



ANTAGONISMO DE *Penicillium* sp. CONTRA *Phytophthora capsici* (Leonian)

ANTAGONISM BY *Penicillium* sp. AGAINST *Phytophthora capsici* (Leonian)

Abraham Jiménez-Camargo¹, Ernestina Valadez-Moctezuma² y Héctor Lozoya-Saldaña^{2*}

¹Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, ²Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Chapingo, Texcoco, Estado de México.

*Autor para correspondencia (picti87@gmail.com)

RESUMEN

La marchitez del chile (*Capsicum annuum*) es causada por un complejo de hongos fitopatógenos del suelo, entre los que se encuentra *Phytophthora capsici* (Leonian) y ocasiona pérdidas en rendimiento del fruto desde el 10 hasta el 100 %; no obstante, hay suelos supresores que contienen microorganismos como *Penicillium* sp., antagonísticos al oomiceto. Con este antecedente, se hicieron recolectas de ambos microorganismos en campo, mayormente en el Bajío guanajuatense, México, con el objetivo de identificar posible variabilidad a nivel molecular entre las cepas de los microorganismos aislados y su relación con su acción antagonística. Se determinaron los efectos antagonísticos *in vitro* e *in vivo* de aislados selectos de *Penicillium* spp. sobre la cepa de *P. capsici* identificada como la más agresiva, así como el modo del control biológico del antagonista. Los agrupamientos de las cepas de *Penicillium* spp. no coincidieron con su acción antagonística sobre *P. capsici* (agrupamientos distantes ejercieron acciones similares de antagonismo), aunque la agresividad de *P. capsici* sí se asoció con un grupo en el que diferentes enzimas de restricción (*Hha* I, *Hinf* I y *Hae* III) no detectaron polimorfismos. De las 47 cepas de *Penicillium* spp. y siete de *P. capsici* obtenidas, se seleccionaron 30 del antagonista para la confrontación *in vitro* con la cepa más agresiva de *P. capsici*. Con los resultados de este ensayo se seleccionaron nueve antagonistas para la confrontación *in vivo*, de los que sobresalieron en esta prueba seis aislamientos, que sólo permitieron de 5 a 21 % de infección, en comparación con 85 % del testigo inoculado con el patógeno en ausencia de antagonistas. El efecto antagonístico fue una combinación de inhibición por antibiosis, competencia por espacio y desintegración de micelio.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, RFLP, ISSR, marchitez del chile.

SUMMARY

Pepper (*Capsicum annuum*) wilting is caused by a complex of soil pathogenic fungi, among which *Phytophthora capsici* (Leonian) causes losses in fruit yield from 10 to 100 %; however, there are suppressing soils containing microorganisms such as *Penicillium* sp., antagonistic to the oomycete. With this background, both microorganisms were collected in the field, mostly at the Bajío region of Guanajuato, México, to identify possible molecular variability between strains of the isolated microorganisms and the relationship with their antagonistic action. Both *in vitro* and *in vivo* antagonistic effects of selected isolates of *Penicillium* spp. over the *P. capsici* strain identified as the most aggressive, as well as the mode of biological control of the antagonist were determined. The grouping of *Penicillium* strains did not coincide with their antagonistic action over *P. capsici* (distant groupings exerted similar antagonistic action), although the aggressiveness of *P. capsici*

was associated with a group in which different restriction enzymes (*Hha* I, *Hinf* I and *Hae* III) did not detect polymorphisms. Out of the 47 *Penicillium* spp. and the seven *P. capsici* strains obtained, 30 of the antagonist were selected for *in vitro* confrontation to the most aggressive *P. capsici* strain. Based on results of this assay, nine antagonists were selected for the *in vivo* confrontation, of which six isolates stood out in this test, allowing only 5 to 21 % infection, in comparison to 85 % infection of the control inoculated with the pathogen in the absence of antagonists. The antagonistic effect was a combination of inhibition by antibiosis, competition for space, and disintegration of mycelium.

Index words: *Capsicum annuum*, RFLP, ISSR, pepper wilting.

INTRODUCCIÓN

La secadera o marchitez del chile (*Capsicum annuum*), causada principalmente por el oomiceto *Phytophthora capsici* (Leonian), y en ocasiones por un complejo que además de *P. capsici* incluye a los hongos *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani*, ocasiona pérdidas en rendimiento de fruto que van desde 10 hasta 100 % (Anaya-López *et al.*, 2011; Ristaino y Johnston, 1999). La marchitez del chile es considerada como la enfermedad más importante de dicho cultivo en México. Causa pudriciones de fruto, raíz y tallo, y es policíclica, ya que completa más de un ciclo biológico durante el desarrollo del cultivo, donde las plantas enfermas sirven de fuente de inóculo para infecciones secundarias (Castro *et al.*, 2012; Erwin y Ribeiro, 1996; Silva-Rojas *et al.*, 2009).

Durante los últimos 30 años en México el problema ha afectado del 60 al 100 % de la superficie cultivada. Se reporta la enfermedad en todos los estados productores de chile (Castro *et al.*, 2012; Mendoza, 1996). En Guanajuato se reportó reducción de la superficie sembrada de 6568 a 3097 ha, entre los años 2000 y 2005, debido, principalmente, al problema arriba expuesto; no obstante, para el año 2016, se reportaron en el estado de Guanajuato 4616 ha del cultivo, con un rendimiento promedio de 22.25 t ha⁻¹, superior al promedio nacional de 19.28 t ha⁻¹ (SIAP, 2017). La aplicación de fungicidas ha sido efectiva en su manejo;

sin embargo, ésto eleva los costos de producción, por lo que una alternativa es el uso de microorganismos que tengan la capacidad de ejercer control biológico (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007); por ejemplo, *Penicillium* es un género productor de polisacáridos y enzimas que degradan la pectina, además de secretar glucanasas, celulasas, hemicelulasas y otras enzimas que degradan la pared celular del patógeno (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Kang *et al.*, 2003).

Entre los mecanismos de acción de los microorganismos antagonísticos se identifica la antibiosis, donde los metabolitos microbianos ejercen acción biocida sobre el fitopatógeno, ya sea por toxicidad, acción lítica u otras conducentes a la inhibición metabólica. También está la competencia entre la microflora y los patógenos por espacio, por hospederos o por nutrientes, sobre todo cuando el objeto de la competencia es limitado. El parasitismo es otro mecanismo de acción directa y unilateral, donde se ve afectado el fitopatógeno por el parásito (Guillén-Cruz *et al.*, 2006).

