se evaluaron los 32 aislados provenientes de las dos áreas de muestreo: Laguna de Retana, Jutiapa y Salamá, en el cultivo del chile pimiento.

La variedad utilizada para la inoculación fue Natalie, es la cultivada en las dos zonas bajo estudio, de los resultados obtenidos, 17 aislados reaccionaron como patógenos en las plantas, mientras las 15 restantes no fueron patógenas bajo las mismas condiciones (Ver cuadro 13 y 14).

**Cuadro 13.** Listado de muestras que resultaron positivos en la prueba de patogenicidad realizada en el laboratorio de Fitopatología.

Muestras	Cultivo	Localidad
1	Chile Pimiento	Laguna de Retana
3	Chile Pimiento	Laguna de Retana
4	Chile Pimiento	Laguna de Retana
7	Chile Pimiento	Laguna de Retana
8	Chile Pimiento	Laguna de Retana
11	Chile Pimiento	Laguna de Retana
12	Chile Pimiento	Salamá
14	Chile Pimiento	Salamá
20	Chile Pimiento	Salamá
16	Chile Pimiento	Salamá
22	Chile Pimiento	Salamá
25	Chile Pimiento	Salamá
26	Chile Pimiento	Salamá
27	Chile Pimiento	Salamá
28	Chile Pimiento	Salamá
30	Chile Pimiento	Salamá
32	Chile Pimiento	Salamá

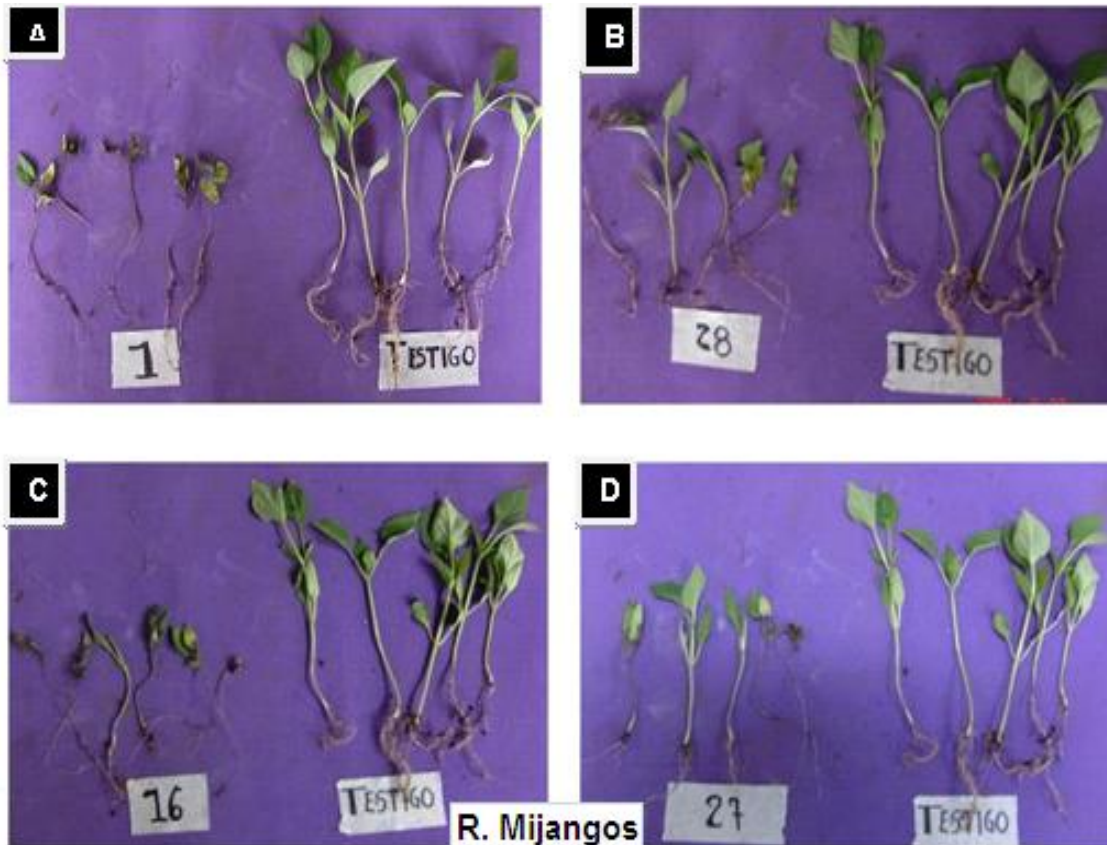
**Cuadro 14** Listado de muestras que resultaron negativas en la prueba de patogenicidad realizada en el laboratorio de Fitopatología.

