



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL



EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO POR *Penicillium* sp.

A *Phytophthora capsici* CAUSANTE DE LA
“MARCHITEZ DEL CHILE”.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

ABRAHAM JIMÉNEZ CAMARGO

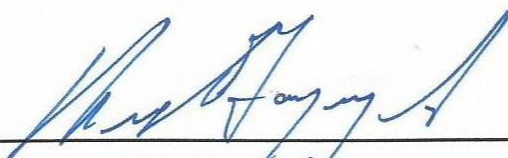
Chapingo, Texcoco, Edo. de México, Junio de 2015



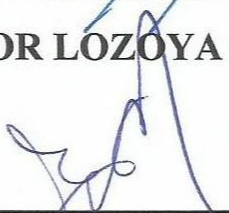
La presente tesis titulada **EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO POR *Penicillium* sp. A *Phytophthora capsici* CAUSANTE DE LA “MARCHITEZ DEL CHILE”** realizada por **ABRAHAM JIMÉNEZ CAMARGO** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

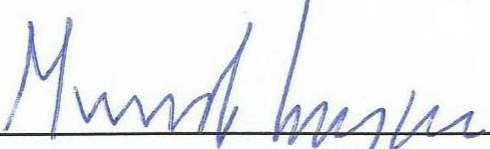
DIRECTOR:


DR. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

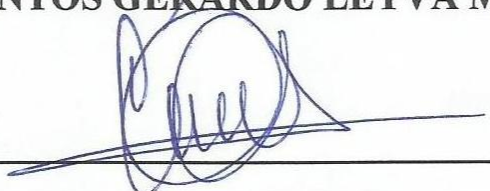
ASESOR:


DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:


DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:


DR. CESAR LEOBARDO AGUIRRE MANCILLA

ASESOR:


DR. LUIS ANTONIO MARISCAL AMARO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme formar parte de tan honorable institución.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su gran apoyo, amistad y por que fue gran guía durante mi estancia en el postgrado.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su comprensión, amistad y consejos los que ayudaron a que este trabajo tomara forma.

Al Dr. Cesar Leobardo Aguirre Mancilla, por su amistad, consejos e ideas para el trabajo.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva, por sus aportaciones y sus conocimientos.

Al Dr. Luís Antonio Mariscal, por su amistad, aportaciones y conocimiento.

Al Dr. Nahúm Marbán Mendoza, quien siempre brindó su amistad, comprensión y apoyo.

A mis muy estimados doctores Claudia, Samir y Anselmo, gracias por todo su apoyo, su amistad y buenos consejos.

A Lolita y Sr. Alberto, contribuyeron con su granito de arena para que este trabajo se consolidara.

A Karina, Abraham y Remis, porque su ayuda fue de gran valor.

DEDICATORIAS

A los dos motores de mi vida mi esposa Ana Eugenia y mi hijo Matías Abraham, siempre han sido mi motivación e impulso, para seguir adelante, este trabajo también les pertenece.

A mis cómplices de aventuras y batallas, Nelson, Lupita y Michel, nos conocimos como compañeros y terminamos como familia.

A mis padres y hermanos, gracias por todo su amor y su impulso, todo lo que soy es gracias a ustedes, los amo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Abraham Jiménez Camargo nació el 3 de Octubre de 1982, en el municipio de Celaya, Guanajuato.

Inició sus estudios de Licenciatura en su ciudad natal en el año del 2003, en el Instituto Tecnológico de Roque, se graduó en el año de 2007, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo, con especialidad en sistemas alternativos de producción.

Se desempeñó como responsable del laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuaria, campo experimental Bajío.

En el año 2013 inicia sus estudios de postgrado en la maestría en Protección Vegetal, de la Universidad Autónoma Chapingo.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	vi
INDICE DE CUADROS	xi
INDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xviii
I.INTRODUCCION	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 Objetivo General	2
1.1.2 Objetivos Específicos	2
1.2 Hipótesis	2
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Importancia del cultivo de chile (<i>Capsicum annuum</i>).....	4
2.1.1 Producción de chile en el Mundo	4
2.1.2 Producción de chile en México.....	6
2.1.3 Producción de chile en el estado de Guanajuato	8
2.2 Chile (<i>Capsicum annum</i>)	9
2.2.1 Origen del chile.	9
2.2.2 Enfermedades del cultivo de chile	10
2.2.3 “Marchitez” o “secadera del chile”	11
2.2.4 Organismos causales de la “marchitez del chile”	12
2.3 <i>Phytophthora capsici</i> L.....	12
2.3.1 Antecedentes históricos de <i>Phytophthora capsici</i> L.	12
2.3.2 Hospedantes	13
2.3.3 Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora capsici</i>	13

2.3.4 Morfología de <i>Phytophthora capsici</i>	14
2.3.5 Sintomatología	15
2.3.6 Ciclo de la enfermedad	16
2.3.7 Manejo de la Enfermedad	17
2.4 Hongos en el suelo	20
2.4.1 Mecanismo de acción de los microorganismos antagónicos.....	22
2.4.2 Antecedentes de uso de <i>Penicillium</i> spp. como antagonista.....	23
2.5 <i>Penicillium</i> spp.....	24
2.5.1 Clasificación taxonómica de <i>Penicillium</i> spp.	25
2.5.2 Descripción morfológica de <i>Penicillium</i> spp.	25
2.6 Métodos para detectar variación genética	28
2.6.1 Marcadores morfológicos	29
2.6.2 Marcadores Moleculares	29
2.7 Herramientas Biotecnológicas	30
2.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
2.7.2 ITS (Internal Transcribed Sequences).....	31
2.7.3 RFLP	32
2.7.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)	33
2.7.5 Secuenciación.	34
II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Ubicación del área de trabajo	35
3.2 Muestreo.....	35
3.2.1 Colectas de muestreo para aislamiento de <i>Penicillium</i> sp.	35
3.2.2 Colectas de muestreo para aislamiento de <i>Phytophthora capsici</i>	37
3.3 Aislamiento de microorganismos (French y Hebert, 1982)	39

3.3.1 Aislamiento de tejido vegetal.....	39
3.3.2 Aislamiento de suelo, técnica de dilución para <i>Penicillium</i> sp.....	40
3.3.3 Aislamiento de suelo, técnica de trampa (cebo o atrayente) para <i>Phytophthora capsici</i> (Erwin y Ribeiro, 1996).....	41
3.4 Purificación de cepas aisladas (French y Hebert, 1982).....	42
3.4.1 Cultivo monospórico (<i>Penicillium</i> sp.).....	42
3.4.2 Punta de Hifa (<i>Phytophthora capsici</i>).....	42
3.5 Identificación morfológica	43
3.6 Técnicas moleculares	44
3.6.1 Extracción de DNA Método CTAB 2% y Acetato de Sodio (modificado de Doyle y Doyle, 1987; Weising et. al., 2005).....	44
3.6.2 Cuantificación del DNA	45
3.6.3 Calidad del DNA en Gel de agarosa	45
3.6.4 Amplificación región ITS con PCR	46
3.6.5 RFLPs	47
3.6.6 ISSR.....	47
3.6.7 Gel de acrilamida	48
3.6.8 Bioestadística: Decodificación de Geles y Dendogramas	49
3.6.9 Secuenciación.....	50
3.6.9.1 Amplificación de la zona de interés a secuenciar	50
3.6.9.2 Limpieza de las amplificaciones	50
3.6.9.3 Reacción de secuenciación para <i>Penicillium</i> sp. y <i>Phytophthora capsici</i>	51
3.6.9.4 Análisis de Secuencias.....	52
3.7 Caracterización de cepas de <i>Phytophthora capsici</i>	52
3.7.1 Caracterización en medio de cultivo.....	52

3.7.2 Pruebas de patogenicidad <i>in-vitro</i>	53
3.8 Confrontación dual (Bell <i>et al.</i> , 1982).....	55
3.9 Microcultivo técnica de Ridell o método de laminilla (Paul, 1999)	57
3.10 Confrontación <i>In-vivo</i> del antagonismo en invernadero	58
3.11 Análisis Estadístico de los experimentos	60
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.1 Aislamiento de microorganismos	61
4.2 Identificación morfológica	63
4.3 Técnicas moleculares	65
4.3.1 Cuantificación del DNA	65
4.3.2 Amplificación región ITS con PCR	65
4.3.3 RFLPs	66
4.3.4 ISSR.....	74
4.4 Caracterización de cepas de <i>Phytophthora capsici</i>	80
4.4.1 Caracterización en medio de cultivo.....	80
4.4.2 Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	81
4.5 confrontación dual	86
4.6 Microcultivo técnica de Riddell o método de laminilla.....	91
4.7 Confrontación <i>In vivo</i> del antagonismo en invernadero	92
4.8 Resultado de secuenciación	94
4.9 Discusión general	95
V. CONCLUSIONES	97
LITERATURA CITADA.....	98
APÉNDICE.....	110
A.1 Determinación del efecto del ácido Láctico sobre <i>Phytophthora capsici</i> ...	110

A.2 Resultados del efecto del ácido Láctico sobre <i>Phytophthora capsici</i>	111
A.3 Cuadros de Resultados SAS.....	112

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de chiles que se siembran en México.	7
Cuadro 2. Principales enfermedades del cultivo de chile.	10
Cuadro 3. Localización de los puntos de muestreo.	38
Cuadro 4. Reacción de PCR-ITS a un volumen final de 50 µL.	46
Cuadro 5. Reacción de PCR-ISSR a un volumen final de 25µL.	47
Cuadro 6. Reactivos para una placa de 60 mL (Valadez y Kalh, 2005)	48
Cuadro 7. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción.	52
Cuadro 8. Valores escalares y porcentuales de la escala de daño (Bosland y Lindsey, 1991).	55
Cuadro 9. Tratamientos evaluados en confrontación dual.	56
Cuadro 10. Escala del grado de antagonismo.	57
Cuadro 11. Tratamientos aplicados en confrontación in-vivo.	59
Cuadro 12. Aislamientos de <i>Penicillium</i> sp.	62
Cuadro 13. Aislamientos de <i>Phytophthora capsici</i>	63
Cuadro 14. Velocidad de crecimiento (cm/día) en los medios PDA y V8.	80
Cuadro 15. Comparación de medias de la evaluación del día 6.	84
Cuadro 16. Comparación de medias de la evaluación del día 12/10/2014.	85
Cuadro 17. Comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), inhibición porcentual.	88
Cuadro 18. Comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), tipo de antagonismo.	90
Cuadro 19. Comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para evaluación de la severidad experimento en invernadero	93
Cuadro 20. Resultados del análisis de varianza en el programa SAS de la evaluación del día 6.	110

Cuadro 21. Resultados del análisis de varianza en el programa SAS, evaluación del día 12.....	113
Cuadro 22. Resultado del análisis de confrontación dual en el programa SAS. .	113
Cuadro 23. Resultado del análisis de varianza del tipo de interacción entre <i>Penicillium</i> sp y <i>Phytophthora capsici</i>	113
Cuadro 24. Resultado del análisis de varianza del experimento de la evaluación <i>In vivo</i> del antagonismo de cepas de <i>Penicillium</i> sp. sobre <i>P. capsici</i>	114
Cuadro 25. Dosis de acido láctico evaluadas en el experimento.	110
Cuadro 26. Resultados del análisis de varianza en el programa SAS, para el experimento de dosis de acido láctico.....	111
Cuadro 27. Comparación de medias (Tukey), concentración acido láctico.	112

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de chile (FAOSTAT, 2015).	5
Figura 2. Principales estados productores de chile en México (SIAP, 2015).	7
Figura 3. Municipios productores de chile en Guanajuato (SIAP, 2015).	8
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Phytophthora</i> sp. (Erwin y Ribeiro, 1996).	17
Figura 5. a) Nombre de las estructuras del conidióforo de <i>Penicillium</i> spp. (Martínez, 2003); b) Tipos de conidióforo. (Alexopoulos, 1977; Carrillo, 2003).	27
Figura 6. Muestreo en campos de cultivo dirigidos a <i>Penicillium</i> sp.	36
Figura 7. Muestreo en cultivos de chile y jitomate con síntoma de Marchitez.	37
Figura 8. Proceso de aislamiento de microorganismos de tejido vegetal.	39
Figura 9. Proceso de aislamiento de <i>Penicillium</i> sp. de suelo.	40
Figura 10. Proceso de aislamiento de <i>Phytophthora capsici</i> de suelo.	41
Figura 11. Procedimiento de establecimiento del experimento. a) Plantas con la raíz lavadas b) Frasco con agua y caja Petri con <i>P. capsici</i> c) distribución del experimento.	53
Figura 12. Escala visual del daño utilizado para la evaluación de la severidad. ...	54
Figura 13. Proceso de inoculación de organismos antagónicos y fitopatógenos. .	60
Figura 14. Colonias de <i>Penicillium</i> sp. mostrando coloraciones diversas.	61
Figura 15. Cepas de <i>Phytophthora capsici</i> aisladas.	61
Figura 16. Estructuras típicas de <i>Penicillium</i> sp. a), b), d) y e) diferentes tipos de conidióforos y c) conidios esféricos.	64
Figura 17. Esporangios presentes en las cepas de <i>Phytophthora capsici</i> . La flecha indica la papila de los esporangios. La estrella indica esporangio sin papilas.	64

Figura 18. Resultado de la cuantificación del DNA de una muestra de <i>Penicillium</i> sp. El eje X es la longitud de onda y eje Y es la Absorbencia.	65
Figura 19. Ejemplificación de las amplificación de la región ITS de <i>Penicillium</i> sp. y <i>Phytophthora capsici</i> en gel de agarosa 2%.	66
Figura 20. Gel de acrilamida 6% con los cortes producidos por las tres enzimas de la región ITS de <i>Phytophthora capsici</i>	67
Figura 21. Ejemplificación de los patrones producidos por la enzima <i>Hae</i> III de la región ITS de <i>Penicillium</i> sp., los recuadros señalados por flechas muestran los polimorfismos que se generaron.	68
Figura 22. Ejemplificación de los Patrones producidos las enzimas <i>Hha</i> I y <i>Hinf</i> I de la región ITS de <i>Penicillium</i> sp., los recuadros señalados por flechas muestran los polimorfismos que se generaron.....	68
Figura 23. Dendograma originado por la enzima <i>Hha</i> I, mostrando 3 grandes grupos enmarcados por los recuadros, donde están bien definidos el género <i>Penicillium</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp., además la flecha señala a las 3 cepas que aparentemente en otro grupo con cercanía genética a <i>Penicillium</i> sp..	70
Figura 24. Dendograma originado por la enzima <i>Hinf</i> I mostrando solo 2 grandes grupos enmarcados por los recuadros, definiendo al género <i>Penicillium</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp.,	71
Figura 25. Dendograma originado por la enzima <i>Hae</i> III mostrando 2 grupos enmarcados por los recuadros, donde se diferencia con claridad los géneros <i>Penicillium</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp.....	72
Figura 26. Dendograma formado por la conjunción de los datos de las enzimas de restricción <i>Hha</i> I, <i>Hinf</i> I y <i>Hae</i> III. Las flechas señalan la posición de las cepas en	

el dendograma, dada la distancia genética se consideraron diferentes y fueron seleccionadas para el experimento de confrontación dual.73

Figura 27. Gel de poliacrilamida al 6% con los patrones generados por el primer (AC)8YG, se consideraron las bandas de 240 pb hasta 2000 pb. En el recuadro se puede apreciar perfiles semejantes lo cual indica una cercanía entre las cepas de *Penicillium* sp. pero al analizar las bandas fuera del recuadro nos muestra polimorfismos lo cual marca distancia genética. Las flechas muestran presencia o ausencia de bandas.74

Figura 28. Gel de poliacrilamida al 6% con los patrones generados por el primer (GGAT)₄, se consideraron las bandas de 320 pb hasta 2500 pb. Se puede apreciar una gran cantidad de información generada, expresada en el número de bandas que genero para cada cepa. Observando una gran cantidad de polimorfismos. Las flechas muestran presencia o ausencia de bandas.....75

Figura 29. Dendograma generado con el primer (AC)8YG para las cepas de *Phytophthora capsici*. Se puede observar que no hay una relación entre el hospedero de donde se aisló y la cepa, como por ejemplo la cepa Phy-4 aislada de jitomate y Phy-5 aislada de chile, pero comparten una cercanía genética.75

Figura 30. Dendograma generado con el primer (GGAT)₄ para las cepas *Phytophthora capsici*. Al generar mayor información (numero de bandas) hay mayor diversidad dentro de la misma especie. La flecha indica uno de los nodos generados, de donde se puede observar un mayor número de nodos, marcando distancia entre la misma especie a comparación del primer.76

Figura 31. Dendograma generado por los primers (AC)8YG y (GGAT)₄ para las cepas de *Phytophthora capsici*. La información contenida en el DNA y al ser

amplificada por ambos primers mostro que hay variabilidad dentro de la especie y por lo tanto influir en la agresividad de la cepa, pero no se vio reflejado en la conformación ya que no se puede concluir que cada grupo tiene una característica morfológica atribuible.	76
Figura 32. Dendograma generado con el primer (AC)8YG para las cepas de <i>Penicillium</i> sp. agrupó a la muestras según la semejanza relacionada con su peso molecular esto de acuerdo a los fragmentos amplificados. En el recuadro se puede observar semejanza en las cepas Pe 18 y Pe 20 indicando que son posiblemente el mismo organismo.	77
Figura 33. Dendograma generado con el Primer (GGAT) ₄ para las cepas de <i>Penicillium</i> sp. agrupó a la muestras según la semejanza relacionada con a los fragmentos amplificados. En el recuadro se puede observar semejanza ahora entre las cepas Pe 17 y Pe 20. Por lo tanto todas las demás cepas son variantes o cepas con un marcado polimorfismos respecto a sus iguales.....	78
Figura 34. Dendograma generado con los Primer (AC)8YG y (GGAT) ₄ para las cepas de <i>Penicillium</i> sp. donde se aprecia que son cepas diferentes o variantes por no presentar coincidencias. Las flechas indican las cepas con mejor antagonismo, pero están distribuidas en el dendograma pero no agrupadas bajo esta característica.	79
Figura 35. Crecimiento radial de <i>Phytophthora capsici</i> en medio de cultivo PDA.	81
Figura 36. Crecimiento radial de <i>Phytophthora capsici</i> en medio de cultivo V8. ...	81
Figura 37. Incidencia de la enfermedad causada por <i>Phytophthora capsici</i> en plantas de chile.	82

Figura 38. Incidencia de la Enfermedad causada por <i>Phytophthora capsici</i> expresado en porcentaje.....	83
Figura 39. Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> . a) Inicio del experimento,	83
Figura 40. Tratamientos de la confrontación dual, La flecha indican donde las cepas de <i>Penicillium</i> sp. difundieron pigmentación en el medio de cultivo.	86
Figura 41. Cepas de <i>Penicillium</i> sp. que mostraron inhibición sobre <i>Phytophthora capsici</i> (Phy-2).....	87
Figura 42. Interacciones observadas 25 días después del inicio del experimento de confrontación dual.	89
Figura 43. a) Micelio de <i>Phytophthora capsici</i> sin antagonistas, b) con <i>Penicillium</i> sp., c) y d) Las flechas indican como el micelio de <i>Phytophthora capsici</i> comienza a desintegrarse.....	91
Figura 44. Evaluación de dosis de ácido láctico sobre <i>Phytophthora capsici</i> de izquierda a derecha los tratamientos con 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100%. ...	112

EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO POR *Penicillium* sp. A *Phytophthora capsici* CAUSANTE DE LA “MARCHITEZ DEL CHILE”.