Con base en lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos: a) identificar posible variabilidad molecular y agrupamientos entre las cepas de los microorganismos aislados y su relación con su acción antagonística, b) cuantificar los efectos antagonísticos *in vitro* e *in vivo* de aislados de *Penicillium* sp. sobre *Phytophthora capsici*, y c) determinar el modo de acción de dicho antagonismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras, aislamientos, cultivo *in vitro*, identificación

Los muestreos de plantas y suelo se realizaron en diversas localidades de los estados de Guanajuato y México (Cuadros 1 y 2). El material vegetal colectado de diferentes partes de la planta se lavó con hipoclorito de sodio comercial al 2.5 % (v/v) y con alcohol etílico al 70 %; se hicieron cortes de tejido y se sembraron en medio de papa dextrosa agar (PDA), posteriormente se incubaron a 27 °C. De las muestras de suelo se tomaron 10 g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 150 mL, se agregaron 90 mL de agua destilada estéril y se llevó a un volumen de 1000 µL, de éste se tomaron 50 µL y de forma individual se distribuyeron en cajas de Petri con medio PDA, se incubaron a 27 °C de 7 a 10 días (d). Los esporangios germinados se localizaron con un microscopio, se transfirieron a cajas nuevas con PDA y se incubaron a 27 °C para su posterior utilización (French y Hebert, 1982).

Las muestras de suelo se tomaron de la rizósfera de plantas de siembras comerciales. Para el aislamiento de *P. capsici* de suelo se utilizó la técnica de trampa-cebo o

atractivo vegetal. Se pesaron 30 g de suelo, mismos que fueron colocados en un frasco de vidrio, se agregaron 40 mL de agua destilada estéril y se colocó un fruto de chile serrano previamente lavado y desinfectado de 7 a 10 d a 25 °C, se aisló y purificó el crecimiento de micelio algodonoso con la técnica de punta de hifa. Se sembró una porción del micelio en medio agar agua. Se apreciaron hifas separadas dentro del medio de cultivo, y se hizo un corte detrás de la célula terminal de la hifa, la cual se transfirió a medio PDA y se incubó a 27 °C. Las cepas aisladas de *Penicillium* spp. se transfirieron a medio PDA, donde se describió la forma y color de colonia con base en las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972). Para la obtención de las cepas de *Phytophthora capsici*, los tejidos se sembraron en medio de cultivo V8 y se identificaron morfológicamente, de acuerdo con Erwin y Ribeiro (1996).

Extracción y purificación de ADN, PCR-RFLP, PCR-ISSR, agrupamientos

Para la extracción de ADN se utilizó la técnica del amortiguador CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1987; Weising *et al.*, 2005). El CTAB al 2 % se calentó a 60 °C, se extrajo micelio de la cepa purificada y se colocó dentro del tubo con CTAB. Se incubó a 80 °C durante 60 min, se centrifugó durante 5 min a 10,000 × g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se adicionaron 500 µL de cloroformo-isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó nuevamente por 10 min a 10,000 × g. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo, se lavó con 700 µL de cloroformo-isoamílico (24:1) y se volvió a centrifugar por 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se llevó a otro tubo con 950 µL de etanol al 100 % previamente enfriado, se incubó por 2 h a -20 °C, se centrifugó a 10,000 × g por 30 min, se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 400 µL de amortiguador Tris-EDTA (TE) y se incubó a 55 °C por 15 min. Se añadieron 34 µL de acetato de sodio 3 M más 1 mL de etanol al 95 % y se incubó a -20 °C por 1 h, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 600 µL de isopropanol al 70 %. Se centrifugó por 5 min a la misma velocidad que en los pasos anteriores y se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 100 µL de TE y se almacenó a -20 °C. Para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Para el revelado, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) durante 10 min, después se enjuagó en agua destilada por 10 min y se analizó en un fotodocumentador (Modelo Universal Hood II, BIORAD®, Palo Alto, CA, USA) con el programa QuantityOne®. Para amplificar la región ribosomal del ADN de los hongos se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores de espaciadores internos transcritos (PCR-ITS,

Cuadro 1. Origen de los aislamientos de *Phytophthora capsici*.

Cepa	Localidad	Fuente del aislamiento
Phy-1	C7P8F7, Lab. Biotecnología (CEBAJ, INIFAP)	Planta de chile
Phy-2	Dolores Hidalgo, Guanajuato.	Planta de chile
Phy-3	Juventino Rosas, Guanajuato.	Planta de tomate
Phy-4	San José Iturbide, Guanajuato.	Planta de tomate cherry
Phy-5	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	Planta de chile
Phy-6	Rancho Canta Ranas, Abasolo, Guanajuato.	Planta de tomate
Phy-7	Rancho el Palomar, Abasolo, Guanajuato.	Suelo (tomate)
Phy-8	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	Suelo (chile)

por sus siglas en inglés) 5HP y NL4. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, 35 ciclos (94 °C por 1 min; 58 °C por 1 min; 72 °C por 2 min) y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2 %.

Para la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLPs) se utilizó el producto de PCR de la región ITS más las enzimas de restricción *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III. La reacción de digestión se preparó de acuerdo con las especificaciones de cada fabricante. La visualización de los cortes producidos por las enzimas se hizo en geles de acrilamida. Para la técnica de PCR con marcadores de secuencia de repetición simple interna (PCR-ISSR, por sus siglas en inglés) se utilizaron los iniciadores (AC)₈YG y AC(GACA)₄. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 35 ciclos (95 °C por 30 s, 55 o 46 °C por 45 s, 72 °C por 2 min) y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min.

Para la separación de los fragmentos amplificados se utilizó una cámara vertical. Los geles se revelaron con varias soluciones: 1) solución fijadora de etanol al 10 % y ácido acético al 1 % durante 10 min, 2) solución de tinción con nitrato de plata al 0.2 % durante 10 min, 3) enjuague con agua destilada, y 4) solución reveladora de hidróxido de sodio al 3 % con formaldehído (100 µL por cada 100 mL) hasta la visualización de las bandas. Se generó una matriz binaria que se llevó al programa FreeTree© versión 0.9.1.50 para ser analizada mediante el índice Jaccard y el método de construcción de árbol de agrupamiento par con media aritmética no ponderada UPGMA. Para visualizar el dendrograma se utilizó el programa TreeView© versión 1.6.6.