<b>Muestra</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Procedencia</b>
<b>2</b>	Chile Pimiento	Laguna de Retana
<b>5</b>	Chile Pimiento	Laguna de Retana
<b>6</b>	Chile Pimiento	Laguna de Retana
<b>9</b>	Chile Pimiento	Laguna de Retana
<b>10</b>	Chile Pimiento	Laguna de Retana
<b>13</b>	Chile Pimiento	San Juan
<b>15</b>	Chile Pimiento	San Juan
<b>17</b>	Chile Pimiento	San Juan
<b>18</b>	Chile Pimiento	San Juan
<b>19</b>	Chile Pimiento	San Juan
<b>21</b>	Chile Pimiento	San Nicolás
<b>23</b>	Chile Pimiento	San Nicolás
<b>24</b>	Chile Pimiento	San Nicolás
<b>29</b>	Chile Pimiento	La Paz
<b>31</b>	Chile Pimiento	La Paz

En el cuadro anterior se puede observar el listado de las muestras que resultaron negativas al realizar la prueba de patogenicidad. Este resultado se pudo haber dado por potencial patogénico perdiera su virulencia en el momento del repique tras repique de las cepas, debido a que se prolongó el inicio de la prueba de patogenicidad aproximadamente de 3 meses y a la recuperación de las cepas originales utilizadas para la extracción de ADN.



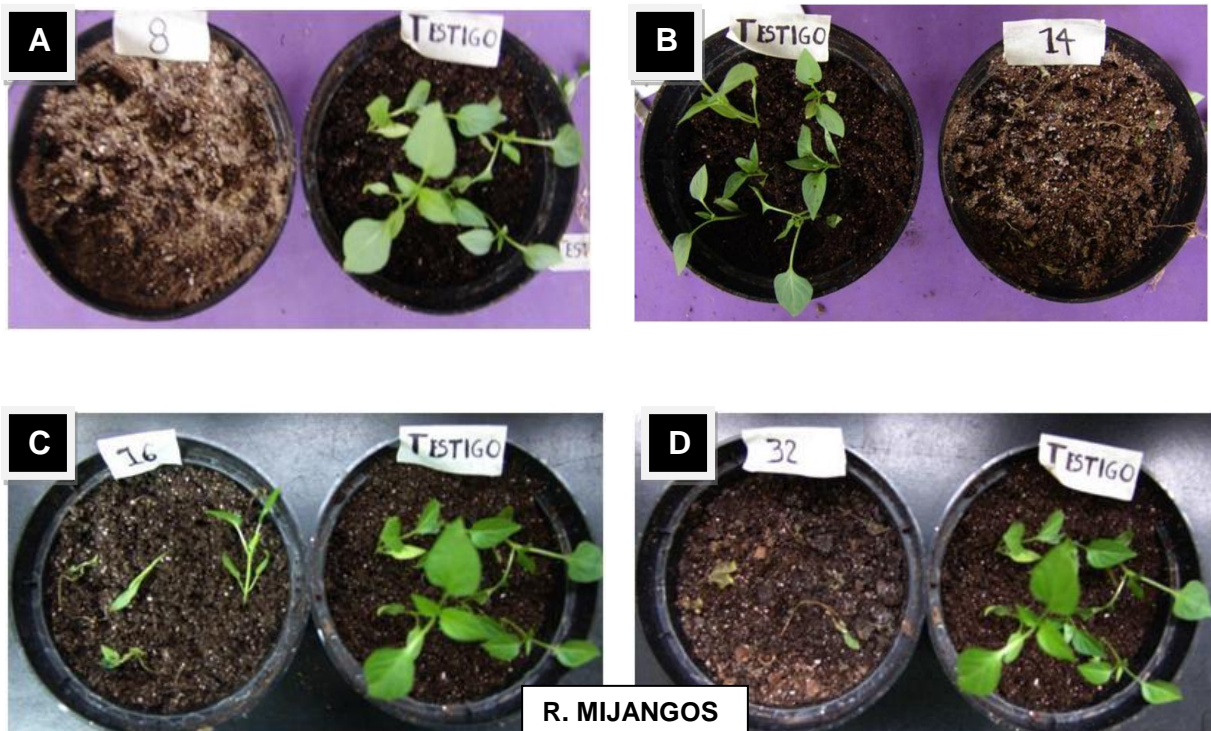
En la figura 35 se puede observar un marchitamiento de la planta, desarrolló radicular deficiente, comparándola con el respectivo testigo, lo que presenta una marcada diferencia. La muestra presento una coloración anormal debido a la pudrición de las raíces, así como también menor desarrollo y ausencia total o parcial de raicillas secundarias en comparación de las plantas testigo (a la derecha de la figura).



**Figura 38.** Al lado izquierdo de las figuras se observa el daño causado por *Phytophthora capsici*, en las plantas inoculadas. Figura **A**, poco desarrollo de la planta, muestra proveniente de la Laguna de Retana, Jutiapa, Figuras, **B**, **C**, **D**, poco desarrollo radicular, marchitamiento de la planta, muestra proveniente de la comunidad San Juan, Salamá, Baja Verapaz. A la derecha plantas testigos.