EVALUATION OF ANTAGONISM BY *Penicillium* sp. TO *Phytophthora capsici* CAUSING PEPPER WILT.

¹Jiménez Camargo Abraham y ²Lozoya Saldaña Héctor.

RESUMEN

La marchitez del chile, causada por *Phytophthora capsici*, ocasiona pérdidas en rendimiento de un 40 al 80%. Los síntomas son la marchitez de la planta seguida de una muerte repentina. Los suelos supresores contienen microorganismos antagónicos a fitopatógenos, como *Penicillium* spp. El objetivo fue determinar los efectos antagónicos *in-vitro* e *in-vivo* de aislados de *Penicillium* sp. con potencial antagónico sobre *P. capsici*. Se aislaron 54 cepas de las cuales 47 fueron de *Penicillium* sp. y 7 de *Phytophthora* sp. Se identificaron con técnicas morfológicas y moleculares (RFLPs e ISSR). En las confrontaciones *in-vitro* se detectaron 9 cepas antagonistas de *Penicillium* sp. a *P. capsici* cuya acción fue confirmada en *in-vivo* en invernadero.

Palabras clave adicionales: RFLP, ISSR, antagonismo, *Penicillium*

ABSTRACT

Pepper wilt caused by *Phytophthora capsici* causes 40 to 80% yield losses. Symptoms include wilting followed by sudden death. Suppressive soils have antagonistic microorganisms such as *Penicillium* spp. The objective of this work was to determinate the antagonic *in vitro* and *in vivo* effects of *Penicillium* sp. Isolates on *P. capsici*. Fifty four strains were isolated, out of which 47 were *Penicillium* sp. and 7 were *Phytophthora* sp, identified with morphological and molecular techniques (RFLP and ISSR). Nine *Penicillium* strains were identified as antagonists under *In-vitro* confrontations. This effect was confirmed *in vivo* under greenhouse conditions.

Additional key words: RFLP, ISSR, antagonism, *Penicillium*

¹Tesista

²Director

I.INTRODUCCION

Uno de los factores limitantes de la producción del cultivo de chile (*Capsicum annum*) ha sido la presencia de enfermedades, como la “Secadera” o “Marchitez del chile” que es causada por el oomiceto *Phytophthora capsici*, los síntomas son la marchitez de la planta seguida de una muerte repentina; este microorganismo es capaz de infectar cualquier parte subterránea o aérea de la planta y es la enfermedad más devastadora para este cultivo, ya que ocasiona pérdidas en rendimiento de un 40 al 80% en zonas productoras de este cultivo, traducido en pérdidas económicas importantes para los agricultores (Ristaino y Johnston, 1999).

Las recomendaciones para controlar esta enfermedad es la aplicación de fungicidas, sin embargo su control no ha sido del todo satisfactorio y elevan los costos de producción (Aldana, 2009). Una alternativa para el manejo de enfermedades de la raíz es el uso microorganismos antagónicos como bacterias, levaduras y hongos que tienen la capacidad de ejercer control biológico. Los suelos contienen microorganismos antagónicos a fitopatógenos, que destruyen o inhiben su desarrollo, pero aun no se han estudiado (Hernández *et al.*, 2007; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007). Por eso es importante continuar con diversas investigaciones que permitan encontrar microorganismos que habitan el suelo de forma natural y potencializarlos para controlar microorganismo que originan enfermedades del suelo. Con base a lo anterior, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos e hipótesis.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Determinar los efectos antagónicos *in-vitro* e *in-vivo* de aislados de *Penicillium* sp. sobre *Phytophthora capsici*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar a las cepas aisladas de *Penicillium* sp. por medio de confrontaciones duales (*in vitro*) para determinar el efecto antagonismo sobre el desarrollo de *P. capsici*.
- Evaluar en invernadero (*in vivo*) el potencial antagónico de las cepas de *Penicillium* sp. seleccionadas para el control de *P. capsici* durante el desarrollo del cultivo de chile.
- Analizar posibles correlaciones o cercanías genéticas entre las cepas de *Penicillium* con similitud de acción antagónica.

1.2 Hipótesis

- Ho: Todas las cepas de *Penicillium* sp. producen la misma inhibición sobre el desarrollo de *P. capsici* en confrontación dual.
- Ha: Al menos una de las cepas de *Penicillium* sp. produce inhibición diferente de las demás sobre el desarrollo de *P. capsici* en confrontación dual.

- Ho: Todas las cepas de *Penicillium* sp., tienen control sobre la “Marchitez del chile” ocasionado por *P. capsici* durante el desarrollo de las plantas de chile en invernadero.
- Ha: Al menos una de las cepas de *Penicillium* sp., tiene control diferente de las demás sobre la “Marchitez del chile” ocasionado por *P. capsici* durante el desarrollo de las plantas chile en invernadero.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia del cultivo de chile (*Capsicum annuum*)

Dentro del género *Capsicum* spp. existen cinco especies cultivadas (*C. annuum*, *C. chinesis*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum*). El chile de la especie *Capsicum annuum* es la más conocida y la de mayor importancia económica, ya que presenta una amplia distribución, convirtiéndose en uno de los saborizantes más importantes en la cocina mundial. Actualmente se estudian las propiedades medicinales de las capsaicinas que son las responsables del sabor picante del chile (Aguilar *et al.*, 2010). Esta especie agrupa la gran mayoría de los tipos cultivados en México, entre los que destacan: ancho, serrano, jalapeño, morrón, mirasol, pasilla y mulato. Además, se encuentra distribuida en todo el país, debido a su aporte económico, social. En México el chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes presentando la mayor variabilidad de formas cultivadas y silvestres. Esta diversidad ha sido descrita con base en la clasificación comercial de los frutos en cuanto a tamaño, forma, y color (Aguilar *et al.*, 2010; Montes *et al.*, 2004; Pochard *et al.*, 1992).

2.1.1 Producción de chile en el Mundo

El cultivo de chile se encuentra en todas las zonas templadas del mundo; Nuez *et al.*, 1996 menciona que la superficie dedicada al cultivo de las distintas

variedades de chile varía en cada país, en función de los usos y costumbres. En los países africanos y asiáticos dominan los tipos picantes, en Europa occidental, los tipos dulces, mientras que en la parte oriental es importante el tipo paprika pimienta y en América tanto los picantes como los dulces.

En el año 2013, México se ubicó en el segundo lugar en producción mundial de chile con 2, 294,400 ton (Figura 1), seguido por Turquía, Indonesia y España, siendo China el principal productor con 15, 800,000 ton (FAOSTAT, 2015).

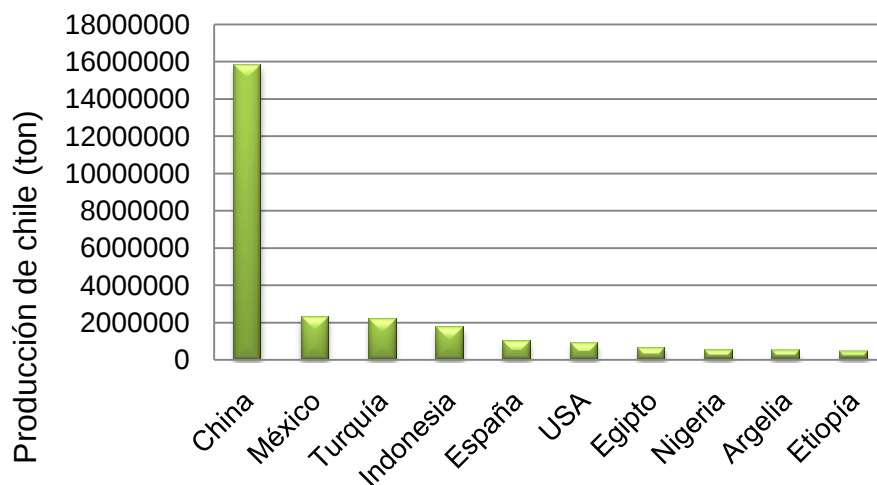


Figura 1. Principales países productores de chile (FAOSTAT, 2015).

El cultivo del chile actualmente, es una especie que ha tenido un considerable aumento en su consumo, en todo el mundo. Este aumento de la producción se debe a la creciente demanda de este producto en todas sus presentaciones fresco, seco y procesado (Aldana, 2009).

2.1.2 Producción de chile en México

El cultivo de chile se ha extendido en todo el territorio nacional, sembrándose en regiones desde el nivel del mar hasta aquellas que se cultivan a una altura de 2500 msnm, siendo una razón por la cual se encuentra chile en el mercado todo el año; esto denota la gran diversidad de variedades, regiones y productores en el país (Cuadro 1), originando una amplia diversidad de tipos de chile en cuanto a forma, sabor, color, tamaño y pungencia. Los chiles frescos y secos son un componente económico importante para el consumo nacional (Valadez, 1990; Arcos *et al.*, 1998; Long *et al.*, 1998; Montes *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2004).

En el 2013 en México se sembró con el cultivo de chile una superficie de 136,053 ha obteniendo una producción de 2, 294,399 ton, presentando un rendimiento de 17.26 t/ha, que se considera bajo, atribuido principalmente a la mediana o baja tecnología de producción que tienen varias de las regiones del país, además, se exportaron 699,657 ton (SIAP, 2015).

En el 2013, los estados de Sinaloa, Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí, Jalisco, Tamaulipas y Guanajuato produjeron el 79% de la producción de chile en México (Figura 2). Guanajuato tuvo una producción de 78,552 ton, observándose un constante crecimiento y desarrollo en este cultivo (SIAP, 2015).

Cuadro 1. Tipos de chiles que se siembran en México.

Tipos de chile	Estados:
Ancho	Aguascalientes, Coahuila, Durango, Guanajuato, Nayarit, San Luis Potosí, Sinaloa, Zacatecas
Cascabel	Aguascalientes, Durango, Zacatecas
Chipotle	Chihuahua, Oaxaca, Veracruz
De Árbol	Jalisco, Nayarit, Sinaloa
Guajillo	Aguascalientes, Durango, Zacatecas
Habanero	Península de Yucatán
Tipos de chile	Estados:
Jalapeño	Chihuahua, Oaxaca, Veracruz
Manzano	Chiapas, Estado de México, Michoacán, Querétaro
Morita	Veracruz, Oaxaca
Mulato	Guanajuato, Jalisco, Puebla
Pasilla	Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Zacatecas
Pimiento	Sinaloa
Poblano	Durango, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Sinaloa, Zacatecas
Puya	Aguascalientes, Durango, Zacatecas
Serrano	Hidalgo, Nayarit, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas

Adaptado de (Valadez, 1990; Arcos *et al.*, 1998; Long *et al.*, 1998; Aldana, 2009).

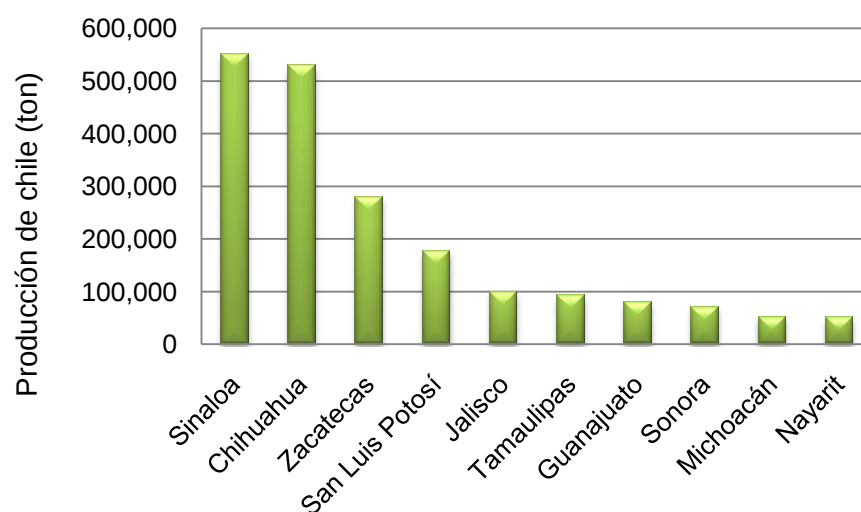


Figura 2. Principales estados productores de chile en México (SIAP, 2015).

2.1.3 Producción de chile en el estado de Guanajuato

El estado de Guanajuato cuenta con un potencial hortícola excepcional, alrededor de 20,000 ha se dedican a la producción de chile, papa y jitomate. El cultivo del chile cumple una función socioeconómica importante para el estado de Guanajuato, el cual genera ingresos altos para los productores, beneficios directos para los trabajadores de la región e indirectos para empacadores y transportistas. Además de la gran cantidad de mano de obra que se genera en el medio rural, requiriéndose de 120 a 160 jornaleros por hectárea al año (Pérez *et al.*, 2005).

En el año 2013, en el estado de Guanajuato se sembraron 4,032 ha, con un rendimiento promedio de 19.48 ton/ha, siendo superior al rendimiento nacional de 17.26 ton/ha. En los municipios de San Felipe, Silao, Dolores Hidalgo, Pénjamo y San Luis de la Paz (Figura 3) se engloba el 73.5% de la producción estatal (SIAP, 2015).

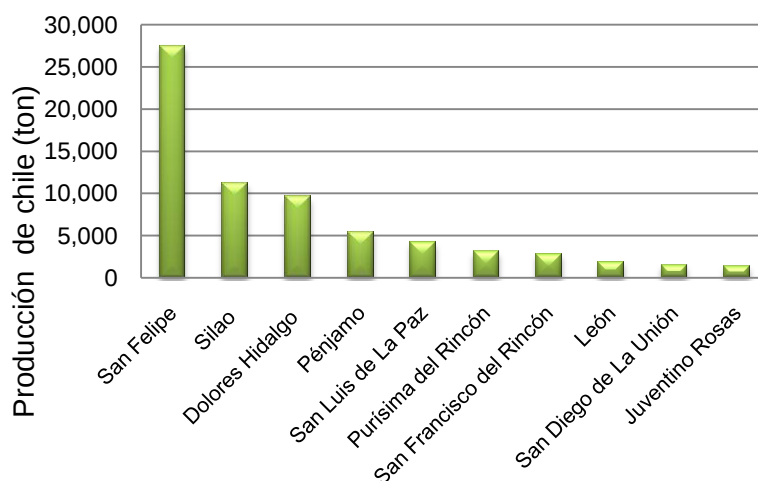


Figura 3. Municipios productores de chile en Guanajuato (SIAP, 2015).

2.2 Chile (*Capsicum annum*)

2.2.1 Origen del chile.

Todas las formas de chile, pimienta o ají utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. El nombre científico del género deriva del griego kapso (picar) o kapsakes (capsula). Este género se incluye en la extensa familia de solanáceas. El nombre de la especie guarda un significado simbólico como *Capsicum annum* que significa que es una planta anual (Anaya, 2000; Nuez et al., 1996). La palabra española “chile”, modificación del náhuatl *chilli* usada por los mexicas en la época de la conquista, sigue siendo utilizada en México y América central. Los arahuacos, grupos de la zona del Caribe, lo denominaban en el siglo XVI, *aji* o *axi* (Long, 1986). La especie *C. annum* fue cultivada y usada como planta alimenticia en el continente Americano desde antes de la llegada de los españoles. De acuerdo a las evidencias arqueológicas, la planta de chile tiene su origen y domesticación en Mesoamérica concretamente en México y Guatemala, se estima que este producto fue cultivado entre los años 7000 y 2555 a.C. en las regiones de Tehuacán, Puebla y Ocampo en Tamaulipas (ASERCA, 1998; Boswell, 1937; Montes et al., 2004; Pochard et al., 1992). Diego Álvarez Chanca, un médico de la segunda expedición de Colón a las Indias Occidentales en 1493, llevó los primeros pimientos - chiles a España de donde se extendió a Europa, Asia y África (Aguilar et al., 2010; Muñoz y Castellanos, 2003).

2.2.2 Enfermedades del cultivo de chile

El cultivo del chile es afectado por diversas enfermedades causadas por microorganismos que limitan el rendimiento y la calidad, por lo que resulta importante protegerlo del ataque de los diferentes patógenos (Pérez *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2010). Dentro de estos se encuentran (Cuadro 2) hongos, bacterias, virus y nematodos, cuyos daños pueden variar de acuerdo a la región en que se ubiquen el cultivo (Guigón y González, 2001).

Cuadro 2.Principales enfermedades del cultivo de chile.

Microorganismo	Nombre científico	Nombre común	Parte dañada
Bacterias	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. vesicatorias</i>	Mancha bacteriana	Hoja y Fruto
Hongos	<i>Phythium sp.</i>	Dumping off	Raíz y tallo
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Dumping off	Raíz y tallo
	<i>Phytophthora capsici</i>	Dumping off y Marchitez	Raíz y cuello
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitez, Pudrición de la corona y raíz	Raíz,tallo y Corona
	<i>Leveillula taurica</i> = <i>Oidiopsis taurica</i>	Cenicilla	Hojas
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Moho blanco	Corona y tallo
	<i>Cercospora capsici</i>	Mancha foliar	Hojas
Virus	TYLCV	Enchinamiento	Hojas
	TSWV	Marchites manchada	Planta completa
	CMV	Mosaico del pepino	Hojas
	TMV	Mosaico del tomate	Hojas
Nematodos	<i>Meloidogyne spp.</i>	Nematodo agallador	Raíz

Adaptado de (Muñoz y Castellanos, 2003; Ramírez y Sainz, 2006).

2.2.3 “Marchitez” o “secadera del chile”

La enfermedad conocida como “marchites del chile” o “secadera” provoca la muerte prematura de las plantas de chile y se encuentra presente en todo el mundo. En México se considera a la “marchitez del chile” como la enfermedad fúngica más importante del cultivo, la cual causa pudriciones de fruto, raíz y tallo; es considerada como una enfermedad policíclica ya que completa más de un ciclo de la enfermedad durante el ciclo del cultivo, donde las plantas enfermas sirven de fuente de inóculo para causar infecciones secundarias (Castro *et al.*, 2012; Erwin y Ribeiro, 1996; González *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009). Durante los últimos treinta años en México el problema de la “marchitez del chile” ha causado grandes pérdidas a los productores afectando del 60 al 100% de la superficie cultivada en condiciones favorables. Actualmente en México existen regiones en donde se tienen pérdidas hasta del 80%. Se reporta la enfermedad en todos los estados productores de chile especialmente en: Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (Castro *et al.*, 2012; González *et al.*, 2009; Mendoza, 1996). En Guanajuato se reportó la reducción de la superficie sembrada con chile de 6,568 a 3,097 ha, sembradas entre los años 2000 y 2005, lo cual representa el 47%. Esta reducción se debió principalmente a las pérdidas ocasionadas por la “marchitez del chile” esto de acuerdo al Consejo Estatal de Productores de Chile de Guanajuato (González *et al.*, 2009).