Patogenicidad de *Phytophthora capsici*

Las cepas de *P. capsici* que se aislaron previamente se sembraron en los medios PDA y V8 para registrar el

crecimiento diario y, posteriormente, calcular su velocidad de crecimiento en cada uno de los medios. Para cuantificar el grado de patogenicidad e identificar la cepa más agresiva, se evaluaron ocho aislamientos de *P. capsici* (Phy-1, Phy-2, Phy-3, Phy-4, Phy-5, Phy-6, Phy-7 y Phy-8) bajo un diseño completamente al azar con nueve repeticiones. Cada aislamiento correspondió a un tratamiento, y la unidad experimental correspondió a una planta individual inoculada. Se utilizó la variedad de chile Anaheim (tipo común, California chile), ampliamente reconocida como susceptible. Se colocaron en frascos de vidrio plantas con tres hojas verdaderas, cada frasco con agua destilada estéril y fragmentos de medio de cultivo V8 con micelio de *P. capsici*. Se registró la incidencia y severidad para determinar la cepa más agresiva y así utilizar sólo ésta en los siguientes estudios. Para la incidencia de la enfermedad (IE) se aplicó la fórmula de Wolcan *et al.* (2001). La severidad se estimó con la escala de daño de Bosland y Lindsey (1991). La cepa que resultó más agresiva (Phy-2) se utilizó para las confrontaciones posteriores.

Confrontaciones *in vitro*

Con base en los resultados obtenidos en los RFLPs de *Penicillium* sp. se generaron grupos genéticamente cercanos de los cuales se tomaron aislamientos representativos (flechas en la Figura 1), más otros seleccionados con base en su distribución en la Figura 2, que se utilizaron para definir los 30 tratamientos incluidos en el Cuadro 4 para las confrontaciones *in vitro*. Dichas confrontaciones se hicieron únicamente contra la cepa Phy-2 de *P. capsici*, que resultó la más agresiva. Cada confrontación tuvo cuatro repeticiones.

En cajas de Petri de 10 cm de diámetro con medio PDA se colocaron los organismos a 1 cm de la orilla de la caja. Primero se colocaron las cepas de *Penicillium* spp. mediante la impregnación de una suspensión de conidios en papel filtro a una concentración de 4×10^6 (Fang y Tsao, 1995) y se incubó a 27 °C. Al siguiente día la cepa Phy-2

Cuadro 2. Origen de los aislamientos de *Penicillium* spp.

Cepa	Localidad	Hospedante	Cepa	Localidad	Hospedante
Pe01	Lab. Fitopatol. INIFAP Celaya, Gto.	Ambiente (Laboratorio)	Pe25	Rancho Aguilares San Francisco, Gto.	Suelo
Pe02	Lab. Fitopatol. INIFAP Celaya, Gto.	Papa	Pe26	San Martin de las Pirámides, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe03	Lab. Fitopatol. INIFAP Celaya, Gto.	Papa	Pe27	San Martin de las Pirámides, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe04	Ezequiel Montes, Querétaro.	Ajo	Pe28	Nopaltepec, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe05	Lab. Fitopatol. INIFAP Celaya, Gto.	Ajo	Pe29	Axapusco, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe06	Rancho la Purísima, San Miguel de Allende, Gto.	Ajo	Pe30	Nopaltepec, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe07	Cuautlalpan, Texcoco, Edo. de México.	Chile serrano	Pe31	Acolman, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe08	Chapingo, Texcoco, Edo. de México.	Pan	Pe32	Nopaltepec, Edo. de México	Suelo (nopal)
Pe09	Col. Lomas de la Estrella, Cd. de México.	Naranja	Pe33	Rancho Canta Ranas, Abasolo, Gto.	Suelo (tomate)
P10	Cuautlalpan, Texcoco, Edo. de México.	Mandarina	Pe34	Rancho Aguilares, San Francisco, Gto.	Suelo
Pe11	Cuautlalpan, Texcoco, Edo. de México.	Tomate	Pe35	Rancho el Palomar, Gto.	Suelo (tomate)
Pe12	Mich-1 Lab. de Fitopatología, Celaya, Gto.	Chile poblano	Pe36	INIFAP, Celaya, Gto.	Suelo (granada)
Pe13	Mich-2 Lab. de Fitopatología, Celaya, Gto.	Chile poblano	Pe37	INIFAP, Celaya, Gto.	Suelo (forestales nativas)
Pe14	Lab. Postgrado I (Depto. Parasitología), Chapingo, Texcoco, Edo. de México.	Ambiente (laboratorio)	Pe38	Texcoco, Edo. de México.	Limón
Pe15	Lab. de Micología Agrícola (Depto. Parasitología), Chapingo, Texcoco, Edo. de México.	Ambiente (laboratorio)	Pe39	Texcoco, Edo. de México.	Limón
Pe16	Lab. de Usos Múltiples (Depto. Fitotecnia), Chapingo, Texcoco, Edo. de México.	Ambiente (laboratorio)	Pe40	San Martin de las Pirámides SMP1P4.	Suelo (nopal)
Pe17	Unidad ISSSTE, Texcoco, Edo. de México.	Manzana	Pe41	Rancho Aguilares, San Francisco, Gto.	Suelo
Pe18	Unidad ISSSTE, Texcoco, Edo. de México.	Guayaba	Pe42	Rancho 4ta Brigada, Irapuato, Gto.	Suelo (chile)
Pe19	Unidad ISSSTE, Texcoco, Edo. de México.	Cebolla	Pe43	Rancho los Leones, Abasolo, Gto.	Suelo (chile)
Pe20	San Luis Huexotla, Texcoco, Edo. de México.	Sidra	Pe44	Rancho el Palomar, Gto.	Suelo (tomate)
Pe21	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	Chile (raíz)	Pe45	INIFAP, Celaya, Gto.	Suelo
Pe22	Lab. de Usos Múltiples (Depto. Fitotecnia), Chapingo, Texcoco, Edo. de México	Ambiente (laboratorio)	Pe46	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	Suelo (chile)
Pe23	INIFAP, Celaya, Gto.	Suelo (chile)	Pe47	Rancho Aguilares, San Francisco, Gto.	Suelo

Cuadro 3. Patogenicidad de *P. capsici* en plantas de chile cv. Anaheim, como porcentaje de severidad de acuerdo con la escala de daño de Bosland y Lindsey (1991).

Cepa	Severidad a los 6 d	Severidad a los 12 d
Phy-2	91.6 a	100 a
Phy-7	86.1 a	100 a
Phy-5	80.5 a	100 a
Phy-1	75.0 a	100 a
Phy-3	72.2 a	100 a
Phy-6	20.5 b	100 a
Phy-8	11.6 b	72 b
Phy-4	6.6 b	40 c
Testigo	0.0 c	0 d

Medias con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

de *P. capsici* se transfirió en cada tratamiento y repetición para iniciar la confrontación dual. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar y se evaluó cuando el tratamiento con *P. capsici* sin antagonista llenó la caja Petri, lo que ocurrió alrededor del décimo día. Para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno se aplicó la fórmula de Seema y Devaki (2012).