En el transcurso del bioensayo se pudo notar que las muestras 8, 14, 16, y 32 que corresponden a los dos puntos de muestreo. La inoculación dio positiva por las características que presentó, tales como poco crecimiento o la muerte total de las plantas, comparándola con el testigo, ya que esta es una de las características principales de *Phytophthora capsici*. (Ver Figura 39)



**Figura 39.** Efecto del daño ocasionado por *Phytophthora capsici*. **A.** Muerte total de la planta, colectado en la Laguna de Retana, **B.** Ausencia de las plantas en la maceta, colectada en San Juan, Salamá. **C.** y **D.** ausencia y marchitamiento de la planta, colectada en La Paz, Salamá.

## 2.7 CONCLUSIONES

- De los 32 aislamientos obtenidos, 20 procedieron de Salamá y 12 de La Laguna de Retana Jutiapa.
- El estudio demuestra que existe diferencia genética entre los aislamientos obtenidos.
- *Phytophthora capsici* presenta una gran diversidad genética la cual puede verse reflejada en el árbol filogenético. Situación que debe tomarse en cuenta para implementar las diferentes prácticas de control.
- Este tipo de información es fundamental para los programas de fitomejoramiento enfocados en la obtención de materiales resistentes, ya que si se quiere obtener un material resistente duradero y amplio rango de adaptación debe de considerarse la diversidad de los patógenos involucrados.

## 2.8 RECOMENDACIONES

- Estudiar sobre la distribución de *Phytophthora capsici* en las otras zonas de producción de chile pimiento a nivel nacional.
- Estudiar la diversidad genética que existen entre las razas de *Phytophthora capsici* en las dos zonas bajo estudio.
- Realizar estudio sobre la diversidad genética de *Phytophthora capsici* en las zonas de alta producción de chile pimiento en Guatemala.

## 2.9 BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2005. Plant pathology. US, Elsevier Academic Press. 703 p.
2. Discover Life.org. 2009. *Capsicum annuum* L.: la jiao; cayenne pepper; *Capsicum frutescens* L (en línea). US. Consultado 13 oct 2009. Disponible en: <http://www.discoverlife.org/mp/20o?search=Capsicum+annuum>
3. Ebiostar.com. 1996. Pimaricina y nisina (en línea). US. Consultado 5 ene 2009. Disponible en <http://www.ebiostar.com/Pimaricina.htm>
4. Echemendia Medina, Y. 2003. *Phytophthora*: características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales: medidas de control (en línea). Cuba, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Consultada 3 oct 2008. Disponible en;<http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
5. Erwin, D; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. US, American Phytopathological Society. 456 p.
6. FASAGUA (Federación de Asociaciones Agrícolas de Guatemala, GT). 2009. Precios monitoreados en Central de Mayoreo (CENMA) (en línea). Guatemala. Consultado 21 oct 2008. Disponible en: <http://www.fasagua.com/default.php?lng=&showpage=30>
7. González, Salán, MMR. 2004. El género *Capsicum* al servicio de la sociedad Guatemalteca (en línea). Guatemala. Consultado 15 oct 2008. Disponible en: [http://www.icta.gob.gt/fpdf/publi\\_/chiles.pdf](http://www.icta.gob.gt/fpdf/publi_/chiles.pdf)
8. Holt, J. 2009. Taxa off life (en línea). US. Consultado 7 set 2009. Disponible en <http://comenius.susqu.edu/bi/202/CHROMALVEOLATA/HETEROKONTAE/OOMYCOTA/default.htm>
9. Infoagro.com. 2003. El cultivo de chile pimiento (en línea). España. Consultado 1abr 2007. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm>
10. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Programas de Apoyo a los Agronegocios, GT). 2008. *Lycopersicum esculentum*. Guatemala. Consultada 21 oct 2008. Disponible en: [http://portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc\\_upie/documentos/tomate\\_agronegocios.pdf](http://portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc_upie/documentos/tomate_agronegocios.pdf)

11. Padilla, CA; Diez, J; Martínez, E; Bárcena, JA; García, C. 2006. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa: aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico. Córdoba, España, Universidad de Córdoba, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Consultado 26 mar 2009. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
12. Pérez Moreno, L. 2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas (en línea). México. Consultada 6 oct 2008. Disponible en: [http://www.world-pepper.org/2004/memorias2004/144\\_perez\\_moreno\\_wpc2004.pdf](http://www.world-pepper.org/2004/memorias2004/144_perez_moreno_wpc2004.pdf)
13. Porta, B. 2009. Diagnóstico de *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. asociados a pudriciones radiculares y de tallo en hortalizas de exportación en el departamento de Chimaltenango. Tesis Inga. Agra. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 160 p.
14. Reyes, L. 2008. Prospección de enfermedades de raíces y tallos en el cultivo de flores de corte en San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis Inga. Agra. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 132 p.
15. Rodríguez Sánchez, IP; Barrera Saldaña, HA. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención (en línea). Ciencia UANL 7(3):223-235. Argentina, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. Consultada el 27 de julio del 2,009. Disponible en <http://www.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/87/material/PCR%20-%20Teoria.pdf>
16. Satz, ML; Kornblihtt, AR. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa: el método y sus aplicaciones (en línea). Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy 4(23):. Consultado 7 oct 2008. Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm>
17. Singleton, L; Mihail, J; Rush, C. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. US, American Phytopathological Society Press. 265 p.
18. Villega, SJ. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary (en línea). Medellín, Colombia, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Consultado 10 oct 2008. Disponible en: <http://www.reuna.unalmed.edu.co/temporales/memorias/Monografia.pdf>
19. Volcy, C. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología: una revisión (en línea). Agronomía Colombiana 26(1):107-115.