2.2.4 Organismos causales de la “marchitez del chile”

La “marchitez del chile” es causada por un complejo formado por el oomiceto *Phytophthora capsici*, y los hongos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. Varios investigadores en México señalan a los tres géneros como los causantes de la “marchitez del chile” (Anaya *et al.*, 2011; González *et al.*, 2009). El patógeno principal es *P. capsici*, ya que ocasiona un efecto fulminante inoculado solo o acompañado de algún otro género de los hongos involucrados en la “marchitez del chile”. En cambio *Fusarium* spp. y *R. solani* su efecto es menos severo, ya que la planta incluso puede fructificar antes de morir (Anaya *et al.*, 2011; González *et al.*, 2009).

González *et al.*, 2009 plantean la hipótesis donde los tres patógenos actúan de manera sinérgica, el primero que penetra la planta es *P. capsici* provocando una herida, la cual es aprovechada por *Fusarium* spp. y *R. solani* para invadir los haces vasculares ocasionando taponamiento y como consecuencia la marchitez de la planta.

2.3 *Phytophthora capsici* L.

2.3.1 Antecedentes históricos de *Phytophthora capsici* L.

El nombre del género *Phytophthora* deriva del griego *Phyto* (planta) y *phthora* (destructor). *P. capsici* fue descrita por primera vez por Leonian en 1922 como

el agente causal de la marchitez del chile (*C. annuum*) en Nuevo México, Estados Unidos. En Argentina en 1942 fue observada en cultivos de berenjena, calabaza y pepino. En México, se encontró en 1956 en chile, después en calabaza y finalmente en pepino, jitomate y fresa. Galindo en 1960, confirmó la presencia de esta enfermedad y señala que es causada por *P. capsici* (Castro *et al.*, 2012; Erwin y Ribeiro, 1996; Galindo, 1960; Leonian, 1922; Mendoza, 1996).

2.3.2 Hospedantes

La especie *P. capsici* ataca solanáceas como el chile, el tomate y la berenjena, y cucurbitáceas como el pepino, la calabaza, y el melón, alrededor del mundo. Más de 50 especies de plantas han sido identificadas como hospederas de este oomycete (Castro *et al.*, 2012; Erwin y Ribeiro, 1996; Mendoza, 1996).

2.3.3 Clasificación taxonómica de *Phytophthora capsici*

Reino Stramenopila o Chromista

Phyllum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Phytiales

Familia: Phythiaceae

Genero: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora capsici* (Dick, 2001; Kirk *et al.*, 2001).

2.3.4 Morfología de *Phytophthora capsici*

P. capsici es una especie heterotalica; en medio de cultivo forma una colonia radial con micelio cenocíticos muy ramificado liso o toruloso; Se reproducen tanto sexual como asexualmente. El ciclo asexual se caracteriza por la producción de esporangios. Esporangioforos con ramificaciones simples o irregulares. Los esporangios tienen una papila conspicua, pero en ocasiones son semipapilados (El ancho apical de la papila mide de 1.4 a 9.2 μm), a veces desviada y frecuentemente con dos papilas. La forma del esporangio puede ser variable (alimonado, sub-esferico, ovoide, elipsoide, fusiforme, globoso, piriforme o de formas distorsionadas); Miden de 28 a 123 μ de largo por 21 a 150 μ de ancho. Los esporangios son predominantemente cónicos en la base y son caducos, con un largo pedicelo que varía en longitud de 38 a 138 μm . Los esporangios se forman influenciados por la luz, en medio de cultivo y estos producen zoosporas a 12°C o germinan directamente a temperaturas mayores de 18°C. Las zoosporas nadan en el agua en busca de tejidos vegetales (semillas, raíces, tallos u hojas) en donde establecerse y enquistarse. Los quistes germinan desarrollando un tubo germinal que puede penetrar directamente al hospedante o por medio de la formación de un apresorio (Castro *et al.*, 2012; Erwin y Ribeiro, 1996; Mendoza, 1996; Romero, 1999). Clamidosporas ausentes. La oosporogénesis involucra la producción y fusión del oogonio (gametangio femenino) y del anteridio (gametangio masculino) que desarrolla una oospora. Oogonios esféricos, terminales; anteridios claviformes, terminales; anfígenos; oosporas lisas, aploeróticas, con diámetro promedio de

31.5 μ (Castro *et al.*, 2012; Erwin y Ribeiro, 1996; Mendoza, 1996; Romero, 1999).

2.3.5 Sintomatología

La marchitez del chile se debe al taponamiento físico del xilema por micelio que rompe el flujo continuo en los vasos conductores o por la secreción de toxinas que ocasiona el cierre de estomas de las hojas, esto como un mecanismo de defensa de la planta para evitar el desequilibrio hídrico. El mayor daño ocurre en época de floración cuando afecta las raíces y el tallo, por lo cual, la planta rápidamente se marchita y se seca (Ristiano *et al.*, 1994). La primera manifestación de la enfermedad es la flacidez o marchitez muy leve de la planta que se observa en las hojas a los 3 a 4 días después de la infección, al transcurrir de 7 a 10 días se marchita completamente y muere, observándose en el cuello y raíz un necrosamiento (pudrición dura que no se descascara) muy marcado, que al efectuar un corte transversal se nota una coloración café oscura, que aumenta conforme avanza la enfermedad (Mendoza, 1996; Pérez *et al.*, 2005; Ristiano *et al.*, 1994).

Puede haber infecciones secundarias, causadas por el inóculo que es transportado por el aire húmedo, cuando la humedad ambiental es alta, o por salpique de la lluvia sobre ramas, hojas y frutos; En las hojas y ramas se presentan como tizón. Los síntomas en las hojas son lesiones verde amarillento o verde limón, luego cambian a café; en las ramas es una pudrición café

oscuro (Erwin y Ribeiro, 1996; Mendoza, 1996; Romero, 1999). En los frutos se forman manchas acuosas de color verde claro que son suaves, puede afectar todo el fruto cubriéndolo con un moho (micelio de color blanco) y en el interior invadir las semillas y dañarla; los frutos afectados permanecen adheridos a la planta. En plántulas, puede causar “*dumping-off*” y después pudrición del tallo (Erwin y Ribeiro, 1996; Mendoza, 1996; Romero, 1999).

2.3.6 Ciclo de la enfermedad

Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo son: alta humedad del suelo y temperaturas frescas; en la última etapa del cultivo es más afectado, lo cual coincide con la época más lluviosa, junto a la mala nivelación del terreno que provocan mal drenaje y la temperatura del suelo de 20°C, esto permite el desarrollo de la enfermedad (Mendoza, 1996; Romero, 1999). Las oosporas (Figura 4) son la única fuente de inóculo primario y sobrevive en el suelo por más de dos años en ausencia del hospedante. El micelio es una fuente importante de inóculo secundario. El micelio y los esporangios, llegan a sobrevivir hasta 7 días en el suelo seco y 62 días en suelo húmedo (Mendoza, 1996; Romero, 1980; Romero, 1999). El inóculo queda en los residuos de cosecha; en las semillas atacadas y en el suelo como micelio u oosporas; se dispersa por medio de herramientas de trabajo y riego, que al ciclo siguiente germinan e infectan de nuevo (Mendoza, 1996; Romero, 1980; Romero, 1999).

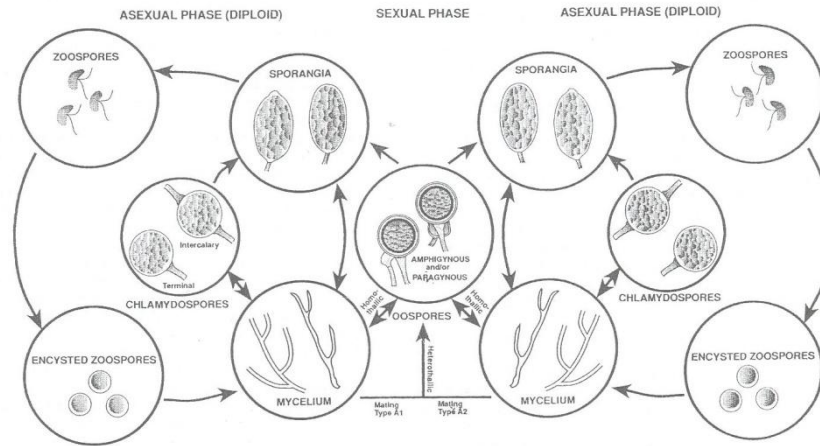


Figura 4. Ciclo de vida de *Phytophthora* sp. (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las oosporas pueden germinar directamente con la formación de un tubo germinativo o indirectamente produciendo esporangios. Los esporangios se forman en la base del tallo de las plantas de chile, los cuales liberan zoosporas que son llevadas por el agua a otra planta e inician la infección por las heridas o lenticelas de la planta; el movimiento de las zoosporas facilita la dispersión de la enfermedad (Mendoza, 1996; Pérez *et al.*, 2005; Romero, 1980).

2.3.7 Manejo de la Enfermedad

- Cultural: Plantar en terrenos donde no se ha establecido chile, hacer rotación de cultivos y no volver a plantar chile en el mismo terreno de 3 a 5 años aunque no se haya presentado la enfermedad; nivelación del terreno y formación de surcos altos con pendiente para evitar exceso de humedad. Usar semilla y plántula sana, descartando las que presentan síntomas de marchitez; quemar las plantas enfermas y eliminar todos los residuos. Para

reducir la incidencia y los daños de la enfermedad, dar riegos ligeros y frecuentes, en surcos alternados (uno si y uno no) (Aldana, 2006; Mendoza, 1996; Pérez *et al.*, 2005).

- Genético: Uso de variedades con tolerancia a esta enfermedad se presenta en el siguiente orden (tipos pasilla, guajillo, ancho, jalapeño y serrano), es decir, son más tolerantes los primeros y más susceptibles los últimos. Entre los métodos alternativos para controlar *P. capsici* destaca el injerto sobre patrones resistentes; El chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM334) es una de las más eficaces fuentes de resistencia genética a *P. capsici*. Sin embargo, la resistencia a *P. capsici* es de carácter dominante, su herencia es compleja debido a su naturaleza poligénica, por ello no se han generado cultivares de chile comerciales con una adecuada resistencia a este patógeno (García *et al.*, 2010; Mendoza, 1996).

- Químico y físico: Desinfectar semilla (con captan o thiram y Metalaxil) y plántula (con Metalaxil o Ridomil) más el uso frecuente de focetil aluminio en almácigo durante la germinación y antes del trasplante; En campo se recomienda solarizar o fumigar el suelo con metan sodio, más el uso de acolchado. Aplicación al suelo de Ridomil 5% granulado o con Ridomil 2E; durante el desarrollo del cultivo hacer aplicaciones preventivas y frecuentes con Previcur N, Ridomil gold 4E y Ridomil (Metalaxil), Aliette, Ricoil o Curzate, los cuales deben ser rotados. Al seguir las primeras recomendaciones se controla la enfermedad y se puede aplicar fungicidas

cúpricos o Daconil cada semana, antes de floración esto para evitar daño aéreo. También la aplicación de ácido acetil salicílico cada 8 días promueve los mecanismos de resistencia de la planta (Aldana, 2006; Mendoza, 1996).

- Biológico: El uso de agentes de biocontrol para reducir las poblaciones del patógeno que son resistentes a pesticidas y así disminuir el número de aplicaciones de estos últimos. Entre los organismos estudiados como agentes de biocontrol contra *P. capsici* se encuentran *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp., *Glomus intraradices*, *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp., es importante considerar la especificidad de los mecanismos de acción e interacción de los microorganismos con el propósito de hacer un uso eficiente de estos agentes de biocontrol (Ramos *et al.*, 2010).

Entre las principales causas de la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las enfermedades, destacan la preocupación de los riesgos al medio ambiente y al hombre por exposición a plaguicidas, contaminación de los mantos freáticos por lixiviaciones de agroquímicos aplicados al suelo, pérdida de control químico sobre ciertos patógenos (generación de resistencia) y las limitaciones económicas sobre la aplicación de químicos costosos, los cuales no eliminan por completo al patógeno, ya que muchos son fungistáticos y solo retardan el ataque en la planta hospedera (Aldana, 2006; Kloepeper, 1989; Pérez *et al.*, 2004).

Una alternativa para el manejo de enfermedades de la raíz es el uso microorganismos antagónicos como bacterias, levaduras y hongos que tienen la capacidad de ejercer un control biológico; muchos microorganismos del suelo pueden ser antagonistas de fitopatógenos pero a un no se han estudiado (Hernández *et al.*, 2007; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

2.4 Hongos en el suelo

Los hongos del suelo juegan un papel muy importante en los procesos biológicos como son la degradación de la materia orgánica, el reciclaje de nutrientes (fertilidad del suelo) y mejora la estructura física del suelo. Los hongos saprobios, junto con las bacterias, son los agentes que descomponen la celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina provenientes de los residuos vegetales. Las actividades agrícolas pueden afectar la diversidad de organismos presentes en el suelo, los cuales son mediadores del equilibrio entre los patógenos de las plantas y sus antagonistas. El mantenimiento de la diversidad de hongos del suelo beneficia directamente la agricultura sustentable (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Moreira *et al.*, 2012).

Los microorganismos que son patógenos vegetales producen daños considerables en los cultivos. No obstante, ciertos hongos presentes en el suelo son antagónicos a estos patógenos y pueden prevenir la infección de las plantas. Este antagonismo contra patógenos vegetales usualmente involucra la competencia por nutrimentos o la producción de compuestos inhibitorios como

metabolitos secundarios y enzimas extracelulares. 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 (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

Los microorganismos patógenos tienen diferentes respuestas ante los exudados radiculares, unos son estimulados y otros son inhibidos, además de haber compuestos que atraen a algunos grupos en particular. La presencia de antagonistas (bacterias, hongos y micoparásitos) puede ser un elemento primordial en el control de la incidencia y severidad de los fitopatógenos de la raíz (Fuentes y Ferrera-Cerrato, 2007). Para seleccionar a los microorganismos antagónicos se deben considerar las siguientes características generales (Hernández *et al.*, 2007; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007): a) Capacidad de colonizar rápidamente la superficie o que persista de manera efectiva. b) Mayor habilidad que el patógeno para adquirir nutrientes y que no sea exigente en requerimientos nutricionales. c) Capacidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas. d) Considerar su estabilidad genética. e) efectividad a bajas concentraciones. f) capacidad de reproducirse en medios de cultivo económicos.

Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos, y para la selección de nuevos antagonistas efectivos. Los mecanismos de acción involucran: la antibiosis (producción de enzimas líticas o metabolitos secundarios), parasitismo, competencia por los nutrientes y

espacio e inducción de resistencia (Guillén, 2005; Hernández *et al.*, 2007; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

2.4.1 Mecanismo de acción de los microorganismos antagonicos

- Antibiosis: Se refiere al antagonismo ejercido por los metabolitos de origen microbiano con actividad biocida, entre los cuales se encuentran los agentes líticos, los enzimas, los compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas, afectando el crecimiento u otras actividades metabólicas de otros microorganismos que habitan en el suelo como los fitopatógenos (Guillén, 2005; Roselló, 2003).
- Competencia: Consiste en la lucha de los organismos de control biológico y el patógeno por espacio, hospederos y nutrientes. Un factor esencial para que exista la competencia es la escasez o limitación de un elemento, porque si hay exceso no hay competencia (Guillén, 2005).
- Parasitismo: se trata de la acción directa de un microorganismo parasitando a otro, donde el patógeno es utilizado como alimento por su antagonista. Es un fenómeno que ocurre frecuentemente en algunos hongos. Los micoparásitos más ampliamente utilizados son: *Trichoderma* y *Gliocadium* (Guillén, 2005; Roselló, 2003).

- Resistencia Sistémica Inducida: La resistencia se refiere a la capacidad de una planta de resistir o suprimir el desarrollo del patógeno mediante mecanismos bioquímicos, físicos y estructurales de resistencia, cuando esta ha sido estimulada previamente (Guillén, 2005).

2.4.2 Antecedentes de uso de *Penicillium* spp. como antagonista

Boosalis en 1956 reportó el parasitismo de *Penicillium vermiculatum* y *Trichoderma* spp. sobre las hifas de *R. solani*, cuya invasión se inició por contacto directo de la hifa, de la cual se produjo posteriormente una estructura de penetración digitiforme (Fuentes y Ferrera-Cerrato, 2007).

En México uno de los primeros trabajos relacionados con el control biológico de enfermedades fue el de San Martín y Bailey (1978) quienes aislaron de hojas y frutos con roña del manzano a *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus foetidus* var. *pallidus*, *Trichoderma lignorum*, *Trichothecium roseum* y un actinomiceto (no identificado), los cuales mostraron acción efectiva contra *Venturia inaequalis* tanto *in vitro* como en campo y contra otros 15 hongos fitopatógenos: *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Sphaceloma* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Fusarium rigidiuscula*, *Botryodiplodia* sp., *Diplodia* sp., *Glomerella* sp., *Macrophomina* sp., *Sclerotium* sp., *P. capsici*, *Pythium mamillatum* y *Pythium ultimum* (Bettiol et al., 2014).

Penicillium oxalicum es considerado por distintos autores como un prometedor agente fúngico para el control de las enfermedades del suelo; es productor de un amplio rango de polisacáridos y enzimas que degradan la pectina, también glucanasas, celulasas, hemicelulasas y otras enzimas que degradan la pared celular de patógenos; el INIA de Madrid, trabajó con una cepa de *P. oxalicum* que actúa como antagonista de cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* que causan la fusariosis vascular del tomate; En estudios “*in vitro*” en confrontación dual y en invernadero se demuestra que *P. oxalicum* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y disminuir la fusariosis del tomate. Actualmente se hace referencia a *P. oxalicum* (cepa PO212) en el control de enfermedades vasculares de plantas hortícolas como *F. oxysporum*, *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*, *Botrytis cinerea*, *P. parasitica* y *P. infestans* en tomate, melón y sandía (Roselló, 2003; Vázquez, 2013).

2.5 *Penicillium* spp.

El género *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en 1809. Thom, en el año 1910, consideró a *Penicillium expansum* como la especie tipo del género. Las especies que incluye el género *Penicillium* son ubicuas, distribuidas en todo el mundo y consideradas saprófitas. Es un hongo cosmopolita, que se desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cuero, frutas, madera, etc; muchas de ellas viven en suelo o en materia orgánica en descomposición (Alexopoulos, 1977; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Martínez, 2003; Montes, 1992; Pitt y Leistner, 1991).

2.5.1 Clasificación taxonómica de *Penicillium* spp.

Reino Eumicota (Fungi)

Phylum: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Penicillium* (Pitt, 1980; Schoch *et al.*, 2009)

2.5.2 Descripción morfológica de *Penicillium* spp.

Las colonias de *Penicillium* son circulares de crecimiento rápido, con un borde neto muchas veces sin fructificación, mostrando el color del micelio, constituida por hifas delgadas (los filamentos alcanzan un diámetro entre 2 o 3 μm) y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. La superficie de la colonia al madurar se cubren con esporas, tomando diferentes colores (verde, verde azulado, verde aceituna o gris) según la especie; con aspecto aterciopelada, ligeramente algodonosa o con pequeños haces (fascículos) de conidióforos. Al final quedan completamente cubiertas de esporos con un aspecto pulverulento (Alexopoulos, 1977; Arias y Piñeros, 2008; Carrillo, 2003; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Montes, 1992; Pitt, 1980; Pitt y Leistner, 1991). *Penicillium* forma conidios en una estructura ramificada muy característica y su morfología definió el nombre

al género (del latín *Penicillium* = pequeño pincel) llamada conidióforo penicilado o con forma de pincel. Los conidióforos se originan del micelio de manera individual o en sinemas, está unido mediante el estipe; son largos, erectos y ramificados cerca del ápice, terminando en fiálides (Figura 5) (Alexopoulos, 1977; Barnett y Hunter, 1972; Carrillo, 2003; Hidalgo, 2013; Martínez, 2003; Montes, 1992; Naranjo, 2003).

Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 μm y la parte terminal no supera los 3 μm de largo. La fiálide es una célula especializada que produce los conidios; al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas basipétalas; los conidios (fialosporas o esporas asexuales) son hialinos o de colores brillantes en masa, unicelulares, principalmente esféricos, globosos u ovoides; la pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies. Los conidios, así como la fragmentación y dispersión del micelio constituyen las principales formas de reproducción de esta especie (Barnett y Hunter, 1972; Carrillo, 2003; Martínez, 2003; Montes, 1992; Naranjo, 2003).

El conidióforo es fundamental en la clasificación del hongo, así pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: monoverticilado (si hay sólo un verticilo de fiálides en el pincel), asimétrico, biverticiladosimétrico y poliverticilado

(ramificado en ramas, r  mulas, m  tulas y fiálides). Las paredes del estípite, las ramas o las m  tulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas; La pared de las fiálides siempre es lisa (Arias y Piñeros, 2008; Carrillo, 2003).

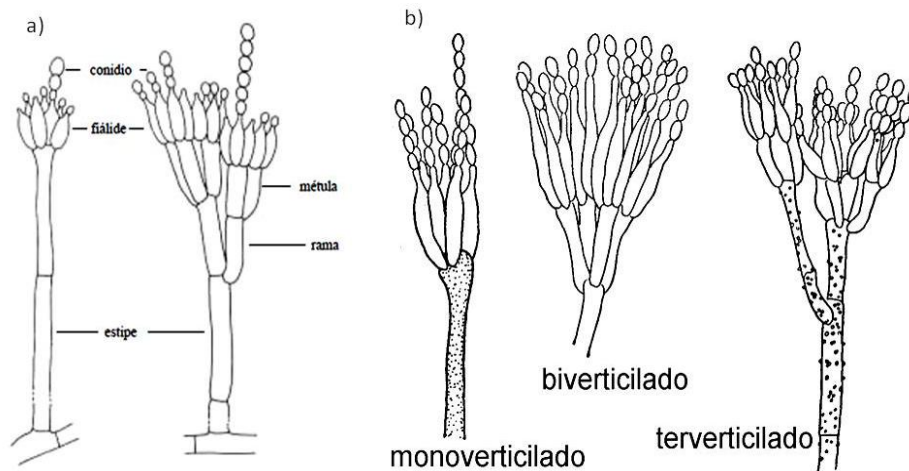


Figura 5. a) Nombre de las estructuras del conidióforo de *Penicillium* spp. (Martínez, 2003); b) Tipos de conidióforo. (Alexopoulos, 1977; Carrillo, 2003).

Las cepas de *Penicillium* con reproducción sexuada corresponden a los géneros teleom  rficos *Eupenicillium* que forma cleistotecios con pseudopar  nquima constituido por células de pared engrosada, y *Talaromyces* que presenta los ascas rodeados de hifas entrelazadas formando la delgada pared del gimnotecio (Carrillo, 2003).

La esporulación a una baja concentración del agua permite a los hongos completar su ciclo de vida sobreviviendo a las condiciones adversas, para ser luego diseminados por el viento, la lluvia, insectos y   caros. *Penicillium* no es afectado por la luz y esporulan fácilmente en la obscuridad, pueden tolerar altas

concentraciones de CO₂ por lo que suelen colonizar granos en silos sellados pero, la combinación de 80% CO₂ y <1% O₂ en la atmósfera del silo inhibe el desarrollo fúngico (Carrillo, 2003).

2.6 Métodos para detectar variación genética

Las estrategias clásicas para el estudio de la variabilidad genética tales como anatomía comparativa, morfología, embriología fisiología se han visto complementadas de gran manera por las técnicas moleculares. Los biólogos evolutivos usan tanto datos morfológicos como moleculares para establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, estimar la variación dentro de las poblaciones y para probar hipótesis de adaptaciones ecológicas (Eguiarte *et al.*, 2007; González y Simpson, 1997).

El desarrollo de los “marcadores moleculares”, está basado en los polimorfismos encontrados en proteínas o DNA y trabajan directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de los caracteres morfológicos se asume. Ambos enfoques siguen desempeñando un papel crucial en casi todos los grupos de organismos y que hasta nuestros días las especies se describen y se identifican con base en ambas clases de datos; facilitado la investigación en disciplinas como la taxonomía, filogenia, ecología y genética (Eguiarte *et al.*, 2007; González y Simpson, 1997).

2.6.1 Marcadores morfológicos

Las características morfológicas se han usado para estimar los niveles de variabilidad, ya que permiten determinar la respuesta a la selección y su fondo genético. Los criterios morfológicos pueden ser evaluados en cualquier etapa del ciclo de vida. La diversidad genética puede ser evaluada en hongos con la observación de diferentes características morfológicas como: el nivel de organización celular, características de talo, características del micelio (tamaño, forma, color, función, etc. Algunos de los caracteres son bastante estables, pero la gran mayoría son muy variables, ya que son fuertemente influenciados por el medio ambiente por lo que muchas clasificaciones son ambiguas y poco confiables provocando divergencia entre investigadores, además, es frecuentemente difícil encontrar suficientes marcadores morfológicos para realizar un estudio de variabilidad confiable (González y Simpson, 1997).

2.6.2 Marcadores Moleculares

Los caracteres moleculares son universales, existen genes presentes en todos los genomas celulares, como en los ribosomales, que pueden proveer de información para reconstrucciones filogenéticas, donde los caracteres morfológicos son inaplicables. En la actualidad existen un número considerable de métodos moleculares que nos permiten conocer como se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como los análisis de proteínas o de manera directa con estudios de DNA. Los

diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Eguiarte *et al.*, 2007; González y Simpson, 1997). Su uso principal es para detectar la variabilidad genética y cambios en el genoma, en poblaciones en animales, plantas y microorganismos. Han sido muy útiles en el estudio de taxonomía, migración y filogenia de fitopatógenos (Flores *et al.*, 1997; González y Simpson, 1997).

2.7 Herramientas Biotecnológicas

2.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*. Esta técnica consiste básicamente en la amplificación exponencial de un fragmento o secuencias específicas de DNA, utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *Taq* polimerasa. Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el DNA (Eguiarte *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 1997).

Este es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades vegetales. Esta técnica ha sido usada ampliamente y sigue siendo un campo de investigación activa sobre todo en aquellos patógenos

difíciles de cultivar artificialmente. La técnica es rápida y versátil ya que la composición de la mezcla de PCR es simple; consiste en la muestra a analizar (DNA blanco), agua, amortiguadores, sales, nucleótidos, iniciadores o primers (pequeños oligonucleótidos de DNA) y *Taq* polimerasa (Flores *et al.*, 1997).

2.7.2 ITS (Internal Transcribed Sequences)

Las secuencias denominadas ITS (Secuencias de Transcripción Interna) son regiones espaciadoras intergénicas del DNA ribosómico, variables no codificantes llamadas ITS1 e ITS2 (Figura 8), empleadas para la distinción entre especies de hongos filamentosos y han desarrollado sondas o iniciadores específicos para la detección y diferenciación de hongos. Los ITS, no son regiones codificantes de aminoácidos y por lo tanto están sujetas a una elevada variabilidad. Estas regiones generan un importante polimorfismo, dentro de la misma entidad taxonómica, en particular para los géneros y especies de fitopatógenos observándose variación (Flores *et al.*, 1997; González, 2009; Ramírez, 2013).

La elección del rDNA se debe a que se encuentra presente en todos los seres vivos lo que permite que se puedan establecer comparaciones entre casi cualquier organismo. Los ribosomas son las estructuras celulares responsables de la síntesis de proteínas, es decir de la traducción del código genético. El rDNA puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo. El rDNA se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades

altamente conservadas dentro de las especies (Eucariontes: 18 rDNA, 5.8 rDNA y 28 rDNA; Procariontes: 16S, 5.8S y 28S), separadas por dos espaciadores ITS con elevadas tasas de sustitución. Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente (Eguiarte *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 1997; González, 2009; Ramírez, 2013).

2.7.3 RFLP

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP = “Restriction Fragment Length Polymorphism”), es una de las primeras técnicas de diagnóstico de organismos descritas desde la invención de la PCR, y consiste en visualizar diferencias en la secuencia de DNA que fueron reconocidos por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Las endonucleasas de restricción se encuentran en las bacterias como parte de un mecanismo que utilizan para degradar al DNA extraño (exógeno). Son proteínas que se pegan particularmente a la doble cadena de DNA y la rompen en sitios específicos (González, 2009; Valadez y Kahl, 2005).

Estas enzimas reconocen y cortan el DNA en secuencias muy específicas (fragmentos de longitud definida) de cuatro a seis pares de bases nitrogenadas (sitios de restricción) en la molécula de DNA. El DNA posee sitios de restricción a intervalos variables por lo que se generan fragmentos diferentes, cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y

permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genoma (Flores *et al.*, 1997; Valadez y Kahl, 2005).

Para realizar la técnica de RFLPs se requiere del producto amplificado de PCR con cebadores específicos donde se obtiene una región genómica a la cual se realiza una digestión con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes de la digestión son separados por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o con acrilamida teñidos con nitrato de plata (Eguiarte *et al.*, 2007; González, 2009; Valadez y Kahl, 2005).

2.7.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

La técnica de Secuencias Internas Simples Repetidas ISSR (son marcadores semi-específicos) es una alternativa a la técnica de micro satélites (SSR) que utiliza un solo iniciador amplificado por PCR, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di o trinucleótidos abundantes en el genoma. Los iniciadores ISSRs son ligeramente mayores (16-20 pares de bases) por lo que pueden anclarse mejor al DNA y mejorar la fiabilidad y reproducibilidad del sistema (Eguiarte *et al.*, 2007; Ramírez, 2013; Sánchez *et al.*, 2012).

La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de DNA entre los microsatélites. Se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la

“huella digital genética” de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada. Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus (Eguiarte *et al.*, 2007).

2.7.5 Secuenciación.

Los análisis más detallados de diferenciación de DNA pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos. La secuenciación automática que utiliza la reacción de Fred Sanger es un procedimiento relativamente fácil ya que por medio de electroforesis capilar se detecta la secuencia de interés. Cada emisión fluorescente es transmitida como una señal directamente a la computadora donde un programa la interpreta y la codifica como un nucleótido particular. La captura de secuencias se hace más rápida debido a que incorporan programas que leen los nucleótidos directamente desde el gely son registradas por la computadora. Entre las principales ventajas que tiene la secuenciación de DNA es su alta reproducibilidad y que es codominante (Eguiarte *et al.*, 2007; Ramírez, 2013).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de trabajo

El trabajo se realizó en el laboratorio de Usos Múltiples y el laboratorio de Biología Molecular, localizados en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Texcoco de Mora, Edo. de México. Se contó con la colaboración del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío (CEBAJ) e Instituto Tecnológico de Roque (ITR), ambas instituciones de Celaya, Guanajuato, México.

3.2 Muestreo

3.2.1 Colectas de muestreo para aislamiento de *Penicillium* sp.

El muestreo se realizó en diversos puntos del estado de Guanajuato y del estado de México (Cuadro 3); fue dirigido a aislar la mayor diversidad de especies de *Penicillium* sp. Se procesaron muestras de diversos orígenes dentro de los que destacan tubérculos, bulbos, frutos, raíces, tallos, suelo y medio ambiente. Los muestreos realizados a los campos productores de chile fueron dirigidos a la toma de muestras de suelo de la rizosfera de plantas sanas de chile (Figura 6).



Figura 6. Muestreo en campos de cultivo dirigidos a *Penicillium* sp.

En el INIFAP campo experimental bajo se realizaron muestreos de suelo a una profundidad de 20 a 25 cm en diferentes cultivos, donde se destacan los lotes que tienen movimiento constante del suelo por la maquinaria agrícola (siembra de trigo, maíz, frijol, chile, ajo, etc.) y los lotes donde el suelo tiene un manejo mínimo (siembra de granada, arbustivas nativas, etc.). Además el laboratorio de fitopatología de la misma institución proporcionó muestras de papa, ajo, chile y ambientales del mismo laboratorio con signos y síntomas de *Penicillium* sp.

3.2.2 Colectas de muestreo para aislamiento de *Phytophthora capsici*

El muestreo se realizó en zonas productoras de chile del estado de Guanajuato (Cuadro 3). Se colectaron muestras de suelo de la rizosfera de plantas de chile y jitomate con síntomas de marchitez, así como plantas completas con la misma sintomatología (Figura 7).



Figura 7. Muestreo en cultivos de chile y jitomate con síntoma de Marchitez.

La cepa de *P. capsici* C7P8F7 fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología (INIFAP) aislada en campos productores de chile en Dolores Hidalgo, Guanajuato.

Cuadro 3. Localización de los puntos de muestreo.

Localidad	Geolocalización	Cultivo	Muestra
Cuarta Brigada, Irapuato, Guanajuato.	N 20.62398 O -101. 276770	Chile	suelo y plantas
Rancho Canta Ranas L-1, Abasolo, Guanajuato.	N 20.509525 O -101.547864	Chile	suelo y plantas
Rancho Canta Ranas L-2, Abasolo, Guanajuato.	N 20.505098 O -101.558130	jitomate, cultivo anterior chile	suelo y plantas
Rancho el Palomar, Abasolo, Guanajuato.	N 20.415291 O -101 457564	Jitomate	suelo y plantas
Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	N 20.492484 O -101.457564	Chile	suelo y plantas
Rancho Aguilarés, Juventino Rosas, Guanajuato.	NR	Varios	Suelo
INIFAP, CEBAJ, Celaya, Guanajuato.	N 20° 34' O 100° 49'	Varios	Suelo
INIFAP, CEBAJ, Celaya, Guanajuato.	N 20° 34' O 100° 49'	arbustivas nativas	Suelo
Nopaltepec, Estado de México.	N 19° 47.499' WO 98° 42.789'	Nopal tuna y xoconostle	Suelo
Axapusco, Estado de México.	N 19° 43.778' WO 98° 46.051'	Nopal tuna y xoconostle	Suelo
San Martin de las Pirámides, Estado de México.	N 19° 43.068' WO 98° 48.314'	Nopal tuna y xoconostle	Suelo
Acolman, Estado de México.	N 19° 38.855' WO 98° 53.394'	Nopal tuna y xoconostle	Suelo
Cuautlalpan, Texcoco, Edo de México.	NR	Varios	Frutos
Chapingo, Texcoco, Edo de México.	N 19° 29' O 98° 53'	Varios	Frutos
San Luis Huexotla, Texcoco, Edo de México	NR	Varios	Frutos
Col. ISSSTE, Texcoco, Edo de México	NR	Varios	Frutos

NR: No Referenciado

3.3 Aislamiento de microorganismos (French y Hebert, 1982)

3.3.1 Aislamiento de tejido vegetal

A las muestras colectadas, dependiendo de la parte de la planta (tubérculo, bulbo, fruto, raíz y tallo), se lavó superficialmente con agua corriente para eliminar el exceso de tierra. A cada muestra con sintomatología de *Penicillium* sp. y *P. capsici*, se le realizaron cortes de aproximadamente 0.5 cm, se les realizó un primer lavado con hipoclorito de sodio 25% durante unos segundos; después se hizo otro lavado con alcohol etílico 70% durante unos segundos. Entre cada lavado se enjuagó con agua destilada estéril. Se retiró el exceso de agua sobre papel absorbente. Los fragmentos de tejido se sembraron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con ácido láctico (Figura 8).

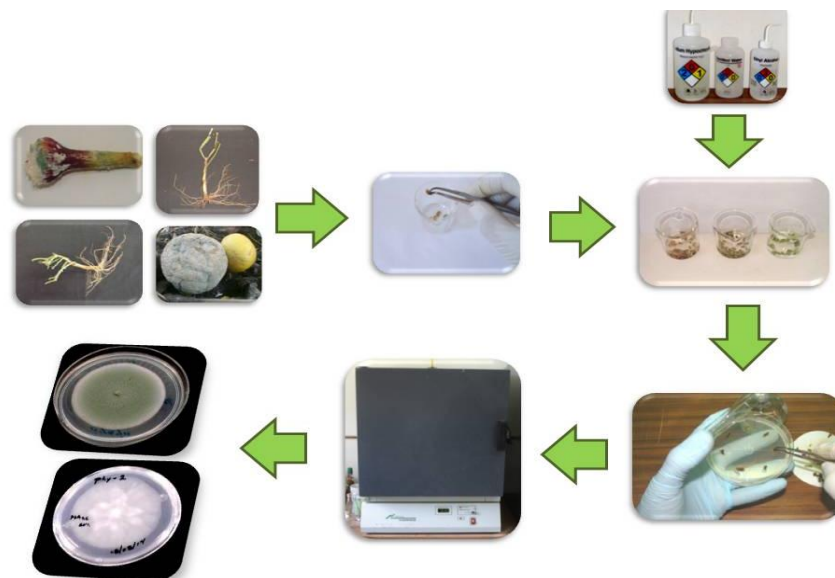


Figura 8. Proceso de aislamiento de microorganismos de tejido vegetal.

Las cajas Petri se incubaron a 27 °C. Una vez localizados los crecimientos fúngicos se transfirieron a nuevas cajas Petri con PDA y se incubaron a 27 °C para su posterior utilización.

3.3.2 Aislamiento de suelo, técnica de dilución para *Penicillium* sp.

Se pesaron 10 gr de suelo de cada muestra y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 150 mL, se agregaron 90 mL de agua destilada estéril, se agitó y se dejó reposar por 10 minutos, se volvió a agitar y con la ayuda de una micropipeta se tomó una alícuota de 1000 µL, se llevó a un tubo de ensaye que contenían 9 mL de agua destilada estéril para realizar las respectivas diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000), una vez hechas todas las diluciones se tomaron 50 µL de cada una de estas y de forma individual se distribuyó en cajas Petri con medio PDAAc con ayuda de una varilla de vidrio (Figura 9).

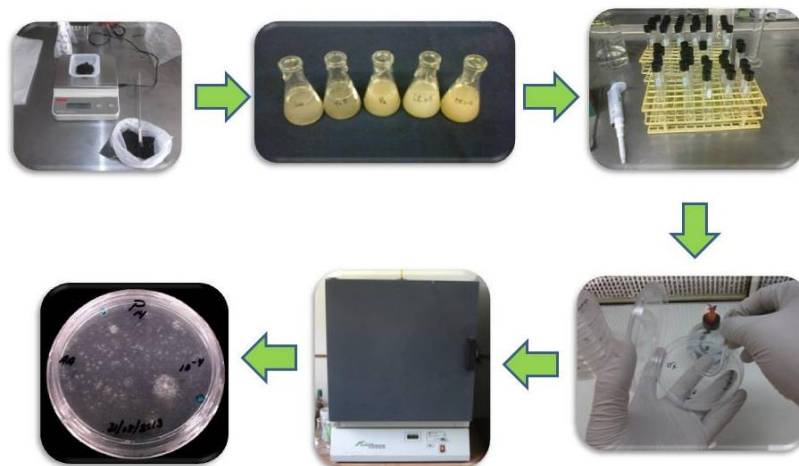


Figura 9. Proceso de aislamiento de *Penicillium* sp. de suelo.