Para la técnica de microcultivo, a una caja con PDA se le fraccionó en cuadros de 10 × 10 mm. Cada uno de los fragmentos se colocó en el centro de un portaobjetos y un cubreobjetos en la parte superior, todo esto dentro de una caja de Petri a la que se le agregó glicerol al 10 %. El fragmento se inoculó en la parte sur por el antagonista *Penicillium* spp. con un día de ventaja, ya que es de crecimiento lento. Al día siguiente se inoculó la cepa de *Phytophthora* (Phy-2) en la parte norte del fragmento. Para establecer el grado de antagonismo se utilizó la escala de Agamez *et al.* (2009). Las cajas se incubaron a 25 °C por 8 d. Una vez que el crecimiento de micelio invadió el fragmento, se cubrió con un cubreobjetos y se colocó en un nuevo portaobjetos, el cual contenía una gota de colorante azul algodón. Al portaobjetos que contenía el fragmento de medio se le retiró éste, y en su lugar se colocó una gota del colorante azul algodón, se colocó un nuevo cubre objetos y se selló para posterior observación del mecanismo del efecto antagónico.

Confrontación *in vivo*

Con base en los resultados del experimento de la confrontación *in vitro*, se seleccionaron las 10 cepas de *Penicillium* spp. con el mejor porcentaje de inhibición para la confrontación *in vivo* (Cuadro 5). La evaluación se

realizó en un experimento bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones, donde los tratamientos fueron las cepas de *Penicillium* spp. y la unidad experimental fue una planta de chile individual. El testigo de referencia no incluyó a ninguno de los dos organismos. Cuando la plántula tuvo dos hojas verdaderas se trasplantó a vasos de unicel, se sumergió la raíz en una suspensión de conidios de los microorganismos antagonistas con una concentración de 5×10^7 mL⁻¹ por 5 min (Fang y Tsao, 1995). Al segundo día se realizó una re-inoculación de 5 mL a la misma concentración en la base del tallo. Al tercer día se inoculó *P. capsici* (cepa Phy-2) en la base de la planta, se vaciaron 5 mL de la suspensión de zoosporas (2000 zoosporas mL⁻¹, Bosland y Lindsey, 1991).

Análisis estadístico

La información obtenida se analizó mediante el programa SAS (SAS Institute, 2011) con comparación de medias (Tukey, 0.05). Las variables estudiadas fueron severidad de la enfermedad (%), inhibición (%) y antagonismo (%).

Tipo de control biológico

Con el fin de identificar el tipo de control biológico del microorganismo antagonista, se hizo un microcultivo con la técnica de Ridell o método de laminilla (Paul, 1999). Los montajes se observaron en microscopio compuesto y se documentó fotográficamente el tipo de control biológico de cada organismo evaluado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreos, aislamientos, cultivo *in vitro* e identificación

Se obtuvieron 55 cepas, de las cuales ocho fueron de *Phytophthora capsici* y 47 de *Penicillium* spp. (Cuadros 1 y 2, respectivamente). La identidad morfológica por comparación de estructuras se confirmó mediante análisis moleculares.

Agrupamientos moleculares

La región de los espaciadores internos transcritos (ITS) amplificada con los iniciadores 5 HP y NL 4 para *Penicillium* spp. y *Phytophthora capsici* fue de aproximadamente 1300 y 1500 pb, respectivamente. Las enzimas de restricción *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I produjeron polimorfismos en la región ITS de ambos microorganismos. En la Figura 1 se muestran los dendrogramas generados con la técnica de ISSR para ambos géneros. Las flechas indican los aislamientos de *Penicillium* que se consideraron como representantes de grupos diferentes, y por lo tanto, fueron seleccionados para el ensayo de confrontación