Consultado 6 jul 2009. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1/v26n1a13.pdf>

20. Wikipedia.com. 2009. Jutiapa (en línea). España. Consultado 13 oct 2008. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Jutiapa>
21. \_\_\_\_\_. 2009. Salamá (en línea). España. Consultado 13 oct 2008. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Salama>
22. Yañez Amayo, VO. 2009. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas* (L) Lam) (en línea). Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Consultado 10 oct 2008. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/tesis/Basic/Ya%C3%B1ez\\_A\\_V/introducci%C3%B3n.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/tesis/Basic/Ya%C3%B1ez_A_V/introducci%C3%B3n.htm)

## 2.10 APÉNDICE

### A. Medios de cultivo para aislamiento de *Phytophthora capsici*

- **Caldo de papa agarizado y glucosado (PDA)**

39 grs. De PDA

1000 ml de agua

Disolver el medio en agua esterilizada en un recipiente resistente (erlenmeyer) apto para autoclave. Esterilizar por 15 minutos a 125°, el llenado de cajas petri se realizará en la campana de flujo laminar para evitar contaminación tomando todas las medidas de asepsia.

- **Corn meal Agar.**

19 g de corn meal agar (Diffco)

1000 ml de agua destilada

Disolver los ingredientes hasta homogeneizar. Llevar a autoclave y esterilizar durante 15 min a 125 ° C.

- **PARPBH**

Las siglas PARPBH significan:

(CMA+PIMARICINA+AMPICILINA+RIFAMPICINA+PCNB+BENOMILO+HYMEXAZOL)

**Pimaricina:** antibiótico de Polyene; activo contra la mayoría de los hongos excepto la familia Pythiaceae del reino de los Oomicetes (12)

**Ampicilina:** antibiótico; activo contra las bacterias gram-positivas.

**Rifampicina:** antibiótico macrocíclico; predominando activo contra mycobacterias y las bacterias gram-negativas.

**PCNB:** Fungicida; pentachloranitrobenzeno. En tierra es activo contra muchos hongos pero no Oomicetes.

**Himexazol:** fungicida; 3-hidroxy-5-methyl isoxyazole; tóxico a muchos pero no a especies de *Pythium* y a muchas especies de *Mortierella*.; no tóxico (25-50 mg/Lt) a muchas especies de *Phytophthora*.

CMA	1000 ml
Pimaricina	0.4 ml
Ampicilina	0.150g
Rifampicina	0.01 g
PCNB	0.1 g
Benomilo	0.2 g
Hymexazol	0.069 ml

Al momento de agregar los antibióticos el medio CMA debe estar a una temperatura no mayor de 40 °C, pues los antibióticos y fungicidas utilizados son termolábiles. Los reactivos deberán agregarse en el orden establecido. El PCNB y Benomil deberán ser disueltos previamente en 10 cc de etanol al 95% y 10 cc de agua destilada. Luego colocar el medio de cultivo selectivo en cajas de Petri.

- **Medio agar V-8 (V-8 agar)**

100 ml V-8

1 gr. Carbonato de calcio

20 gr. De Agar

1000 ml de Agua Destilada

Se utilizo para conservar y aislar, *Phytophthora capsici*. Y sirvió para la esporulación de la especie.

Se aforo al volumen a un litro con agua destilada y se agrego los otros reactivos se esterilizo a 125° por 15 minutos.



### **CAPÍTULO III.**

**SERVICIOS REALIZADO EN ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN  
PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA,  
DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.**

### 3.1 PRESENTACIÓN

Las necesidades de asistencia técnica profesional en materia agrícola de parte de los pequeños y medianos agricultores es justificada debido a que no existe la instancia del sector público agrícola que desarrolle este tipo de asistencia, esto debido a que en el proceso de la reorganización del Ministerio de Agricultura efectuada en la década de los 90's desapareció de la institución la Dirección General de Servicios Agrícolas DIGESA por sus siglas, esto creó un vacío institucional dentro del agro Guatemalteco.