Se incubaron a 27 °C de 7 a 10 días. Se localizaron con un microscopio los conidios germinados y se transfirieron a cajas nuevas con PDAAc y se incubaron a 27 °C para su posterior utilización.

3.3.3 Aislamiento de suelo, técnica de trampa (cebo o atrayente) para *Phytophthora capsici* (Erwin y Ribeiro, 1996)

Para el aislamiento de *P. capsici* de suelo se utilizó la técnica de trampa-cebo o atrayente vegetal. El procedimiento consistió en pesar 30 gr de suelo, se colocó en un frasco de vidrio limpio, se agregaron 40 mL de agua destilada estéril y se introdujo en el interior un chile serrano previamente lavado y desinfectado. Se incubó de 7 a 10 días a 25 °C para observar el crecimiento de micelio algodonoso que creció sobre el fruto de chile y proceder a su aislamiento con la técnica de aislamiento de tejido vegetal, y su posterior purificación de las cepas con la técnica de punta de hifa (Figura 10).



Figura 10. Proceso de aislamiento de *Phytophthora capsici* de suelo.

3.4 Purificación de cepas aisladas (French y Hebert, 1982)

3.4.1 Cultivo monospórico (*Penicillium* sp.)

La técnica de cultivos monospóricos consistió en extraer las esporas de cada cepa con 20 mL de agua destilada estéril, para obtener así una suspensión (inicial), esto se realizó para cada una de las cepas. De la suspensión inicial se tomó 1 mL y se vació en un tubo con 9 mL de agua destilada estéril para obtener una dilución de 1×10^{-1} . De la dilución 1×10^{-1} se tomó 1 mL y se vació en otro tubo con 9 mL de agua destilada estéril para obtener la dilución 1×10^{-2} . El procedimiento se repitió hasta obtener la dilución 1×10^{-4} ó 1×10^{-5} dependiendo de la concentración de conidios de la suspensión inicial. De las diluciones 1×10^{-4} ó 1×10^{-5} se tomaron 100 μ L y se colocaron en una caja con medio PDAac, se dispersaron con una varilla de vidrio y se incubaron a temperatura 27 °C. Entre el segundo y tercer día se realizaron observaciones en el microscopio para detectar los primeros conidios germinados. Al ser detectado un conidio germinado se transfirió a una caja con medio PDAac fresco y se incubó a 27 °C.

3.4.2 Punta de Hifa (*Phytophthora capsici*)

Se sembró una porción del oomiceto (aislado previamente) en medio agar agua (AA), que es un medio con bajo contenido de nutrientes. Una vez que comenzó a desarrollar el micelio y se apreciaron hifas separadas dentro del medio de cultivo, se ubicó con el microscopio usando el objetivo 10x o un estereoscopio

de 80 a 120x, y se hizo un corte detrás de la célula terminal de la hifa con un bisturí previamente desinfectado formando un bloque de agar rectangular conteniendo en su interior la hifa, el cual se transfirieron a medio PDA y se incubó a 27 °C.

3.5 Identificación morfológica

Consistió en sembrar las cepas de *Penicillium* sp. en medio PDAac donde se describió forma y color de colonia. Una vez desarrollado el hongo se realizaron montajes, los cuales se observaron en microscopio compuesto y con la ayuda de las claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1972) y se identifico a nivel de género.

Para las cepas de *Phytophthora* sp. fue necesario la formación de esporangios, estructuras utilizadas para su identificación. Se sembraron las cepas en medio de cultivo V8, donde se dejaron crecer hasta tener ocho días de edad. Se cortaron cinco fragmentos de 1 cm² del medio V8 con micelio de *Phytophthora* sp. y se colocaron en una caja Petri vacía, a la que se le colocó previamente 10 mL de agua destilada estéril. Se incubó a temperatura ambiente entre 8 a 10 días, para la formación de los esporangios; una vez formados se realizaron montaje y se observó en microscopio compuesto para identificar las estructuras características según Erwin y Ribeiro (1996).

3.6 Técnicas moleculares

3.6.1 Extracción de DNA Método CTAB 2% y Acetato de Sodio (modificado de Doyle y Doyle, 1987; Weising *et. al.*, 2005)

Para la extracción de DNA de hongos y oomicetos se utilizó la técnica CTAB 2% pre-calentado a 60 °C colocado 1000 µL en tubos Eppendorf de 2 mL previamente etiquetado. Con una espátula estéril se extrajo el micelio de la cepa purificada y se colocó dentro del tubo que contenía CTAB 2%. Se incubó a 80 °C durante 60 minutos, mezclado a intervalos de 10 minutos con el aparato vortex. Al término de la incubación se centrifugó durante 5 minutos a 11,150 rpm. En un tubo Eppendorf nuevo se transfirió el sobrenadante. Se adicionaron 500 µL de cloroformo-isoamilico (24:1). Se mezcló durante 10 minutos por inversión a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 minutos a 11,200 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se lavó con 700 µL de cloroformo-isoamilico (24:1). Nuevamente se mezcló durante 10 minutos por inversión a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 minutos a 11,200 rpm. El sobrenadante se llevó a otro tubo con 950 µL de etanol al 100% previamente enfriado a -20 °C. Se mezcló suavemente por inversión durante 15 segundos. Se llevó a incubar por 2 horas a -20 °C. Se centrifugó a 11,200 rpm por 30 minutos. Se decantó el sobrenadante evitando perder la pastilla, la cual se resuspendió en 400 µL de TE y se incubó a 55 °C por 15 minutos. Se añadieron 34 µL de Acetato de sodio 3 M más 1 mL de etanol al 95%. Se incubó a -20 °C por 1 hora. Se centrifugó a 11,200 rpm por 5 minutos y se descartó el

sobrenadante. La pastilla se lavó con 600 µL de isopropanol al 70%. Se centrifugo por 5 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente. Se re-suspendió la pastilla con 100 µL de TE y se almaceno a -20 °C.

3.6.2 Cuantificación del DNA

El DNA extraído se cuantificó utilizando un Nanodrop (espectrofotómetro) y el programa ND 1000® V3.5.2 (Accesolab S.A. de C. V.) de acuerdo a las instrucciones del equipo.

3.6.3 Calidad del DNA en Gel de agarosa

Para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% cargando 5 µL de la muestra de DNA Stock en cada pozo del gel, previamente mezclado con 4 µL de buffer de carga y en una cámara horizontal. Se utilizaron marcadores de 100 pb, y 1 kb para estimar el peso molecular de los fragmentos de PCR. El tiempo de corrida generalmente fue de 45 a 60 minutos a 90 voltios. Para el revelado del gel de agarosa, este se sumergió en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 10 min, y después se enjuagó en agua destilada por 10 min. Se llevó al foto documentador modelo Universal Hood II, BIORAD®, con el programa Quantity One®.

3.6.4 Amplificación región ITS con PCR

Para amplificar la región ribosomal del DNA de los hongos y oomicetos se utilizó la reacción PCR-ITS con los iniciadores (primers) siguientes:

- ITS 5HP: 5'-GGA-AGG-AGA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3'
- ITS NL4: 5'-GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G-3'

Las condiciones de termociclaje 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 (Cuadro 4). Se utilizó Taq polimerasa de la marca PROMEGA®.

Cuadro 4. Reacción de PCR-ITS a un volumen final de 50 µL.

Reactivo	Concentración	Volumen/tubo	Concentración final
HPLC	Ajustar a 50 µL	6.7 µL	-----
Buffer	5X	10 µL	1X
MgCl ₂	25 mM	5 µL	2.5 mM
dNTP's	500 mM	20 µL	200 mM
Iniciador 5HP	10 pM	1.5 µL	15 pM
Iniciador NL4	10 pM	1.5 µL	15 pM
Taq polimerasa	5 U/µL	0.3 µL	1.5 U
DNA	20 ng	5 µL	2 ng

Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa 2% acorde a la técnica antes mencionada.

3.6.5 RFLPs

Para la técnica de PCR-RFLPs se utilizaron los producto de PCR de la región ITS previamente amplificados mas las enzimas de restricción *Hinf* I (Fermentas®), *Hha* I (Promega®), y *Hae* III (Promega®). La reacción de digestión se preparó de acuerdo a las especificaciones de cada fabricante y se incubaron a 37 °C por un periodo de aproximadamente 12 horas. Para la visualización de los cortes producidos por las enzimas se utilizó el protocolo del gel de acrilamida.

3.6.6 ISSR

La técnica de PCR-ISSR se realizó con los primers: (AC)₈YG y (GGAT)₄. Se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 35 ciclos (95 °C por 30seg.; 55 ó 46 °C por 45 seg. dependiendo el primer; 72 °C por 2 min), y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min (Cuadro 5).

Se utilizó Taq polimerasa de la marca PROMEGA®. Para la visualización de los productos de PCR-ISSR se utilizó el protocolo del gel de acrilamida.

Cuadro 5. Reacción de PCR-ISSR a un volumen final de 25µL.

Reactivos	Concentración	Volumen/tubo	Concentración final
HPLC	Ajustar a 25 µL	0.2 µL	-----
Buffer	5X	5 µL	1X
MgCl ₂	25 mM	2.5 µL	2.5 mM
dNTP's	500 mM	10 µL	200 mM
Primer	10 pM	2 µL	20 pM
Taq polimerasa	5 U	0.3 µL	1.5 U
DNA	20 ng	5 µL	4 ng

3.6.7 Gel de acrilamida

Para la separación y visualización de los fragmentos amplificados, así como de los cortes con enzimas, se utilizó el gel de acrilamida y una cámara vertical C.B.S. Scientific CO®. Los cristales de la cámara se limpiaron con etanol 70% y papel Kim Wipes®. Los reactivos y cantidades necesarias de reactivos para preparar el gel de poliacrilamida 6% se indican en la Cuadro 6.

Cuadro 6. Reactivos para una placa de 60 mL (Valadez y Kalh, 2005)

Reactivos para gel de poliacrilamida al 6 %	Volumen
Acrilamida-bisacrilamida 30%	13 mL
Agua destilada	35 mL
TBE 5X	12 mL
APS (Persulfato de amonio) 10%	420 µL
TEMED (NNNN Tetramethylethylenediamine 99%)	35 µL

Se vació la poliacrilamida en los cristales y se colocó un peine con 50 pozos, se dejó solidificar durante 40 minutos. Los cristales se colocaron en la cámara, se sujetaron con pinzas, se agregó el buffer de corrida TAE 1X. Se cargaron 6 µL de cada muestra (mezcladas previamente con 5 µL buffer de carga). También

se colocaron marcadores peso de 100 pb y 1 Kb como referencia. La cámara se conectó a una fuente de poder y se corrió a 200 voltios durante 2 horas. Los geles se revelaron con las siguientes soluciones en agitación constante de acuerdo al siguiente orden: 1) Solución fijadora de etanol 10% y ácido acético 1%, durante 10 min y se retiró. 2) Solución de tinción con nitrato de plata 0.2% durante 10 min y se retiró. 3) Enjuague con agua destilada. 4) Solución reveladora de hidróxido de sodio 3% con formaldehído (100 μ L por cada 100 mL) hasta la visualización de las bandas.

3.6.8 Bioestadística: Decodificación de Geles y Dendogramas

A partir del revelado de los geles del acrilamida se observaron bandas las cuales se les calculó el peso de cada una con respecto a los marcadores de 100 pb y 1 kb. Se generó una matriz binaria (1= presencia de banda, 0= ausencia de banda) utilizando en programa Microsoft® Office Excel®. La matriz binaria se llevó al programa FreeTree© versión 0.9.1.50 para ser analizada utilizando el índice Jaccard y el método de construcción de árbol UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) método de agrupamiento par con media aritmética no ponderada. Para visualizar el dendograma se utilizó el programa TreeView© versión 1.6.6.

3.6.9 Secuenciación

3.6.9.1 Amplificación de la zona de interés a secuenciar

Para realizar la secuenciación de las cepas *Penicillium* sp. se utilizó el producto de PCR de la región ITS amplificada para la cual se utilizaron los primers 5HP y NL4 que nos permitieron obtener fragmentos de aproximadamente 1300 pb.

En el caso de *P. capsici* se utilizó el gen nuclear β -Tubulina para lo cual se emplearon los iniciadores TUB901 (5'-TACGACATTTGCTTCCG-3') y TUB1401 (5'-CGCTTGAACATCTCCTGG-3'). Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes: dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 2.75 mM, 10 pM de cada iniciador, buffer de PCR 1x, Go Tag DNA Polimerasa 1U (Promega®), DNA a una concentración de 20 ng/ μ L, con un volumen final por tubo de 25 μ L; El programa de PCR fue un ciclo de 94 °C por 1.5 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 55 °C por 60 s, 72°C por 90 con una extensión final de 72 °C durante 5 min. Las amplificaciones se visualizaron en gel de agarosa 2%, durante 90 min a 90 V y teñido con bromuro de etidio.

3.6.9.2 Limpieza de las amplificaciones

El proceso de secuenciación requirió de la limpieza de las amplificaciones de la región ITS y gen nuclear β -Tubulina. En la limpieza se degradan los nucleótidos y primers o iniciadores. Se utilizó la enzima EXO-SAP (Shrimp Alkaline

Phosphatase y Exonuclease I) de Promega®, utilizando 2 µL de la enzima ExoSAP y 5 µL de producto de PCR. A la mezcla se le dio un tratamiento que consistió en 1h a 37 °C y posteriormente 15 min a 72 °C. Terminado el proceso se cuantificó la concentración de DNA y se hicieron diluciones a una concentración final de 20 µg/mL por muestra.

3.6.9.3 Reacción de secuenciación para *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici*.

La reacción de secuenciación se realizó con el Kit Terminator Ready Reaction V3.1 (Applied Biosystems).

Una vez terminada la limpieza de las amplificaciones (indicada en la sección anterior), se tomaron 10 µL de la mezcla de reacción (Cuadro 7), a la cual se le adicionaron 10 µL de agua MiliQ y 30 µL de etanol 95% (frio) y se dio un vortex, dejándolo reposar por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Al finalizar los 30 min se centrifugó la muestra por 20 min a 14 000 rpm. Se inclinó el tubo y se retiró la mezcla del alcohol, con ayuda de una micropipeta colocando la punta del lado contrario al pellet (cuidado de no perder la pastilla). Se lavó con 125 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm; pasado el tiempo se retiró el etanol. Se dejó secar la pastilla en el termo-block (90 °C por 1 min.) para evaporar el exceso de etanol y se re-suspendió en 10 µL de formamida. Se tomó 1µL de la reacción y se colocó en el Secuenciador 3130X Applied Biosystems®.

Cuadro 7. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción.

Reactivo	1X
Bib Dy2	1 µL
Buffer 5X	1.5 µL
DNA-PCR	1 µL
Primer	4 µL
Agua MiliQ	2.5 µL
Volumen total	10 µL

3.6.9.4 Análisis de Secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de las muestra de cada uno de los microorganismo, se editaron empleando los programas Finch TV 1.4.0.© y BioEdit Sequence Aligment Editor© para alinear las secuencias obtenidas. Se realizó una comparación con las secuencias reportadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el programa BLAST. Adicional se tomaron secuencias reportadas por el GenBank y las obtenidas en este trabajo, con las cuales se generó un árbol filogenético utilizando el programa Mega 6.

3.7 Caracterización de cepas de *Phytophthora capsici*

3.7.1 Caracterización en medio de cultivo

Las cepas de *P. capsici* que se aislaron previamente se evaluaron en medio PDA y V8 para registrar el crecimiento diario y calcular su velocidad de crecimiento en cada uno de los medios.

3.7.2 Pruebas de patogenicidad *in-vitro*

El experimento consistió en evaluar las cepas aisladas de *P. capsici* (Phy-1, Phy-2, Phy-3, Phy-4, Phy-5, Phy-6, Phy-7 y Phy-8) las cuales conformaron cada uno de los tratamientos y cada tratamiento con 9 plantas de chile siendo estas las repeticiones. Se utilizó la semilla de chile de la variedad Anaheim reportada como susceptible (Rico, 2002), la cual se sembró en una charola de germinación en invernadero. Se utilizaron plantas con tres hojas verdaderas; las plántulas de chile se colocaron en frascos de vidrio, cada uno contenía 50 mL de agua destilada estéril y tres fragmento de medio de cultivo V8 de 1 cm² con micelio de *P. capsici* de 8 días de edad (Figura 11). La temperatura durante el experimento fue de 25 °C.

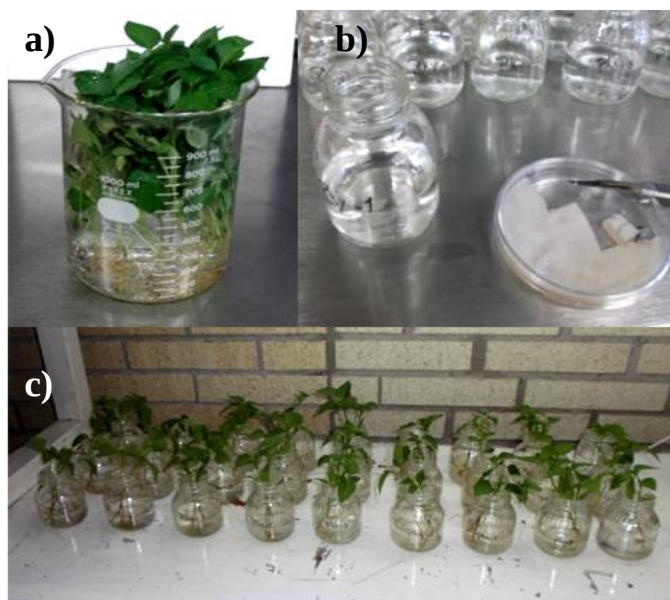


Figura 11. Procedimiento de establecimiento del experimento. a) Plantas con la raíz lavadas b) Frasco con agua y caja Petri con *P. capsici* c) distribución del experimento.

Se registró la incidencia y severidad para determinar cuál era la cepa más agresiva y así utilizarla en los siguientes estudios. Para la Incidencia de la Enfermedad (IE) se aplicó la formula (Wolcan *et al.*, 2001):

$$IE (\%) = \frac{\text{Nº de plantas enfermas}}{\text{Nº total de plantas}} \times 100$$

Se utilizó la escala de daño de Bosland y Lindsey (1991) (Figura 12 y Cuadro 8). El experimento fue un diseño completamente al azar.