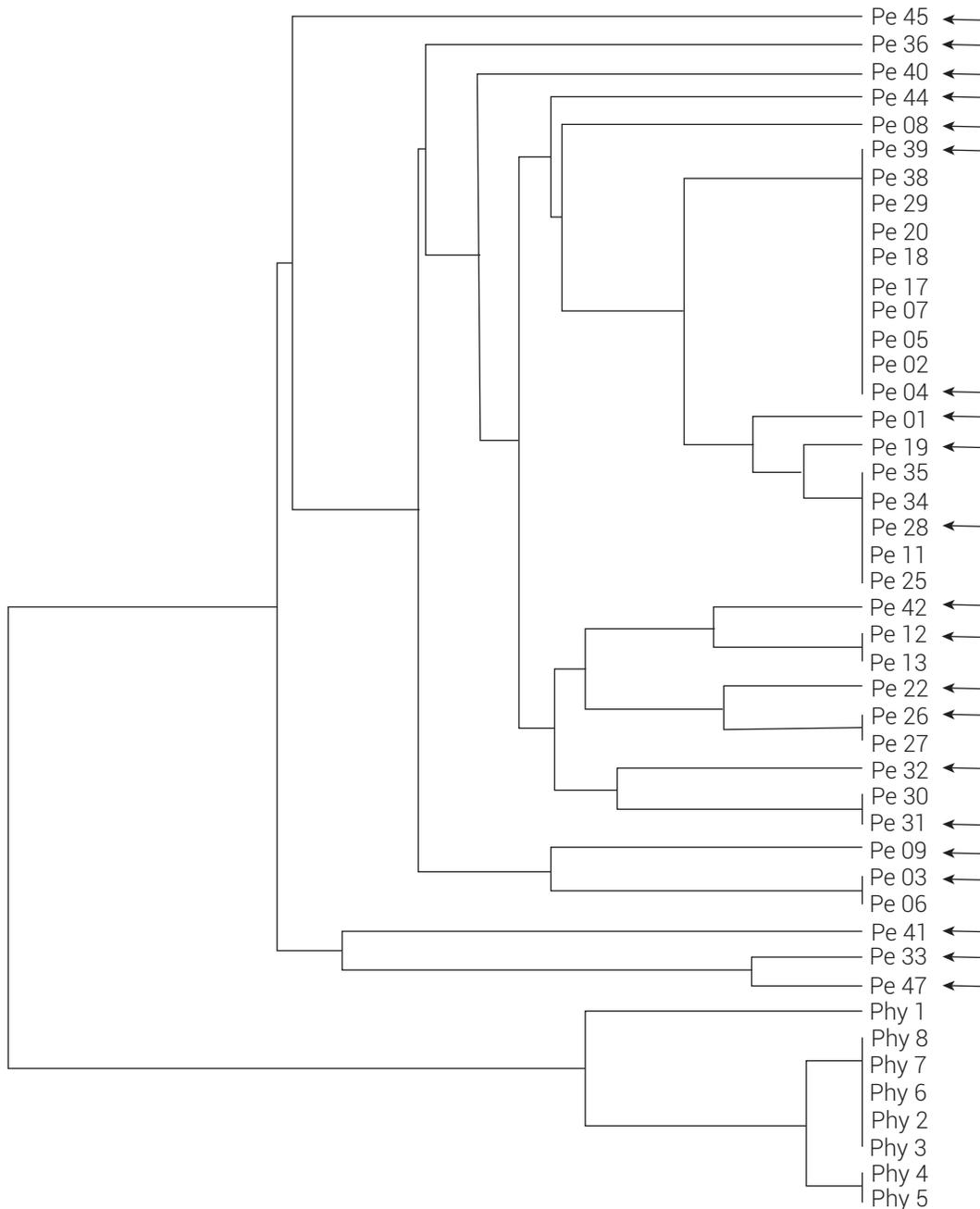


Figura 1. Agrupación de genotipos de *Penicillium* y *Phytophthora* con base en los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLPs) de la región ITS con las enzimas de restricción *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III. Pe, *Penicillium*; Phy, *Phytophthora*. Las flechas señalan las cepas seleccionadas como representantes de grupos para la confrontación.

dual. La Figura 2 corresponde al dendrograma generado con los iniciadores $(AC)_8YG$ y $(GGAT)_4$ para las cepas de *Penicillium* spp., en la cual se basó la selección de otros aislamientos para completar los tratamientos de la confrontación dual. La Figura 3 corresponde al dendrograma generado por los iniciadores $(AC)_8YG$ y $(GGAT)_4$ para las cepas de *Phytophthora capsici*; en él se aprecia que aun tratándose de la misma especie, existen diferencias.

Contrario a lo esperado, la mayor cercanía genética se observa entre aislamientos de diferentes localidades (Dolores Hidalgo, Phy-2 y Abasolo, Phy-5; San José de Iturbide, Phy-4, y Abasolo, Phy-6). En estos agrupamientos el factor hospedante pudiera explicar las cercanías, ya que los aislamientos 2 y 5 se tomaron de plantas de chile, mientras que las cepas 4 y 6 se aislaron de tomate (*Solanum lycopersicum*). Por otro lado, las mayores

Cuadro 4 Inhibición porcentual bajo condiciones de confrontación dual *in vitro*, entre cepas de *Penicillium* spp. y el aislamiento Phy-2 de *Phytophthora capsici*.

Cepa de <i>Penicillium</i>	% Inhib. a los 10 d	Cepa de <i>Penicillium</i>	% Inhib. a los 25 d
Pe42	63.66 a	Pe45	81.25 a
Pe45	58.78 a	Pe40	75.00 ab
Pe12	57.80 a	Pe47	68.75 abc
Pe33	55.61 ab	Pe33	68.75 abc
Pe32	54.03 ab	Pe42	62.50 abc
Pe47	53.45 b	Pe32	62.50 abc
Pe40	52.44 b	Pe12	56.25 abc
Pe19	51.12 b	Pe19	56.25 abc
Pe01	50.80 b	Pe31	50.00 abc
Pe23	49.58 bc	Pe08	50.00 abc
Pe26	48.26 bc	Pe15	50.00 abc
Pe24	46.95 bc	Pe44	50.00 abc
Pe28	45.94 bcd	Pe04	50.00 abc
Pe44	44.89 cd	Pe39	43.75 abcd
Pe15	44.25 cd	Pe26	43.75 abcd
Pe21	43.91 cd	Pe46	37.50 abcd
Pe04	43.74 cd	Pe28	37.50 abcd
Pe46	43.47 cd	Pe03	37.50 abcd
Pe14	43.04 cd	Pe01	37.50 abcd
Pe31	43.04 cd	Pe09	37.50 abcd
Pe03	42.36 cd	Pe21	37.50 abcd
Pe36	41.79 cd	Pe36	31.25 bcd
Pe09	41.42 cd	Pe24	31.25 bcd
Pe41	41.25 cd	Pe14	31.25 bcd
Pe39	40.85 cd	Pe43	31.25 bcd
Pe08	40.37 cd	Pe10	31.25 bcd
Pe43	39.83 cd	Pe23	31.25 bcd
Pe22	39.16 d	Pe22	31.25 bcd
Pe10	36.13 d	Pe41	25.00 cd
Phy-2	0 e	Phy-2	0 d

Medias con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

distancias se identificaron entre cepas de una misma localidad (Abasolo, Phy-7 y Phy-8), lo que también se explica por el factor hospedante, pues se tomaron de suelo con tomate (Phy-7) y de suelo con chile (Phy-8).

Patogenicidad de *Phytophthora capsici*

Eventualmente la mayoría de las cepas lograron 100 % de incidencia, pero en diferentes tiempos (Cuadro 3). A los 6 d las cepas de *P. capsici* presentaron diferencias en severidad. La comparación de medias (Tukey, 0.05) mostró

dos agrupaciones donde se definen las cepas agresivas (Phy-2, Phy-7, Phy-5, Phy-1 y Phy-3). La Phy-2 sobresale por el porcentaje de daño ocasionado, que alcanzó 91.6 % a los 6 d. Al día 12 las cepas de *P. capsici* también presentaron diferencias en severidad. En ese lapso se presentó el mismo agrupamiento de nivel de agresividad que a los 6 d, identificándose, por otro lado, a Phy 8 y Phy 4 como las menos agresivas o de infectividad más lenta (Tukey, 0.05, Cuadro 3). Con estos resultados se decidió que para las posteriores confrontaciones con *Penicillium* se utilizaría únicamente la cepa Phy-2 de *P. capsici*, obtenida de