La idea de crear un plan piloto de Servicio de Asistencia Técnica a los Productores en Protección Vegetal es parte de la extensión Universitaria, de la Universidad de San Carlos de Guatemala de la Facultad de Agronomía principios que se está perdiendo en esta casa de estudio y dentro de la misión se encuentra que: Contribuir con el desarrollo nacional y regional generando servicios de excelencia por medio de sus programas de investigación y extensión; lo que propicia el avance de los procesos de producción agrícola y forestal, el desarrollo rural, las ciencias de la tierra, los recursos naturales renovables y el ambiente.

Dicho programa tuvo como fin último brindar asesoría técnica a los pequeños y medianos agricultores en la disciplina de la protección vegetal.

La asistencia se llevo a cabo con el apoyo de profesores titulares con especialidad y experiencia en el campo de la protección vegetal, se apoyó en la parte ejecutora con estudiantes en la fase de Ejercicio Profesional Supervisado y se contó con el apoyo logístico del Área Integrada, Área Tecnológica y del Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales (IIA).

Por ser la primera experiencia de desarrollo del plan piloto se seleccionó el municipio de San Juan Comalapa, del departamento de Chimaltenango. La selección se ha hecho en primera instancia por la inquietud del estudiante de EPS quien es oriundo de la región, se tomó en cuenta el potencial agrícola y las necesidades de los productores de esta región de asistencia técnica ya que muchos de ellos se dedican a la producción de hortalizas y frutas de exportación y para el mercado local, además se ha considerado la ubicación y la facilidad de vías de comunicación y la disposición de apoyo de la Corporación Municipal de la localidad así como la asociación Chuwi Tinamit.

## **3.2 SERVICIO ASISTENCIA TÉCNICA A PRODUCTORES, EN PROTECCIÓN VEGETAL, EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN COMALAPA, DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO.**

### **3.2.1 Objetivos**

- Crear un programa de extensión de índole no lucrativa que apoye a los pequeños y medianos agricultores donde se asista en forma personalizada en el área de conocimiento de la protección vegetal.
- Brindar asistencia técnica al productor en protección de planta en el municipio de San Juan Comalapa.
- Contribuir al desarrollo de los productores de la comunidad en el campo de agrícola.

### **3.2.2 Metodología**

#### **A. Organización**

- El programa fue ejecutado bajo la dirección y supervisión de la coordinación de la Sub Área de Protección de Plantas y con el apoyo del Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales (IIA).
- Participaron dentro del programa en forma voluntaria profesores titulares y ayudantes de cátedra de la sub-área.
- El programa contó con el apoyo de uno o más estudiantes en la fase de Ejercicio Profesional Supervisado quienes fueron los responsables en desarrollar la ejecución logística de campo.
- La Facultad de agronomía proporciono apoyo logístico e infraestructura con los recursos de la Sub área de protección de plantas y del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales IIA.

- La actividad fue realizada dos o cuatro días al mes, una vez por semana en la localidad, se designo el día viernes para que no interferir con las actividades académicas del equipo docente de la facultad.

## **B. Implementación**

- El encargado del programa fue designado por la Coordinación de la Sub-área de Protección de Plantas, quien fue responsable de coordinar las acciones de contactos con las municipalidades, Organizaciones de Servicios y Empresas privadas que colaboraron con el programa.
- El facilitador del programa se encargó de realizar contactos con la corporación municipales, cocodes, Asociaciones etc. para implementar el programa en municipios en los cuales la actividad de producción agrícola es de importancia económica.
- Las aldeas del municipio fueron seleccionados con base a los criterios de orden de importancia y que por su actividad agrícola necesiten de asistencia técnica, que contaran con facilidad de vías de acceso y comunicación.
- Los pasos para la implementación del programa fueron los siguientes:
  - Contactar al alcalde municipal se le expuso sobre los beneficios que recibiría la comunidad y el apoyo que se requería para la implementación básicamente consistiría en:
    - Un sitio adecuado para atender a los productores que requirieran asistencia técnica del programa,
    - Medio de transporte para conducirse hacia las parcelas de los productores,

- Apoyo logístico de material y equipo de oficina para redactar e imprimir informes para los productores.
  - Facilitar de medios de comunicación para la difusión del programa en la región.
- Se contacto con instituciones comunitarias, cocodes e iniciativa privada para solicitarles apoyo para la ejecución del programa
  - Se realizo un convenio de cooperación mutua entre las entidades de apoyo y la Sub-área de Protección de Plantas de la Facultad de Agronomía
  - Para la implementación del programa Asistencia Técnica a Productores tuvo una duración no mayor al programa de EPS.

Para poder llevar a cabo este servicio:

- a. Se realizó la recopilación de aspectos relacionados con información general de las actividades agrícolas.
- b. Se trabajo con las organizaciones existentes en la comunidad (COCODES), y la población en general que estuviese interesado en aceptar asesoría técnica para sus productos.
- c. Se planifico la distribución de las comunidades para la asesoría.
- d. Una vez establecida la promoción del programa se brindo asesoría técnica los días viernes con visita de campo a sus parcelas de cultivo, por Ingenieros Agrónomos de la Faculta de Agronomía.
- e. Las muestras que presentaron síntomas de enfermedad se recolecto y se analizo en el laboratorio protección de plantas de la FAUSAC, identificando el agente casual.