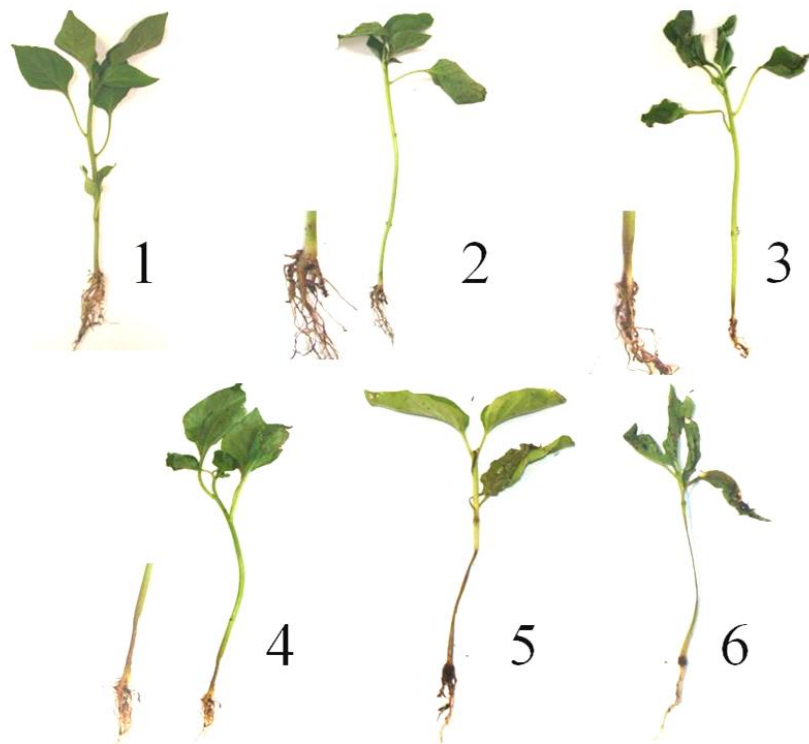


Figura 12. Escala visual del daño utilizado para la evaluación de la severidad.

Cuadro 8. Valores escalares y porcentuales de la escala de daño (Bosland y Lindsey, 1991).

Escala	Sintomatología en planta de chile	valor %
1	Planta sana, vigorosa.	0%
2	Poca presencia de oscurecimiento en las raíces.	10%
3	Raíces de color café, poca presencia del impedimento del crecimiento, muy pequeña lesión en el tallo.	25%
4	Raíces de color café, pequeña lesión en el tallo, marchitez de las hojas más bajas (basales), impedimento del crecimiento de la planta.	50%
5	Raíces de color café, amplia lesión en el tallo, ceñido o estrangulado, en general la planta se marchita, impidiendo el crecimiento.	75%
6	Planta muerta.	100%

3.8 Confrontación dual (Bell *et al.*, 1982).

En base a los resultados obtenidos en el los RFLPs de *Penicillium* sp. se generaron agrupaciones las cuales se utilizaron para definir los tratamiento (Cuadro 9); donde cada tratamiento corresponde a una cepa diferente de *Penicillium* sp., las cuales se utilizaron para realizar las confrontaciones duales para evaluar el tipo de antagonismos sobre *P. capsici*. Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones, donde se utilizaron cajas de Petri con medio PDA colocando los organismos a evaluar a 1 cm de la orilla de la caja. Primero se colocaron las cepas *Penicillium* sp. en cada una de las cajas por tratamiento, mediante la impregnación de una suspensión de conidios en papel filtro a una concentración de 4×10^6 (Fang y Tsao, 1995). Se incubó a 27 °C. Al siguiente día se transfirió la cepa Phy-2 de *P. capsici* en cada tratamiento y repetición

para iniciar la confrontación dual. El experimento fue un diseño completamente al azar y se evaluó cuando el tratamiento con *P. capsici* sin antagonista llenó la caja Petri alrededor de 10 días.

Para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno se aplicó la fórmula (Seema and Devaki, 2012):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{C2 - C1}{C2} \times 100$$

Donde: C2: radio del crecimiento de *P. capsici* sin antagonista (control) y C1: radio del crecimiento de *P. capsici* con antagonista (tratamiento).

Cuadro 9. Tratamientos evaluados en confrontación dual.

Tratamiento	Aislamiento	Tratamiento	Aislamiento
G-1	Pe 45	G-15	Pe 31
G-2	Pe 36	G-16	Pe 46
G-3	Pe 40	G-17	Pe 09
G-4	Pe 44	G-18	Pe 03
G-5	Pe 08	G-19	Pe 10
G-6a	Pe 39	G-20	Pe 21
G-6b	Pe 04	G-21	Pe 41
G-7	Pe 01	G-22	Pe 33
G-8	Pe 19	G-23	Pe 47
G-9	Pe 28	G-24a	Pe 15
G-10	Pe 42	G-24b	Pe 14
G-11	Pe 12	G-25	Pe 43
G-12	Pe 22	G-26	Pe 24
G-13	Pe 26	G-27	Pe 23
G-14	Pe 32	G-28	Testigo

Para establecer el grado de antagonismo de las cepas de *Penicillium* sp. sobre la cepa de *P. capsici* se utilizó la escala de Agamez (2009) (Cuadro 10):

Cuadro 10. Escala del grado de antagonismo.

Escala	Descripción del antagonismo	Porcentaje (%)
1	El antagonista cubre la placa completa.	100
2	El antagonista cubre al menos 2/3 partes de la placa.	75
3	El antagonista cubre 1/2 de la placa.	50
4	El fitopatógeno cubre al menos 2/3 partes de la placa.	25
5	El fitopatógeno cubre la placa completa anulando al antagonista	0

3.9 Microcultivo técnica de Ridell o método de laminilla (Paul, 1999)

Para la técnica de microcultivo se necesitó una caja Petri que contenía PDA, a la cual con un bisturí se fraccionó en cuadros de 10 x 10 x 10 mm, cada uno de los fragmentos se colocó en el centro de un portaobjetos y sobre el fragmento un cubre objeto, todo esto dentro de una caja Petri que contenía una varilla de vidrio doblada en forma de “V” a la que se le agregó glicerol 10% para evitar que el fragmento de agar se deshidratara. El fragmento se inoculó en la parte sur por el antagonista *Penicillium* sp. con un día de ventaja ya que es de crecimiento lento. Al día siguiente se inoculó la cepa Phy-2 en la parte norte del fragmento.

Las cajas se incubaron a 25 °C por 8 días. Una vez que el crecimiento de micelio invadió el fragmento se retiró con cuidado el cubre objetos y se colocó en un nuevo porta el cual contenía una gota de colorante azul algodón, se quitó el exceso de colorante y se selló con barniz transparente.

Al porta objetos que contenía el fragmento de medio, se le retiró éste y en el lugar donde se encontraba el fragmento, se colocó una gota del colorante azul algodón y se colocó un nuevo cubre objetos y se selló de la misma manera. Los montajes se observaron en microscopio compuesto y se documentó el tipo de interacción o alteración de las estructuras de cada organismo evaluado.

3.10 Confrontación *In-vivo* del antagonismo en invernadero

Basados en los resultados del experimento de confrontación dual, se utilizaron las cepas de *Penicillium* sp. con el mejor porcentaje de inhibición conformando los tratamientos que se evaluaron en el experimento (Cuadro 11). Cada tratamiento contó con 10 repeticiones y cada repetición fue una planta, siendo la unidad experimental a evaluar. Para la realización del trabajo se utilizó la semilla de chile de la variedad Anaheim reportada como susceptible (Rico, 2002), la cual se sembró en una charola de germinación en invernadero. Cuando la plántula de chile tuvo dos hojas verdaderas se trasplantó a vasos de unicel del no. 10 con una mezcla de peat moss y vermiculita (1:1).

Cuadro 11. Tratamientos aplicados en confrontación in-vivo.

Tratamiento	Cepa
T1	Pe 42
T2	Pe 45
T3	Pe 12
T4	Pe 33
T5	Pe 32
T6	Pe 47
T7	Pe 40
T8	Pe 19
T9	Pe 01
T10	Sin antagonista
T11	Sin <i>P. capsici</i> y sin antagonista

El proceso de inoculación de hongos antagónico y fitopatógeno duro 3 días. Día 1: Previo al trasplante se aplicaron los tratamientos, que consistió primero en sumergir la raíz de las plantas en una suspensión de conidios de los microorganismos antagonistas con una concentración de 5×10^7 mL (Fang y Tsao, 1995) por 5 minutos, para después realizar el trasplante. Se dejó que las esporas de las cepas de *Penicillium* sp. germinaran y se establecieran en la rizosfera. Día 2: Se realizo una re-inoculación de 5 mL a la misma concentración en la base del tallo. Día 3: Se inoculo *P. capsici* (cepa Phy-2), la inoculación fue dirigida a la base de la planta, se vaciaron 5 mL del de la suspensión de zoosporas con una concentración de 2,000 zoosporas/mL (Bosland y Lindsey, 1991), logrando una concentración final de 10,000 zoosporas/mL (Figura 13). El experimento fue un diseño completamente al azar.

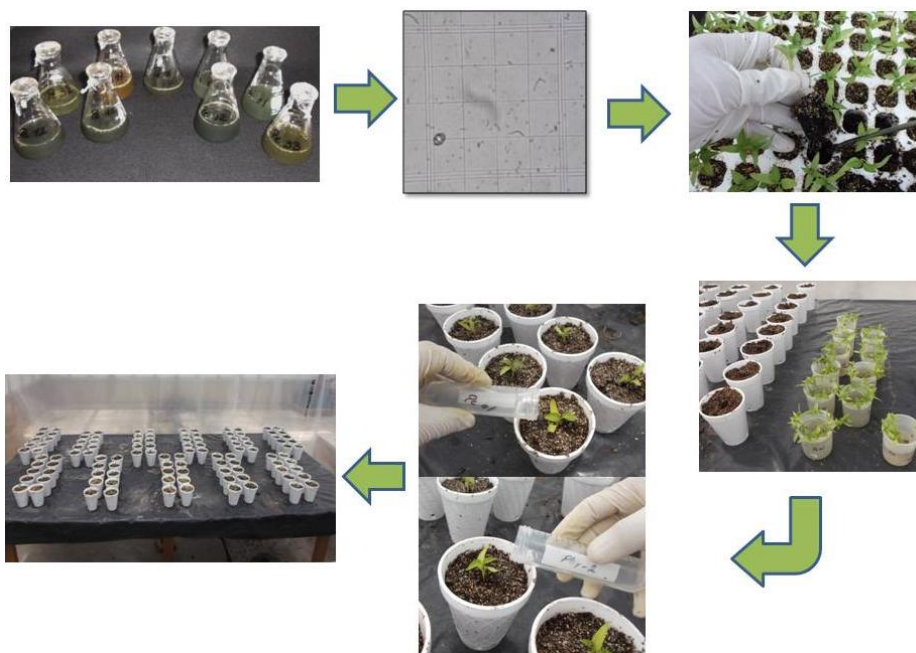


Figura 13. Proceso de inoculación de organismos antagónicos y fitopatógenos.

Se registró la incidencia y la severidad; para la Incidencia de la Enfermedad (IE) se aplicó la formula (Wolcan *et al.*, 2001):

$$IE (\%) = \frac{\text{Nº de plantas enfermas}}{\text{Nº total de plantas}} \times 100$$

Para la evaluación de la severidad se utilizó la escala de daño modificada de (Bosland y Lindsey, 1991).

3.11 Análisis Estadístico de los experimentos

La información obtenida de cada uno de los experimentos se analizaron usando el programa SAS (Statistical Analyses Systems, version 8) y se realizó comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). Las variables estudiadas fueron: Severidad de la enfermedad (%), inhibición y antagonismo (%).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de microorganismos

Mediante las técnicas de aislamiento utilizadas en este trabajo se obtuvieron 54 cepas (Figura 14 y 15) de las cuales 47 son de *Penicillium* sp. y 7 son de *Phytophthora capsici* (Cuadro 12 y 13). Los aislamientos obtenidos de acuerdo a su origen expresado en porcentaje son los siguientes: tejido vegetal 42.6%, suelo 43.6% y ambiental 11.1%.

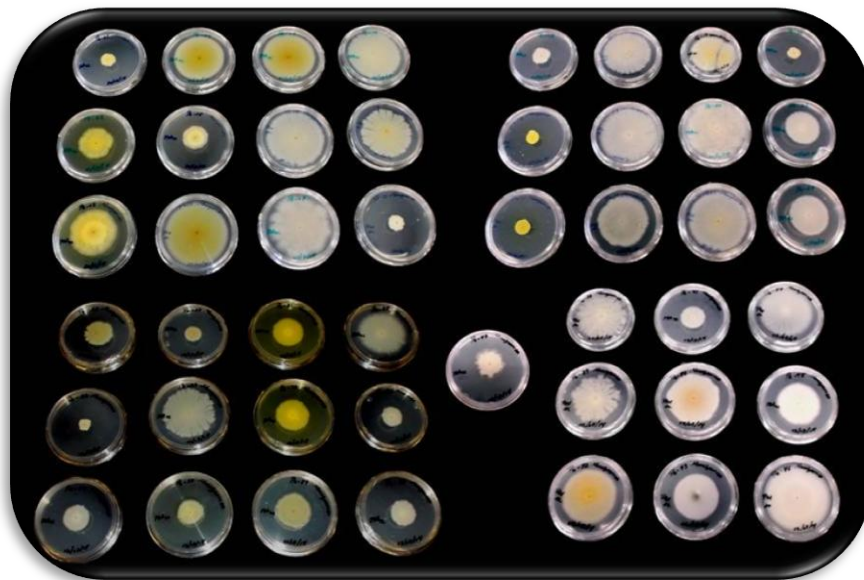


Figura 14. Colonias de *Penicillium* sp. mostrando coloraciones diversas.

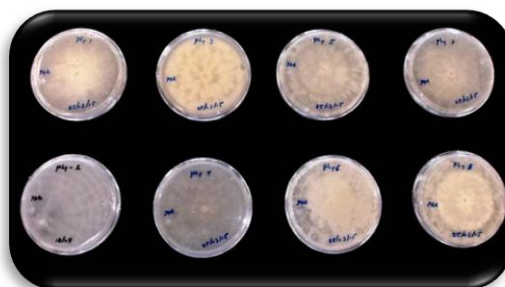


Figura 15. Cepas de *Phytophthora capsici* aisladas.

Cuadro 12. Aislamientos de *Penicillium* sp.

Clave	Lugar de origen	Origen	Clave	Lugar de origen	Origen
Pe01	Laboratorio de Fitopatología, Celaya, Gto.	Ambiente (laboratorio)	Pe25	Rancho Aguilares T-1 San Francisco 10 ⁻⁴	Suelo
Pe02	Laboratorio de Fitopatología, Celaya, Gto.	papa	Pe26	San Martin de las pirámides, Edo de México	suelo (nopal)
Pe03	Laboratorio de Fitopatología, Celaya, Gto.	papa	Pe27	San Martin de las pirámides, Edo de México	suelo (nopal)
Pe04	Ezequiel Montés, Querétaro.	Ajo	Pe28	Nopaltepec, Edo de México	suelo (nopal)
Pe05	Laboratorio de Fitopatología, 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, México, D.F.	Naranja	Pe33	Rancho Canta Ranas, Abasolo Gto. L-2 10 ⁻³	Suelo (jitomate)
P10	Cuautlalpan, Texcoco, Edo de México.	Mandarina	Pe34	Rancho Aguilares T-1 San Francisco 10 ⁻⁴	Suelo
Pe11	Cuautlalpan, Texcoco, Edo de México.	Jitomate	Pe35	Rancho el Palomar 10 ⁻⁵	Suelo (jitomate)
Pe12	Mich-1 Lab. de Fitopatología, Celaya, Gto.	Chile poblano	Pe36	INIFAP 10 ⁻³	Suelo (granada)
Pe13	Mich-2 Lab. de Fitopatología, Celaya, Gto.	Chile poblano	Pe37	INIFAP - 10 ⁻³	Suelo (forestales nativas)
Pe14	Lab. postgrado I (Depto. Parasitología)	Ambiente (laboratorio)	Pe38	Texcoco, Edo de México	limón
Pe15	Lab. de Micología Agrícola (Depto. Parasitología)	Ambiente (laboratorio)	Pe39	Texcoco, Edo de México	limón
Pe16	Lab. de Usos Múltiples (Depto. Fitotecnia)-1	Ambiente (laboratorio)	Pe40	San Martin de las pirámides SMP1P4	Suelo (nopal)
Pe17	Col. Issste, Texcoco, Edo de México.	Manzana	Pe41	Rancho Aguilares T-1 San Francisco 10 ⁻⁵	Suelo
Pe18	Col. Issste, Texcoco, Edo de México.	Guayaba	Pe42	Rancho 4ta Brigada, Irapuato, Gto. 10 ⁻⁴	Suelo (chile)
Pe19	Col. Issste, Texcoco, Edo de México	Cebolla	Pe43	Rancho los Leones, Abasolo, Gto. 10 ⁻⁴	Suelo (chile)
Pe20	San Luis Huexotla, Texcoco, Edo de México	Sidra	Pe44	Rancho el Paloma	Suelo (jitomate)
Pe21	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	Chile (raíz)	Pe45	INIFAP	Suelo
Pe22	Lab. de Usos Múltiples (Depto. Fitotecnia)-2	Ambiente (laboratorio)	Pe46	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato 10 ⁻⁴	Suelo (chile)
Pe23	INIFAP 10 ⁻³	Suelo (chile)	Pe47	Aguilares T-1 SF 10 ⁻⁴	Suelo

Cuadro 13. Aislamientos de *Phytophthora capsici*.

	Lugar de origen	Aislamiento
PC-1	C7P8F7 proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología (INIFAP) (CEBAJ).	Planta de chile
PC-2	Dolores Hidalgo, Guanajuato. Laboratorio de Fitopatología (INIFAP) (CEBAJ).	Planta de chile
PC-3	Juventino Rosas, Guanajuato.	Planta de jitomate
PC-4	San José Iturbide, Guanajuato.	Planta de jitomate cherry
PC-5	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato.	Planta de chile
PC-6	Rancho Canta Ranas, Abasolo, Guanajuato.	Planta de jitomate
PC-7	Rancho el Palomar, Abasolo, Guanajuato. (trampa cebo chile serrano)	Suelo (jitomate)
PC-8	Rancho los Leones, Abasolo, Guanajuato. (trampa cebo chile serrano)	Suelo (chile)

4.2 Identificación morfológica

Las cepas de *Penicillium* sp. se identificaron mediante las claves taxonómicas Barnett y Hunter (1972), confirmando el género (Figura 16). Las colonias al madurar se cubren con esporas, tomando diferentes colores que va del verde, verde aceituna hasta el gris), con aspecto aterciopelada, ligeramente algodonosa.

Las cepas aisladas de chile, jitomate y suelo, se compararon con Erwin y Ribeiro (1996) las estructuras encontradas, lo que indicando que las cepas pertenecen al género *Phytophthora* y corresponde a la especie *Phytophthora capsici*. Las cepas de *Phytophthora capsici* produjeron esporangios (Figura 17) con una papila bien definida pero en ocasiones puede ser semipapilado, la

posición de la papila puede variar, estar desviada y frecuentemente con dos papilas.