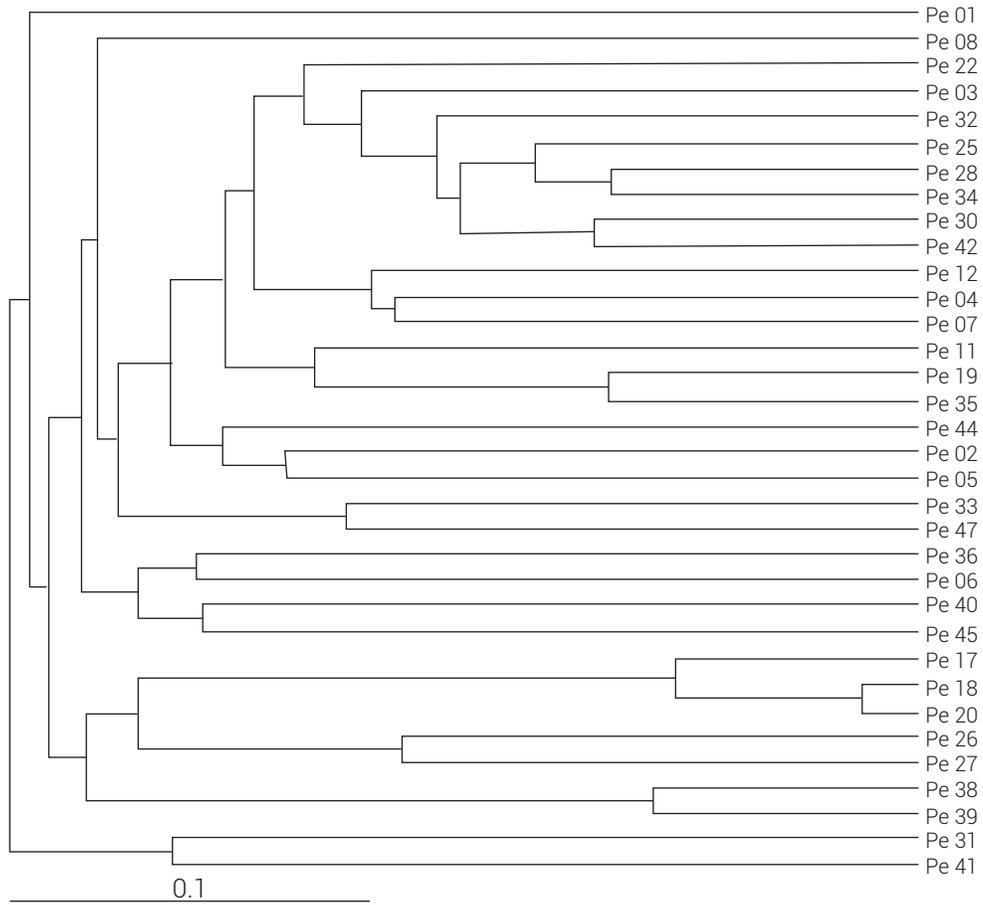


Figura 2. Agrupamiento de los genotipos de *Penicillium* basado en las secuencias genéticas generadas con los iniciadores $(AC)_8YG$ y $(GGAT)_4$.

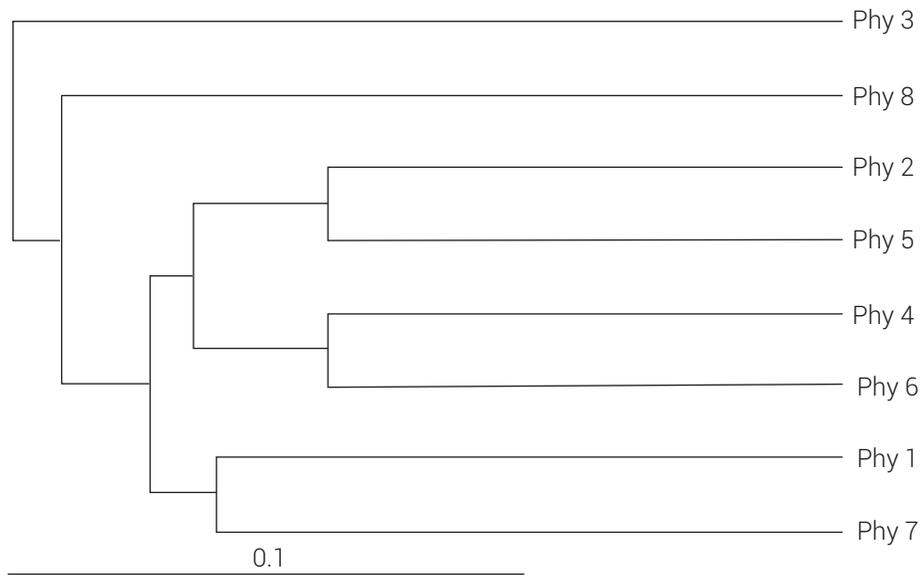


Figura 3. Agrupamiento de los genotipos de *Phytophthora capsici* con base en las secuencias genéticas generadas por los iniciadores $(AC)_8YG$ y $(GGAT)_4$.

Cuadro 5. Severidad final de la enfermedad en la confrontación *in vivo* entre cepas selectas de *Penicillium* spp. y el aislamiento Phy-2 de *P. capsici*.

Antagonista	Infección final (%)
Sin A	85.0 a
Pe32	35.0 b
Pe12	34.5 b
Pe40	28.5 b
Pe33	21.0 bc
Pe42	18.0 bc
Pe45	16.0 bc
Pe01	10.5 bc
Pe19	8.0 c
Pe47	5.5 c
Sin A, sin P	0.0 c

A: antagonista; P. patógeno. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

plantas de chile en Dolores Hidalgo, Gto. (Cuadro 1).

Confrontación *in vitro*

A los 10 d después de la instalación del ensayo, las cepas de *Penicillium* presentaron diferentes efectos de inhibición sobre el desarrollo de *Phytophthora capsici* en la confrontación *in vitro*. Las cepas más sobresalientes fueron Pe42, Pe45, Pe12, Pe33 y Pe32, con inhibiciones de 63 a 54 %, sin

diferencia estadística entre ellas (Cuadro 4). A los 25 d las cepas de *Penicillium* spp. igualmente presentaron diferentes efectos de interacción antagonónica sobre el desarrollo de *P. capsici*. En este tiempo, la cepa Pe45 resultó la mejor al presentar 81.25 % de antagonismo o inhibición de crecimiento de *P. capsici*. Otras cepas sobresalientes fueron Pe40, Pe47, Pe33, Pe42, Pe32, Pe12 y Pe19, con inhibiciones de 56 al 75 %.

Confrontación *in vivo*

Bajo condiciones *in vivo*, la comparación de medias (Tukey, 0.05) a los 10 d indicó que los tratamientos con mejor control sobre *P. capsici* fueron las cepas Pe47 y Pe19, donde se observó una media de daño menor a 10 %, seguidos por los tratamientos con las cepas Pe01, Pe45, Pe42 y Pe33, con porcentajes de daño entre 10 y 20 % (Cuadro 5). Los tratamientos con el menor control biológico fueron con Pe40, Pe12 y Pe32, con un porcentaje de daño de entre 28 y 35 % (Cuadro 5, Figura 4).