### **C. Evaluación de Resultados**

Se implemento el Programa de Asistencia Técnica en Protección Vegetal en el municipio de San Juan Comalapa, en sus diferentes aldeas, con una duración no mayor al programa de EPS (octubre 2008 a mayo 2009).

De suma importancia fue implementar el primer programa de extensión universitaria, para cumplir dar a conocer uno de los objetivos de la Facultad de Agronomía: Contribuir al desarrollo sostenible en la producción agrícola y en el manejo de los recursos naturales renovables del país, con la finalidad de elevar la calidad de vida de los guatemaltecos.

La mayoría de los productores no saben o no tienen la capacidad de identificar las diferentes plagas y enfermedades que afectan a los cultivos y esto incrementa el riesgo o la amenaza de pérdida de la producción que afecta directamente la economía familiar.

Antes de la ejecución del servicio, se definieron algunas metas para su evaluación primera. Demanda de solicitudes para la ejecución del programa en las comunidades con la finalidad de recabar información y realizar un diagnóstico del manejo de cultivos.

La problemática encontrada durante la ejecución fue que los agricultores no se encontraban de acuerdo con la asesoría proporcionada ya que demandaban equipo de trabajo y químicos (azadones, bombas de fumigación, fungicidas, fertilizantes etc.)

### **3.3 SERVICIO II APOYO TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO AL PROYECTO FODECYT 01-2007, TITULADO “DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE OOMYCETOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE EXPORTACIÓN EN LA REGIÓN CENTRAL DE GUATEMALA” USAC-UPV.**

#### **A. Objetivos**

- Dar apoyo técnico y administrativo al proyecto FODECYT 01-2007 durante su periodo de su ejecución.
- Realizar actividades de laboratorio, aislamiento y conservación de cepas de los patógenos detectados.
- Realizar actividades administrativas de gestión y control para el proyecto FODECYT.

#### **B. Metodología**

De acuerdo a los objetivos del proyecto y las actividades programadas para su ejecución, se realizaron muestreos en la región central de Guatemala en cultivos de exportación con síntomas de los patógenos.

Con base al protocolo elaborado en el laboratorio de fitopatología se procedió al análisis de las muestras, aislamiento y conservación de las cepas *Phytophthora* y *Pythium*.

Los departamentos muestreados fueron Guatemala, Chimaltenango y Sacatepéquez. El tipo de muestreo fue dirigido.

Se llevó un registro de muestras tomadas y que resultaron positivas, para luego elaborar un listado de patógenos detectados.

Se realizaron pruebas de patogenicidad para determinar si los agentes detectados y aislados fueron los responsables del daño observado (Postulados de Koch).

Se participó en la elaboración del informe final presentado conjuntamente con la Universidad Politécnica de Valencia, con los resultados obtenidos.

### C. Apoyo a la administración financiera del proyecto FODECYT 01-2007

Durante el período de ejecución del proyecto, se llevaron a cabo actividades relacionadas con la administración financiera del proyecto FODECYT 01-2007, tales como la elaboración de informes mensuales de actividades realizadas, colaboración en la elaboración de informes técnicos trimestrales, elaboración de mapas, solicitudes mensuales de incentivos a la investigación científica en el proyecto, solicitudes de compra de materiales.

### D. Resultados

Uno de los componentes del proyecto es obtener un listado de los lugares muestreados, cultivo y agente encontrado.

**Cuadro 15** Listado general del proyecto 01-2007

DEPARTAMENTO	ESPECIE ASOCIADA	CULTIVOS AFECTADOS
GUATEMALA	<i>Pythium ultimum</i>	Azucena, <i>Lilium sp.</i>
	<i>Pythium sylvaticum</i>	Esparrago ornamental, <i>Asparagus sp.</i>
	<i>Pythium splendens</i>	Esparrago ornamental, <i>Asparagus sp.</i>
	<i>Pythium amazonianum</i>	Cheflera, <i>Schefflera actinophylla</i>
	<i>Pythium sp.</i>	Lirio, <i>Iris L.</i> , Crisantemo <i>Chrysanthemum L. (1753)</i> , Tomate, <i>Lycopersicon esculentum Mill., nom. cons.</i> Ciprés, Café, <i>Coffea L.</i> Aguacate, <i>Persea americana Mill.</i>
	<i>Phytophthora tropicalis.</i>	Rosa, <i>Rosa L.</i> , Pothos, <i>Epipremnum pinnatum (L.) Engl.</i> , Clavel <i>Dianthus caryophyllus</i>
	<i>Phytophthora sp.</i>	Chile Pimiento, <i>Capsicum annuum</i> , Tomate, <i>Lycopersicon esculentum Mill., nom. cons.</i> Aguacate, <i>Persea americana Mill.</i>
CHIMALTENANGO	<i>Pythium sp.</i>	Lechuga, <i>Lactuca sativa L.</i> Arveja china, <i>Pisum sativum L.</i> , Repollo, <i>Brassica oleracea var. capitata</i> , Lechuga, <i>Lactuca sativa L.</i> Brócoli, <i>Brassica oleracea var. Capitata</i> , Frijol ejotero, <i>Phaseolus vulgaris</i> , Chile pimiento, <i>Capsicum annuum</i> , Papa <i>Solanum tuberosum L. (1753)</i>
	<i>Phytophthora sp.</i>	Fresa, <i>Fragaria ananassa Duchesne</i> , Chile pimiento, <i>Capsicum annuum</i> , Aguacate <i>Persea americana Mill</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>	Chile pimiento <i>Capsicum annuum</i>
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Tomate*** <i>Lycopersicon esculentum Mill., nom. cons.</i> El patógeno fue aislado del suelo.
SACATEPEQUEZ	<i>Phytophthora sp</i>	Chile Pimiento, <i>Capsicum annuum</i> , Tomate, <i>Lycopersicon esculentum Mill., nom. cons.</i> , Aguacate, <i>Persea americana Mill</i>
	<i>Pythium sp</i>	Cipres, <i>Cupressus sp.</i> Café, <i>Coffea L.</i>