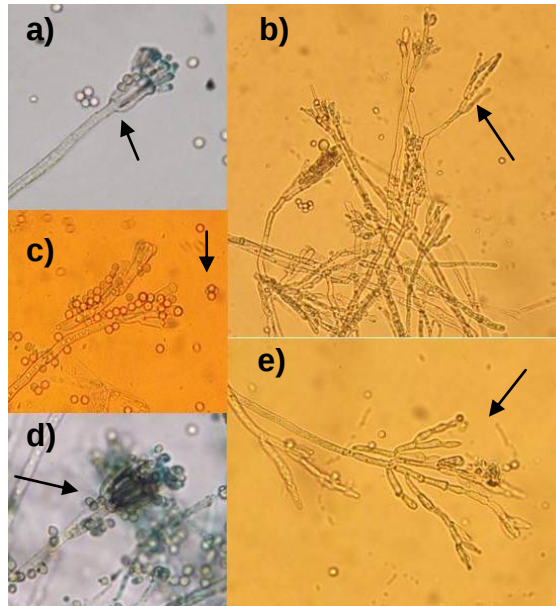


Figura 16. Estructuras típicas de *Penicillium* sp. a), b), d) y e) diferentes tipos de conidióforos y c) conidios esféricos.

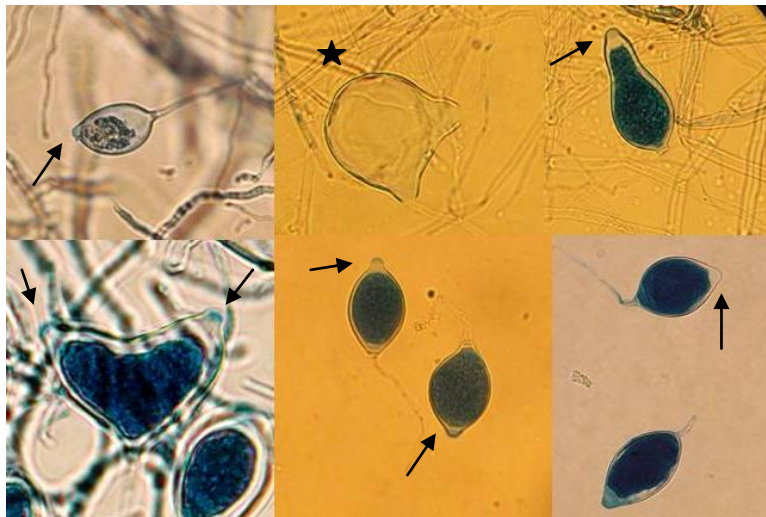


Figura 17. Esporangios presentes en las cepas de *Phytophthora capsici*. La flecha indica la papila de los esporangios. La estrella indica esporangio sin papilas.

4.3 Técnicas moleculares

4.3.1 Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA extraído de las cepas de *Penicillium* sp y *Phytophthora capsici* en el nanodrop mostró para cada una de las muestras una concentración dentro del rango de 100 a 800 ng/μL; al mismo tiempo se obtuvo la absorbancia ajustada (λ 260 nm) del espectro de luz indicando valores dentro del rango de 1.8 a 2 (Figuras 18).

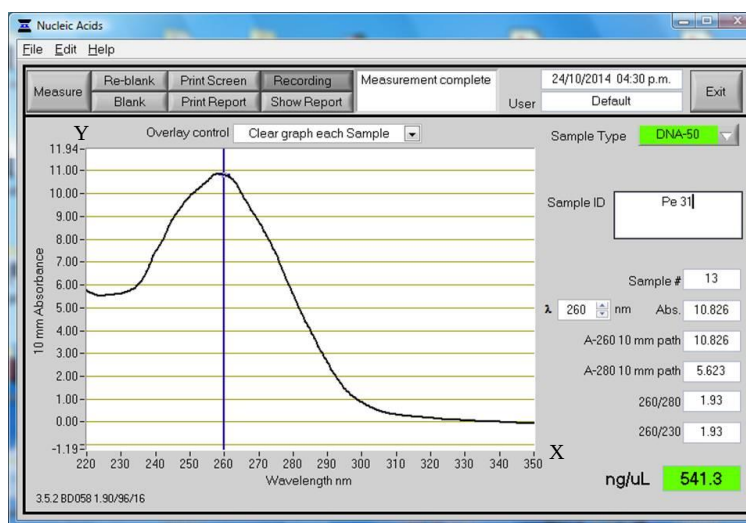


Figura 18. Resultado de la cuantificación del DNA de una muestra de *Penicillium* sp. El eje X es la longitud de onda y eje Y es la Absorbencia.

4.3.2 Amplificación región ITS con PCR

La región ITS amplificada con los primers 5 HP y NL 4 para *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici* fue de aproximadamente 1300 pb y 1500 pb respectivamente. En la Figura 19 se muestra la migración de los fragmentos

amplificados de la región ITS de *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici*., donde se puede apreciar la diferencia entre organismos. Cabe mencionar que las amplificaciones de las cepas de *Penicillium* sp. presentaron uniformidad al igual que las amplificaciones de las cepas de *Phytophthora capsici* indicado con una flecha los fragmentos producidos por cada uno de los microorganismos. Lo anterior nos definió que son diferentes géneros.

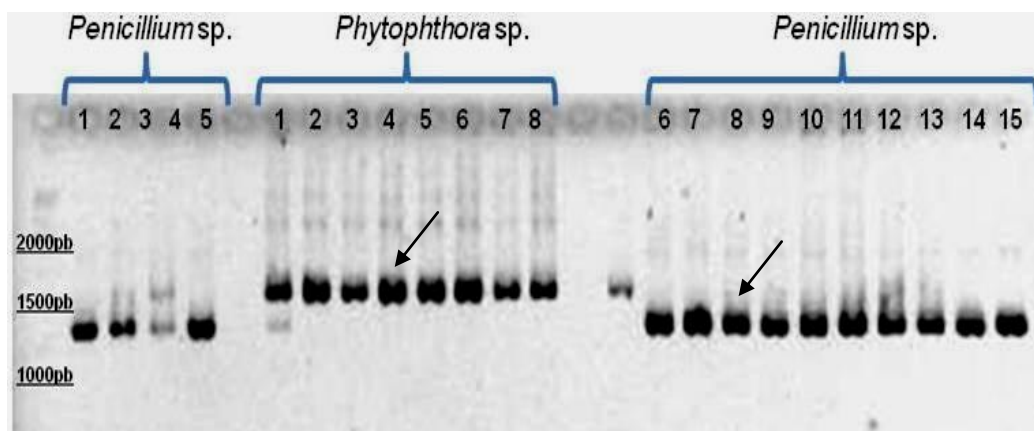


Figura 19. Ejemplificación de las amplificación de la región ITS de *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici* en gel de agarosa 2%.

En las cepas Pe10, Pe14, Pe15, Pe16, Pe21, Pe23, Pe24, Pe37, Pe43 y Pe46, no fue posible amplificar la región ITS bajo las condiciones en las que se realizó el trabajo, por lo tanto no fue posible hacerles RFLPs e ISSR.

4.3.3 RFLPs

Las enzimas de restricción *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I produjeron patrones al realizar cortes específicos en la región ITS amplificada de los microorganismos (*Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici*); fue posible apreciar algunos

polimorfismos en las placas, produciendo diferentes perfiles, los cuales fueron separados y visualizados en geles de poliacrilamida 6%.

En la Figura 20 se puede apreciar las bandas producidas por las enzimas *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III, nótese la similitud de los patrones producidos por cada enzima, los cuales están indicados por las flechas y los recuadros. Esto indicó que las cepas de *Phytophthora* sp. aisladas son aparentemente la misma especie.

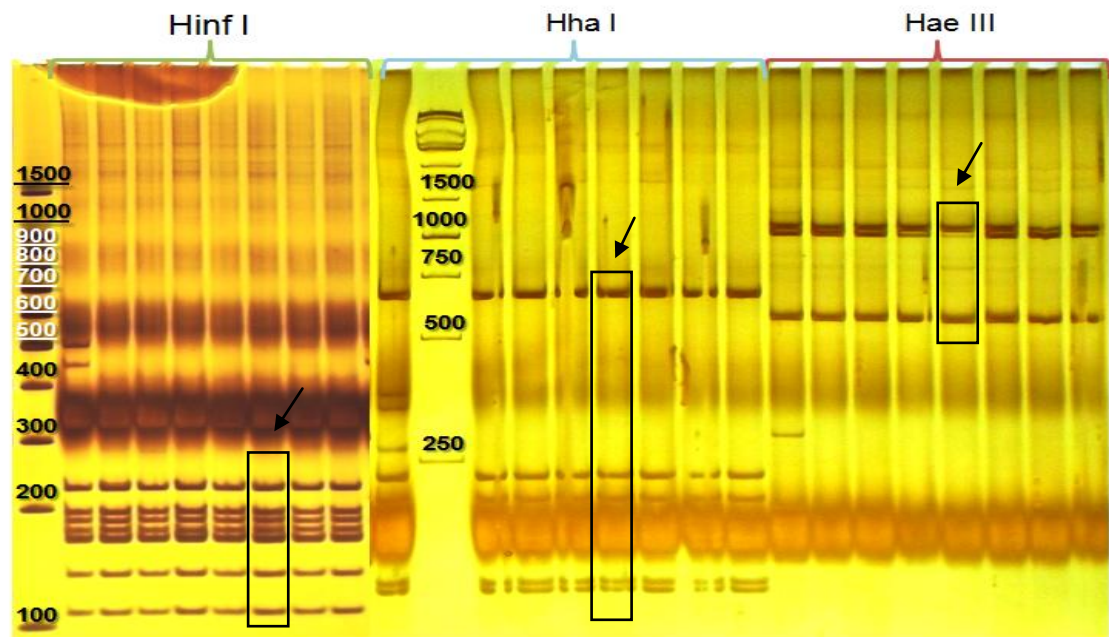


Figura 20. Gel de acrilamida 6% con los cortes producidos por las tres enzimas de la región ITS de *Phytophthora capsici*.

En la Figura 21 y 22 se puede observar las bandas generados por la enzima *Hae* III, *Hha* I y *Hinf* I para las cepas de *Penicillium* sp. donde se destacan los polimorfismos remarcados en cada uno de los recuadros e indicados por una

flecha. Estas diferencias observadas nos indican que hay especies diferentes de *Penicillium* sp.

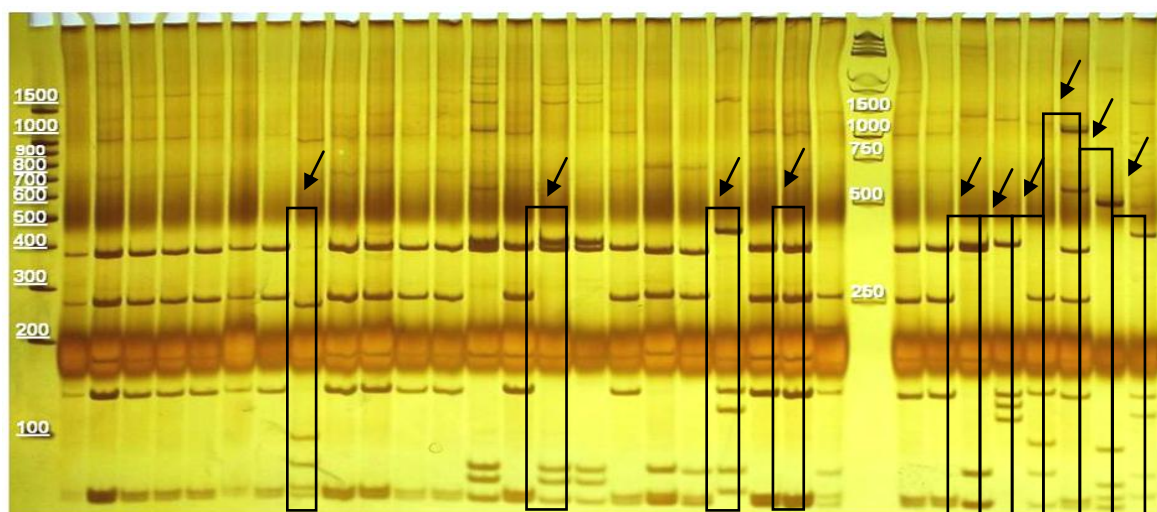


Figura 21. Ejemplificación de los patrones producidos por la enzima *Hae* III de la región ITS de *Penicillium* sp., los recuadros señalados por flechas muestran los polimorfismos que se generaron.

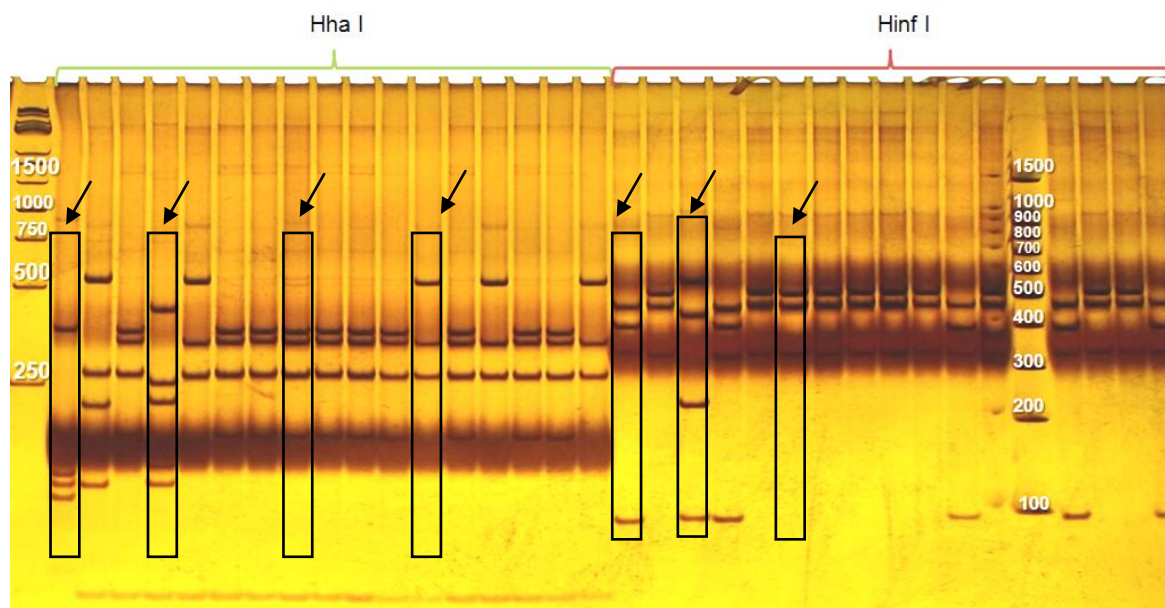


Figura 22. Ejemplificación de los Patrones producidos las enzimas *Hha* I y *Hinf* I de la región ITS de *Penicillium* sp., los recuadros señalados por flechas muestran los polimorfismos que se generaron.

A partir del análisis de los cortes realizados por las enzimas *Hha* I, *Hinf* I y *Hae* III, se generaron varios dendogramas (Figuras 23, 24 y 25), cada enzima mostro agrupamientos diferentes (separando o uniendo las distintas cepas de *Penicillium* sp.), además se puede observar un claro distanciamiento genético entre las cepas de los géneros *Penicillium* sp. y *Phytophthora* sp.

Los grupos generados por las tres la enzima para las cepas de *Penicillium* sp. fueron: La enzima *Hha* I genero 12 agrupaciones, la enzima *Hinf* I formo 7 grupos y la enzima *Hae* III genero 15 agrupamientos; cabe mencionar que cada enzima agrupo de manera distinta a las cepas de *Penicillium* sp. Al conjuntar los datos de las tres enzimas se origino un dendograma compuesto (Figura 26), el cual formo 18 agrupamientos para las cepas de *Penicillium* sp., por lo tanto dentro de las cepas aisladas de *Penicillium* sp. hay especies diferentes. Apoyados en lo anterior y al distanciamiento genético observado se definieron las cepas a evaluar en el experimento de confrontación dual entre las cepas de *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici*.

Al localizar a las cepas con mejor porcentaje de inhibición se observó que no estaban agrupadas dentro de un grupo, estaban distribuidas en el dendograma sin una agrupación definida.

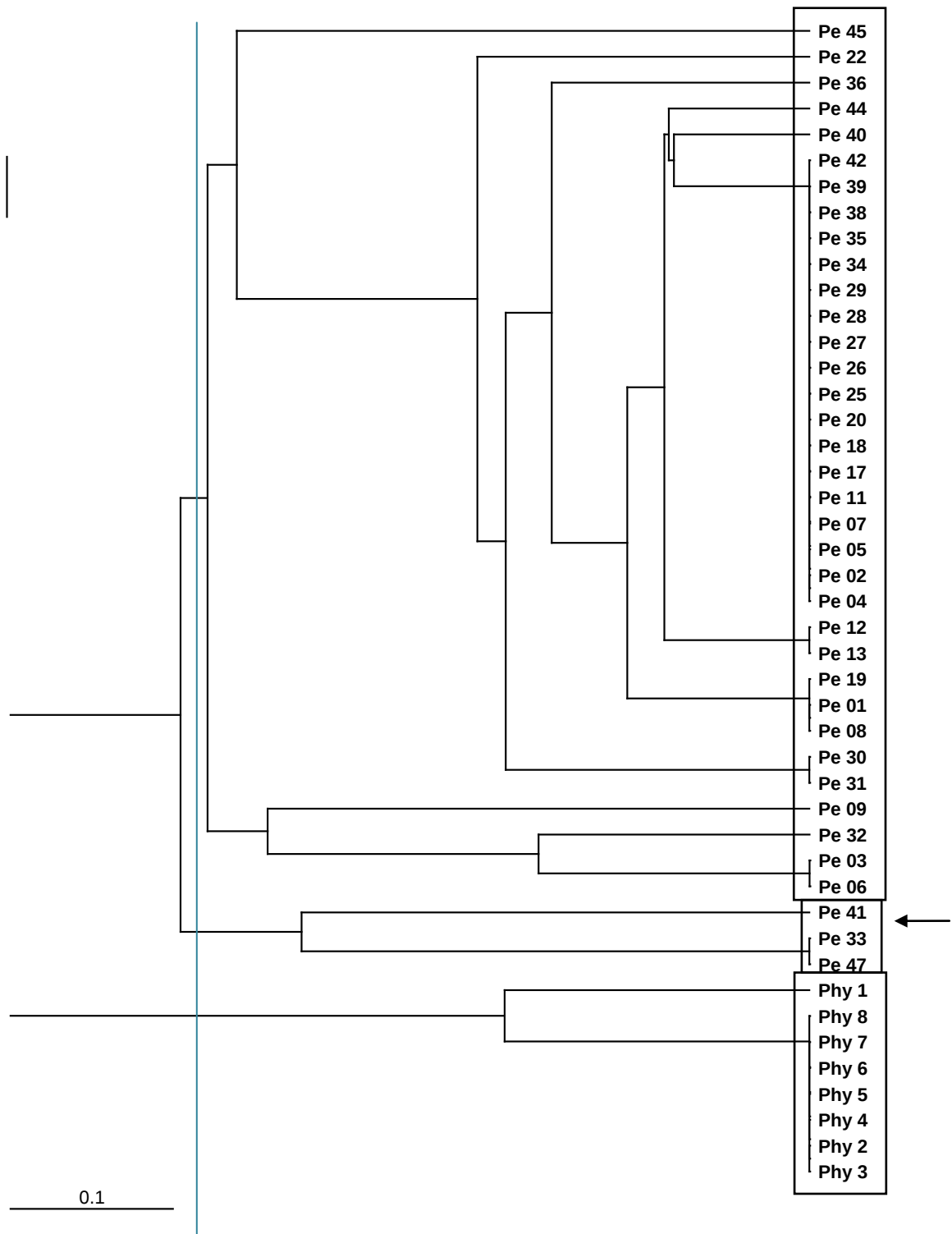


Figura 23. Dendrograma originado por la enzima *Hha* I, mostrando 3 grandes grupos enmarcados por los recuadros, donde están bien definidos el género *Penicillium* sp. y *Phytophthora* sp., además la flecha señala a las 3 cepas que aparentemente en otro grupo con cercanía genética a *Penicillium* sp..