Tipo de control biológico

Con la técnica del microcultivo es posible apreciar a nivel microscópico las interacciones entre ambos microorganismos. En este estudio, el micelio de *P. capsici* sin antagonista se conservó intacto (Figura 5 A), mientras que en la presencia de *Penicillium* hubo competencia (Figura 5 B) y desintegración (Figuras 5 C y D). Dadas las dificultades para cuantificar los efectos del micoparasitismo, muchos estudios previos sobre este tema se basan cualitativamente

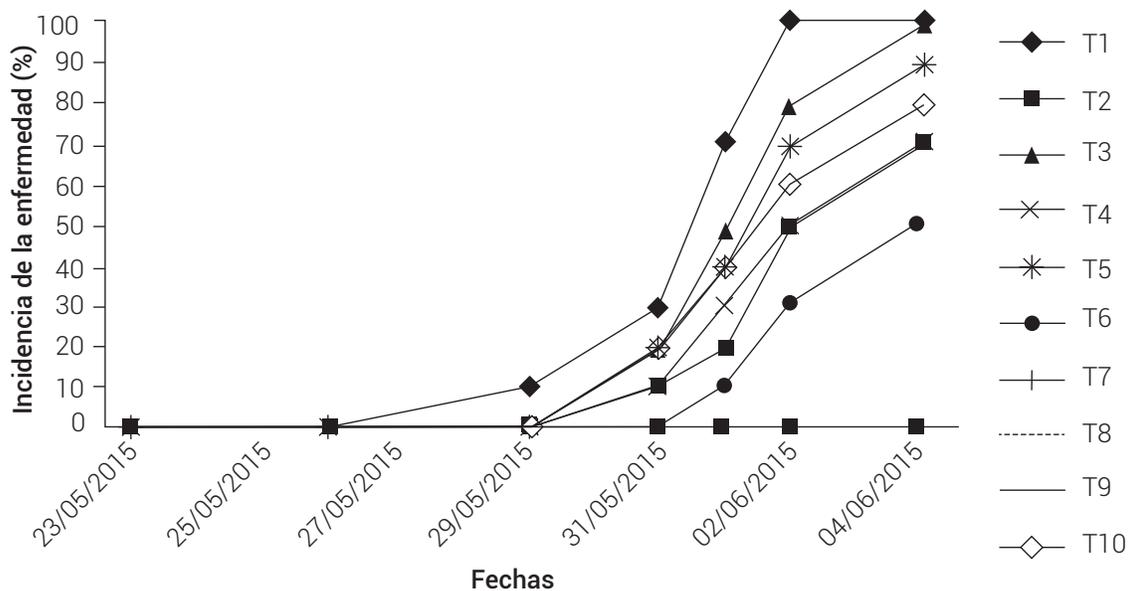


Figura 4. Curva de progreso de la enfermedad en la confrontación *in vivo*. T1, cepa Pe42; T2, cepa Pe45; T3, cepa Pe12; T4, cepa Pe33; T5, cepa Pe32; T6, cepa Pe47; T7, cepa Pe40; T8, cepa Pe19; T9, cepa Pe01; T10, testigo con patógeno, sin antagonista.

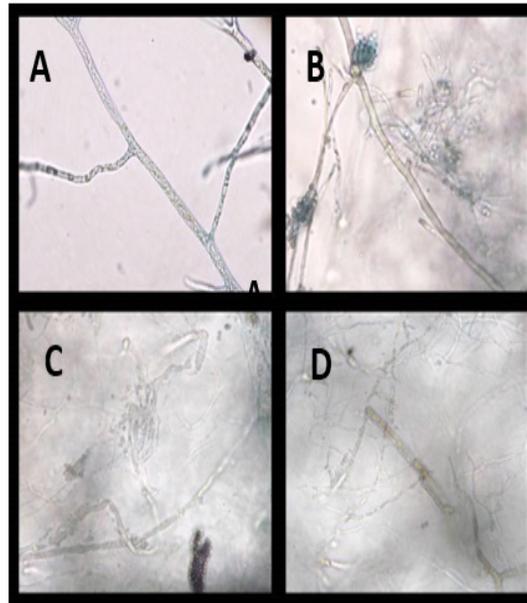


Figura 5. A) micelio de *Phytophthora capsici* sin antagonistas, B) micelio de *P. capsici* con *Penicillium* spp., C) y D) micelio de *P. capsici* en proceso de desintegración.

en fotografías (Adams, 1990; Paul, 1999) en las que se identifican diversos mecanismos de acción, como la antibiosis, la competencia diversa entre la microflora y los patógenos, o el parasitismo directo y unilateral (Adams, 1990; Guillén-Cruz *et al.*, 2006). En este estudio se presentó competencia porque ambos microorganismos persistieron en algunas ubicaciones en la raíz sin que se afectaran de otra manera (Figura 5 B); no obstante, también se observó la desintegración del micelio del patógeno (Figuras 5 C y D), como una antibiosis de acción lítica (Guillén-Cruz *et al.*, 2006; Roselló, 2003; Com. Pers.¹).

Consideraciones generales

Dupont *et al.* (2006) mencionan que la identificación de especies de *Penicillium* se mantiene como algo subjetivo si se usan características fenotípicas, debido a que las cepas pueden perder dichas características y las hace difíciles de identificar cuando son mantenidas y almacenadas durante largos periodos en medios de cultivo. De hecho, estos autores sólo pudieron identificar a nivel de especie a 35 aislamientos de 60 analizados cuando amplificaron la región ITS. Actualmente se considera que los estudios morfológicos ya no son suficientes para el estudio de la diversidad de especies, y es necesario complementarlos con estudios moleculares (Allende *et al.*, 2013; Peterson, 2000). En el presente estudio no se llegó a identificar a nivel de

especie a los géneros de *Penicillium*, pero se confirmaron las identidades de los microorganismos hasta nivel de género con marcadores moleculares.

Los diversos iniciadores arrojaron distribuciones, agrupamientos y distancias genéticas diferentes para cada uno de los microorganismos utilizados; así, las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I no identificaron polimorfismos diferentes entre cuatro de las cepas más agresivas de *P. capsici*, independientemente de su origen geográfico y hospedante (Phy-2, de Dolores Hidalgo, en Chile; Phy -3, de Juventino Rosas, de tomate; Phy-6, de Abasolo, de tomate; y Phy-7, de Abasolo, de suelo cultivado con Chile, Figura 1), mientras que los marcadores de secuencia de repetición simple interna (AC)₈YG y AC(GACA)₄ arrojaron una distribución diferente y distanciamiento genético no relacionado con la agresividad (Figura 3).

Resultados similares se han reportado en España, al no encontrar correlación entre los agrupamientos moleculares y el grado de agresividad de *P. capsici* en Chile (Silvar *et al.*, 2006). Con *Penicillium*, el mayor antagonismo se presentó en cepas genéticamente distantes, lo cual era de esperarse, ya que la selección de éstas para los ensayos se hizo precisamente con base en la representatividad de los diferentes agrupamientos. También es de resaltar que las nueve cepas más destacadas por su acción *in vitro* conservaron su antagonismo *in vivo*, pues aunque hubo diferencias entre ellas, sólo permitieron de 5 a 35 % de infección, mientras que en su ausencia, *P. capsici* tuvo una infectividad de 85 %.