BAJA VERAPAZ	<i>Phytophthora capsici</i>	Chile pimiento <i>Capsicum annuum</i>
SANTA ROSA	<i>Phytophthora palmivora</i>	Papaya <i>Carica papaya</i> L.
	<i>Phytophthora parasitica</i>	Limon, <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.
	<i>Phytophthora capsici</i>	Chile serrano <i>Capsicum annuum</i>
	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	Chile serrano <i>Capsicum annuum</i>
	<i>Pythium amazonianum</i>	Chile serrano <i>Capsicum annuum</i>
SAN MARCOS	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Aguacate <i>Persea americana</i> Mill
SUCHITEPEQUEZ	<i>Phytophthora palmivora</i>	Cacao <i>Theobroma cacao</i> L.
IZABAL	<i>Phytophthora palmivora</i>	Cacao <i>Theobroma cacao</i> L.
JUTIAPA	<i>Phytophthora capsici</i>	Chile pimiento <i>Capsicum annuum</i>
ESCUINTLA	<i>Phytophthora parasitica</i>	Palo blanco <i>Rosendendrom donell smitthii</i>

### E. Evaluación

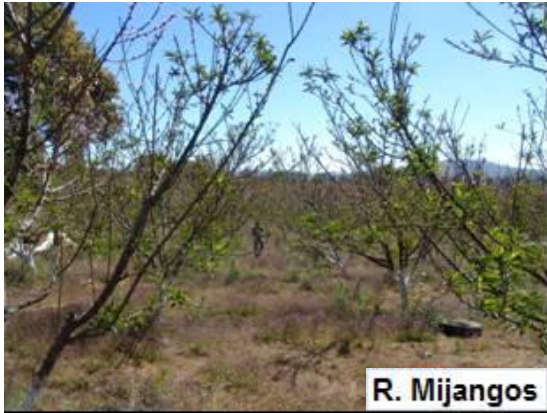
Se logró cumplir con las actividades programadas para el proyecto FODECYT 01-2007, Las actividades realizadas en el Laboratorio de Fitopatología resultaron en el avance positivo del proyecto, pudiendo cumplir con la programación de actividades dirigidas al aislamiento de *Phytophthora* y *Pythium*. Y a la conservación de cepas de los patógenos.

Además las actividades administrativas fueron realizadas de acuerdo a lo requerido por la SENACYT, por lo que no hubo inconvenientes para la ejecución financiera del proyecto.

### 3.4 REFERENCIAS BIBIOGRAFICAS

1. Facultad de Agronomía, Reseña Histórica (en línea) Consultada el 15 de oct. 2008. Disponible en <http://nuevos.usac.edu.gt/archivos/cagronomia.pdf>
2. Porta, B. 2009. Diagnóstico de *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. asociados a pudriciones radiculares y de tallo en hortalizas de exportación en el departamento de Chimaltenango. Tesis Inga. Agra. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 160 p.
3. Reyes, L. 2008. Prospección de enfermedades de raíces y tallos en el cultivo de flores de corte en San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis Inga. Agra. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 132 p.
4. Sitio web oficial de la municipalidad de San Juan Comalapa (en línea) Consultada el 12 de oct. 2008. Disponible en <http://www.inforpressca.com/sanjuancomalapa/diagnostico.php>

**3.5 ANEXOS**



Plantación de durazno



Capacitación a grupo de agricultores cultivo de durazno.



Capacitación cultivo de fresa



Pudrición de raíces cultivo fresa



Grupo de trabajo asistencia técnica

**Figura 40** capacitación a grupo de agricultores de la comunidad a cargo de Ingenieros, Auxiliar de cátedra y estudiante de EPS.

ING. AGR. GUSTAVO ADOLFO ALVAREZ V  
 PROFESOR TITULAR VI  
 COORDINADOR PROGRAMA

INGA. AGR. ANA CRISTINA BARILLAS  
 AUXILIAR DE CÁTEDRA

ING. AGR. MsC. SAMUEL CORDOVA  
 COORDINADOR  
 SUB AREA PROTECCION DE PLANTAS

RONI MIJANGOS CHEX  
 ESTUDIANTE  
 EPS  
 EJECUTOR PROGRAMA

ING. AGR. CARLOS GONZALES  
 PROFESOR TITULAR I  
 EJECUTOR PROGRAMA

ING. AGR. MsC. Helsler Gómez  
 PROFESOR INTERINO  
 SUB AREA PROTECCION PLANTAS

**Cuadro 16** Listado de integrantes Cocodes San Juan Comalapa

<b>No.</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>COMUNIDAD</b>	<b>TELEFONO</b>	<b>CARGO</b>
1	Petronilo Chonay	Agua Caliente	50622542	
2	Rolando Roca	Agua Caliente	50087664	Alcalde auxiliar
3	Santos Quina	Agua Caliente	57391403	
4	Justo Quina	Agua Caliente	45281786	
5	Petronilo Chonay	Agua Caliente		
6	Arnoldo Avila	Agua Caliente	57083897	
7	Joel Mux	Cojol juyu		
8	Anibal Raxjal	Cojol juyu	58360692	
9	Rolando Chalí Lopez	Cojol juyu		
10	Flavio Curruchich Tartón	Pavit		
11	Mariano Quina	Pavit		
12	Reyes Cumez	Payá	58093401	
13	Julian Caná	Payá	53561612	
14	Hugo Rolando Chalí	Patzaj	58185209	Alcalde auxiliar
15	Rogoberto Miza	Patzaj	57586674	
16	Pascual Cutzal Simón	Patzaj		
17	Santos Virgilio Guerra	Patzaj		
18	Cesar Yool perez	Pachitur	45320833	
19	Maynor Anibal Sucuc	Pachitur		
20	Emiliano Mux	Paraxaj		
21	Enrique Tuctuc	Paraxaj	43235144	Alcalde auxiliar
22	Miguel Tubin	Paraxaj	53484442	
23	Santiago Garcia	Paraxaj		
24	José Luis Mux Peren	Paraxaj		
25	Porfirio Cutzal Mijango	Panimacac	57371829	
26	Juan Ambrocio Mijango	Panimacac		
27	Juan Jose Morales	panabajal		
28	Oscar Cutzal	panabajal		
29	David Son	Panabajal		
30	Rutilio ordoñez	Panabajal		
31	Isidro Tocorá	Panabajal		
32	Manuel Elizar Similox	Panabajal	59030057	Alcalde auxiliar
33	Justo Coló Calel	Panabajal		
34	Fermin Raymundo Tecun	Panabajal		
35	Renato perén	pamumus		
36	Coronado Raxjal Pichiya	pamumus		
37	Jose Hermelindo Estepan	Panicuy		
38	Miguel Chalí Sucuc	Chichali		
39	Sergio Rolando Pichiyá	Paquixic		
40	Juan Vicente Sotz	Paquixic		
41	Carlos Peren Xocop	Paquixic		
42	Carmelino Mux	Paquixic		
43	Isabel Saquiquel	Paquixic		

44	Alfredo Telon	Paquixic		
45	Reginaldo Pichiya Culajay	Caserio Quizaya	53680431	
46	Marcial Cumar Simón	Caserio Quizaya	40957535	
47	Hilario Chalí	Caserio Chichalí		
48	Mario Colaj Semeyá	Simajhuleu		
49	Federico Lopez Lopez	Simajhuleu		
50	Perfecto Otzoy Culajay	Simajhuleu		
51	Martín Paz Chex	Simajhuleu		
52	Rogelio Culajay Garcia	Simajhuleu		
53	Lazaro Serrech Pichiya	Simajhuleu		
54	Marcial Pichiya Cutzal	Simajhuleu		
55	Federico Lopez	Samajhuleu	55569098	
56	Mario Colaj Semeyá	Simajhuleu	57056494	
57	Marcial Pichiya Patzan	Simajhuleu	51543497	Alcalde auxiliar
58	Perfecto Otzoy	Simajhuleu	58066393	
59	José Ruperto Montufar	Chirujuyu	50393131	
60	Francisco Guerra Juarez	Chirujuyu		
61	Rocael Maxia	Xenimaquin		
62	martin de Leon Catú	Xenimaquin	45084173	
63	Otto Leonel Perez	Xetonox	55218623	
64	René Ordoñez	Xetonox		
65	Marcos Curruchich Tubac	Xiquin Sanaí	58473040	
66	Esteban Tubac	Xiquin Sanaí	el mismo	Alcalde auxiliar
67	Dionicio Calicio	Xiquin Sanaí	el mismo	