¹Roselló C. J. L. (2003) Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 242 p.

Ferrera-Cerrato y Alarcón (2007) mencionan que ciertos hongos presentes en el suelo son antagónicos a fitopatógenos y pueden prevenir la infección de las plantas. Este antagonismo involucra la competencia por nutrientes o la producción de compuestos inhibitorios como metabolitos secundarios y enzimas extracelulares; además, estos hongos, junto con otros microorganismos, forman parte de los bioplaguicidas que representan una alternativa importante para disminuir el uso de plaguicidas químicos en el combate de los fitopatógenos. Lo anterior coincide con lo observado en las cepas de *Penicillium* que se aislaron y evaluaron durante el desarrollo del presente trabajo.

Con respecto a la inhibición del patógeno bajo diferentes condiciones (*in vitro* e *in vivo*), fueron varias las cepas de *Penicillium* que mantuvieron los mejores resultados tanto en confrontación dual *in vitro* como en antagonismo a *P. capsici* *in vivo*, sobresalieron las cepas Pe42, Pe45, Pe47, Pe40, Pe33, Pe32, Pe19 y Pe12. Esto coincide con lo reportado por Kang et al. (2003), quienes mencionan que al activarse un gen de una cepa de *Penicillium*, se inhibe el crecimiento de micelio de *P. capsici*. Fang y Tsao (1995) también evaluaron a *Penicillium funiculosum* como agente de control biológico contra *Phytophthora cinnamomi*, *P. parasitica* y *P. citrophthora* en la pudrición de raíz de azalea (*Rhododendron* L.) y naranja dulce (*Citrus x sinensis*), y observaron inhibición de la actividad patogénica de los oomicetos ante la presencia de *Penicillium*. Roselló (2003, Com. Pers.¹) y Vázquez (2013, Com. Pers.²) hacen referencia a *Penicillium oxalicum* en el control de enfermedades vasculares de plantas hortícolas como las causadas por *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora parasitica* y *P. infestans* en tomate, melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Citrullus lanatus*). Esto proporciona indicios de los alcances que pueden tener las especies del género *Penicillium* como organismos de control biológico para una amplia diversidad de patógenos.

CONCLUSIONES

Los agrupamientos generados molecularmente para los microorganismos en estudio evidenciaron gran variabilidad genética dentro de cada especie. Las cepas de *Penicillium* spp. no coincidieron con la acción antagónica sobre *Phytophthora capsici*, aunque la agresividad de éste sí se asoció con un agrupamiento al que no se le detectaron polimorfismos diferentes con enzimas de restricción. Se identificaron nueve cepas de *Penicillium* que conservaron su acción antagónica bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* de los bioensayos. El efecto antagónico fue una combinación de inhibición por antibiosis, competencia por espacio

²Vázquez G. G. (2013) Mejora de la eficacia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol en enfermedades de plantas hortícolas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. 304 p.

y desintegración de micelio.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams P. B. (1990) The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 28:59-72.
- Agamez R. E., J. Barrera V. y L. Oviedo Z. (2009) Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. *Acta Biológica Colombiana* 14:61-70.
- Allende M. R., P. A. Picos M., I. Márquez Z., J. A. Carrillo F., R. S. García E. y J. León F. (2013) Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:13-19.
- Anaya-López J. L., M. M. González-Chavira, E. Villordo-Pineda, R. Rodríguez-Guerra, R. Rodríguez-Martínez, R. G. Guevara-González, L. Guevara-Olvera, V. Montero-Tavera e I. Torres-Pacheco (2011) Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:373-383.
- Barnett H. L. and B. B. Hunter (1972) Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3^{er} ed, Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, USA. 241 p.
- Bosland P. W. and D. L. Lindsey (1991) A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Disease* 75:1048-1050.
- Castro R. A., S. P. Fernández P. y P. Osuna A. (2012) Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:49-65.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Dupont J., B. Denetière, C. Jacquet and M. F. Dupont (2006) PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. *Revista Iberoamericana de Micología* 23:145-150.
- Erwin D. C. and O. K. Ribeiro (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society Press. St. Paul Minnesota. 562 p.
- Fang J. G. and P. H. Tsao (1995) Efficacy of *Penicillium funiculosum* as a biological control agent against *Phytophthora* root rots of azalea and citrus. *Phytopathology* 85:871-878.
- Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón (2007) Microbiología Agrícola: Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico, Planta-Microorganismo. Ed. Trillas. México. 568 p.
- French E. R. y T. T. Hebert (1982) Métodos de Investigación en Fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 289 p.
- Guillén-Cruz R., F. D. Hernández-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar-González, E. Padrón-Corral y M. H. Reyes-Valdés (2006) *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:105-114.
- Hernández-Lauzardo A. N., S. Bautista-Baños, M. G. Velázquez-del Valle y A. Hernández-Rodríguez (2007) Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:66-74.
- Kang J. G., J. H. Hur, B. S. Yun, I. D. Yoo and K. Y. Kang (2003) Antifungal activity of sporogen AO-1 and *p*-Hydroxybenzoic acid isolated from *Penicillium* sp. AF5. *Journal of Applied Biological Chemistry* 46:33-37.
- Mendoza Z. C. (1996) Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 85 p.
- Paul B. (1999) Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Pythium ramosum*. *FEMS Microbiology Letters* 176: 25-30.
- Peterson S. W. (2000) Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. R. A. Samson and J. I. Pitt (eds.). Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp:163-178.

- Ristaino J. B. and S. A. Johnston (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease* 83:1080-1089.
- SAS Institute (2011) SAS® 9.3 Companion for Windows. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 694 p.
- Seema M. and N. S. Devaki (2012) *In vitro* evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Technology* 8:233-240.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2017) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México. http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/(Noviembre 2017).
- Silva-Rojas H. V., S. P. Fernández-Pavía, C. Góngora-Canul, B. C. Macías-López y G. D. Ávila-Quezada (2009) Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:134-147.
- Silvar C., F. Merino and J. Díaz (2006) Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease* 90:1135-1142.
- Weising K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl (2005) DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 444 p.
- Wolcan S. M., G. A. Lori, L. Ronco, A. F. Mitidieri y R. Fernández (2001) Enanismo y podredumbre basal de *Eustoma grandiflorum* y su relación con la densidad de *Fusarium solani* en el suelo. *Fitopatología Brasileira* 26:710-714.