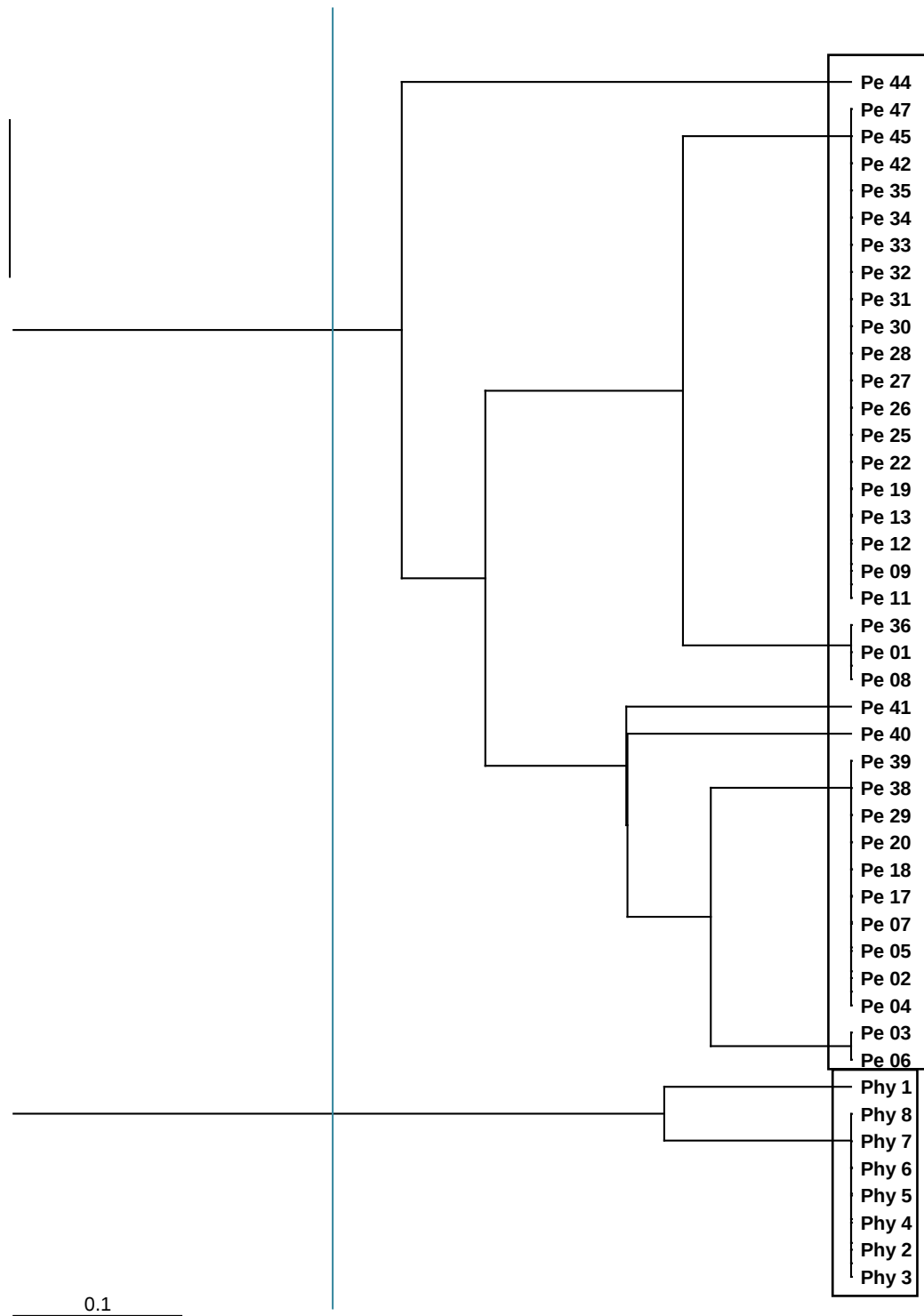


Figura 24. Dendrograma originado por la enzima *Hinf* I mostrando solo 2 grandes grupos enmarcados por los recuadros, definiendo al género *Penicillium* sp. y *Phytophthora* sp.

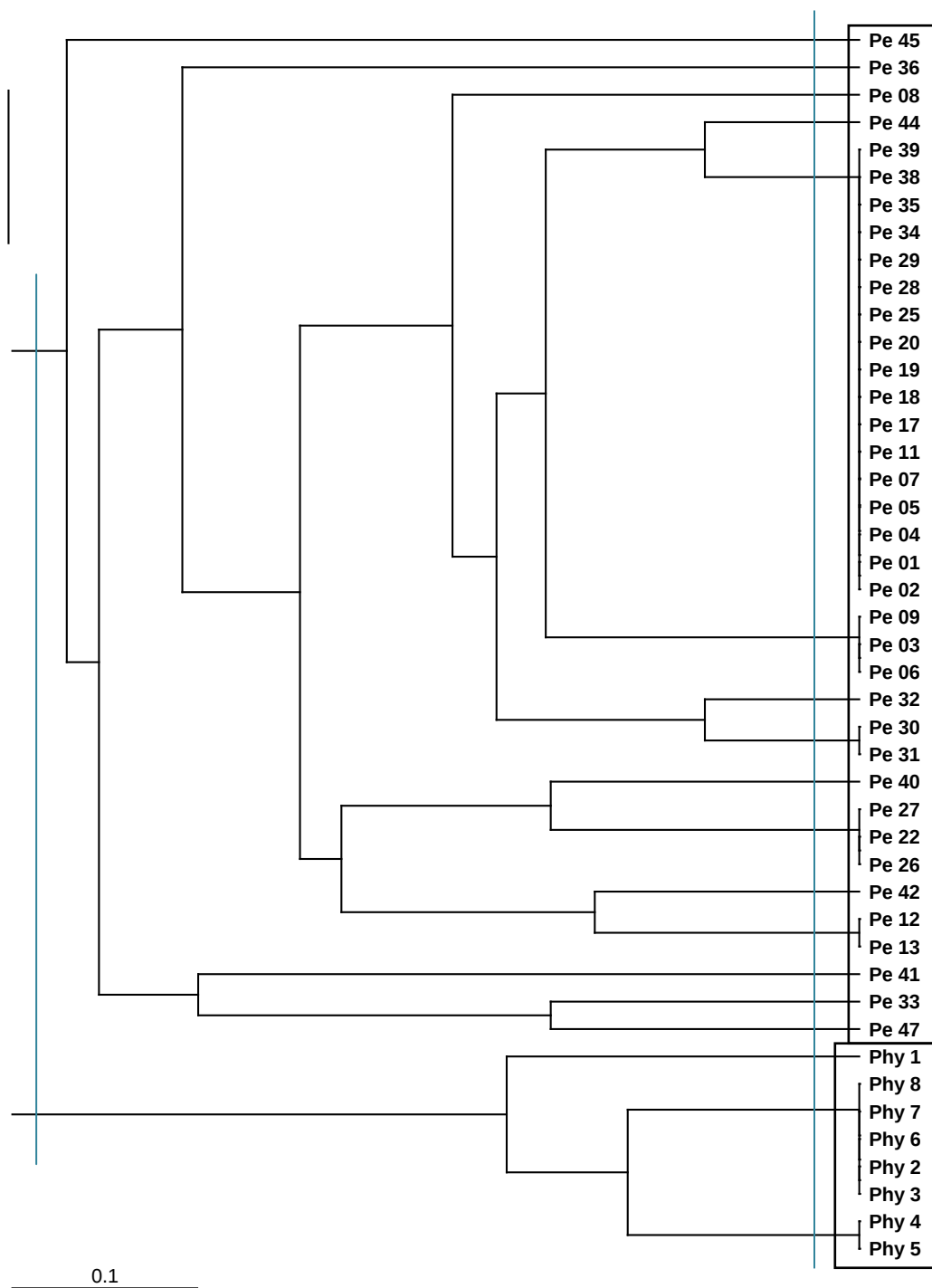


Figura 25. Dendrograma originado por la enzima *Hae* III mostrando 2 grupos enmarcados por los recuadros, donde se diferencia con claridad los géneros *Penicillium* sp. y *Phytophthora* sp.

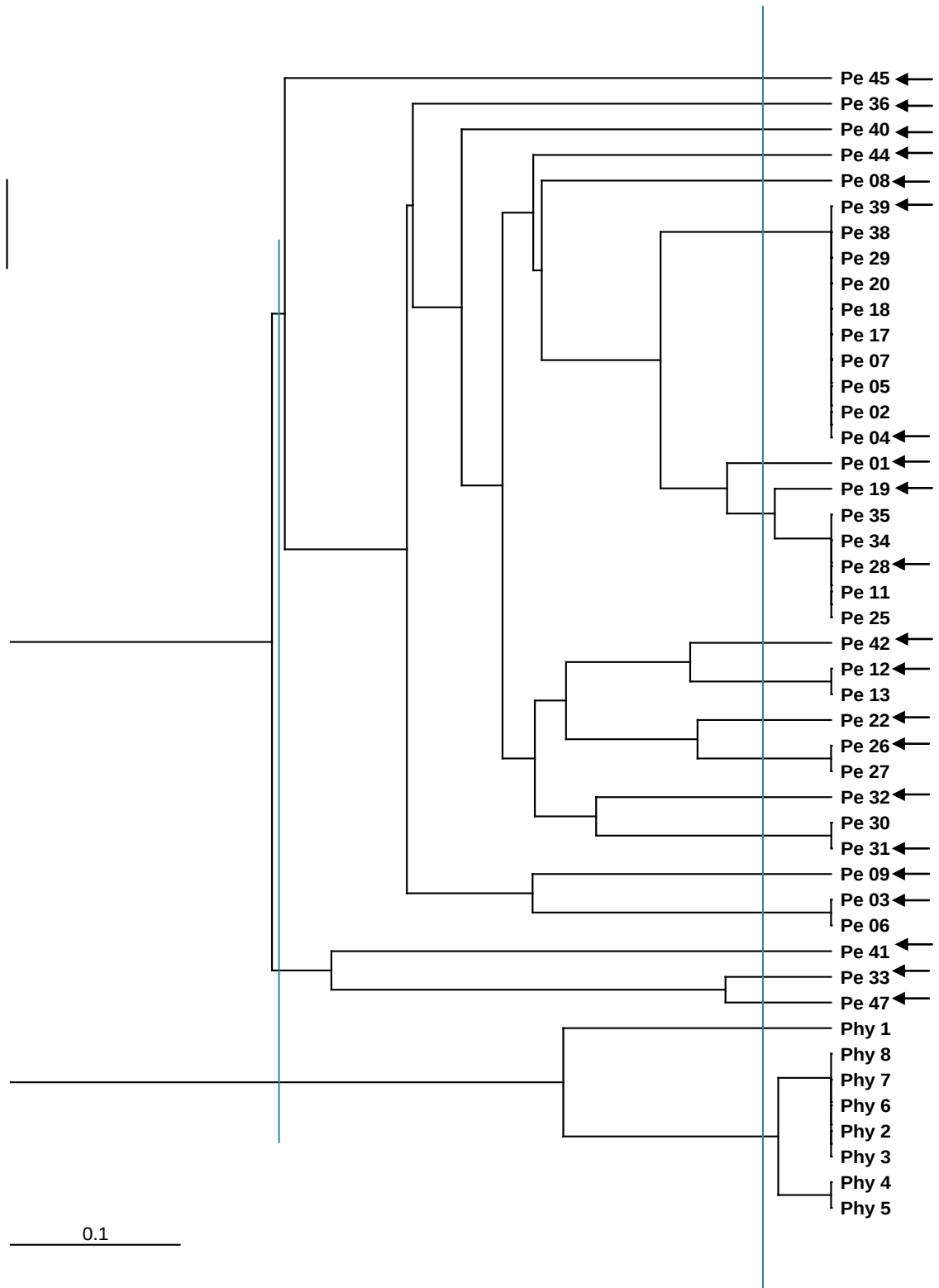


Figura 26. Dendrograma formado por la conjunción de los datos de las enzimas de restricción *Hha* I, *Hinf* I y *Hae* III. Las flechas señalan la posición de las cepas en el dendrograma, dada la distancia genética se consideraron diferentes y fueron seleccionadas para el experimento de confrontación dual.

4.3.4 ISSR

En las Figuras 26 y 27 se presentan los perfiles que produjeron los primers (AC)8YG y (GGAT)₄ para las cepas de *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici* al ser separados en geles de poliacrilamida 6%. Las bandas generadas producen una diversidad de patrones, lo que indica una variedad de polimorfismos que puede estar presente dentro de individuos de una misma especie. En las Figuras 32, 33 y 34 se muestran los dendogramas generados con la técnica de ISSR para *Penicillium* sp.

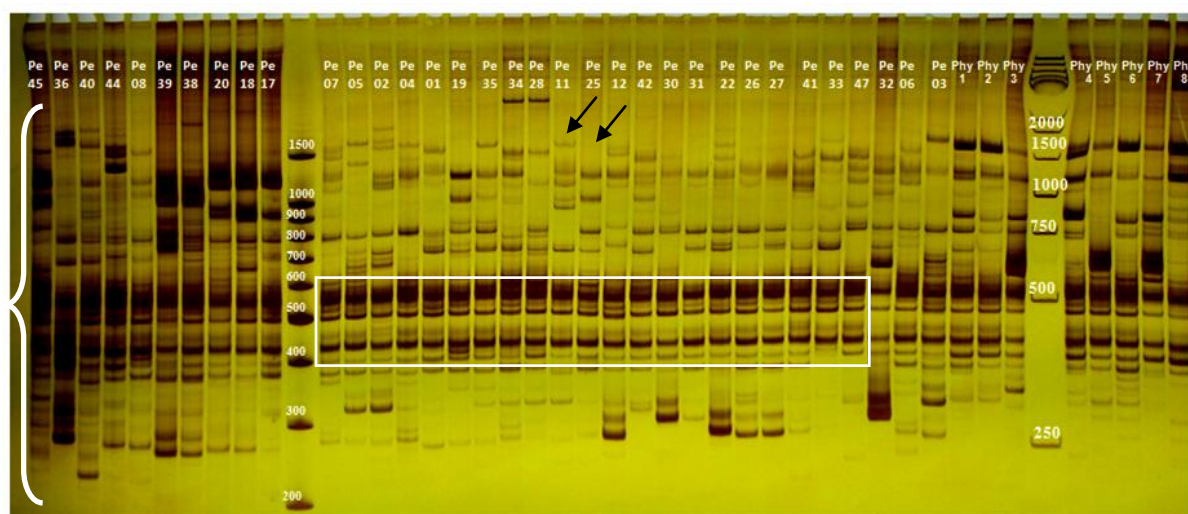


Figura 27. Gel de poliacrilamida al 6% con los patrones generados por el primer (AC)8YG, se consideraron las bandas de 240 pb hasta 2000 pb. En el recuadro se puede apreciar perfiles semejantes lo cual indica una cercanía entre las cepas de *Penicillium* sp. pero al analizar las bandas fuera del recuadro nos muestra polimorfismos lo cual marca distancia genética. Las flechas muestran presencia o ausencia de bandas.

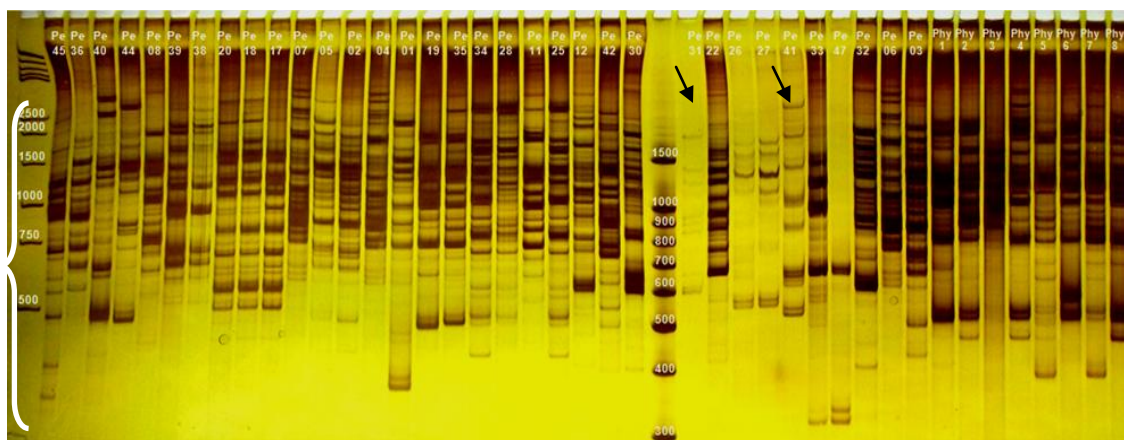


Figura 28. Gel de poliacrilamida al 6% con los patrones generados por el primer (GGAT)₄, se consideraron las bandas de 320 pb hasta 2500 pb. Se puede apreciar una gran cantidad de información generada, expresada en el número de bandas que genero para cada cepa. Observando una gran cantidad de polimorfismos. Las flechas muestran presencia o ausencia de bandas.

En la Figura 29, 30 y 31 se presentan los dendogramas para las cepas de *Phytophthora capsici*.

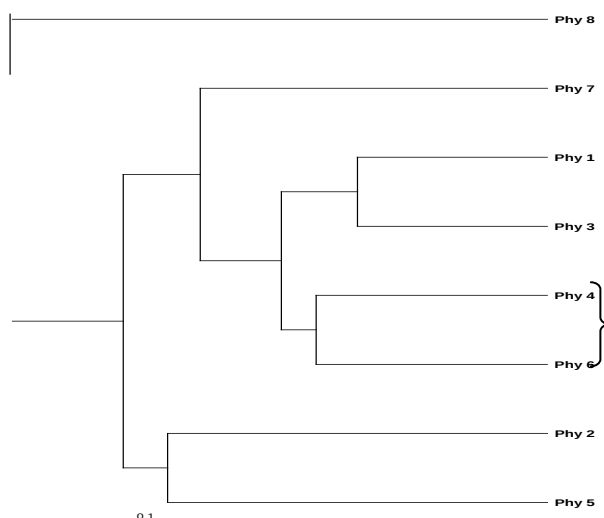


Figura 29. Dendograma generado con el primer (AC)8YG para las cepas de *Phytophthora capsici*. Se puede observar que no hay una relación entre el

hospedero de donde se aisló y la cepa, como por ejemplo la cepa Phy-4 aislada de jitomate y Phy-5 aislada de chile, pero comparten una cercanía genética.

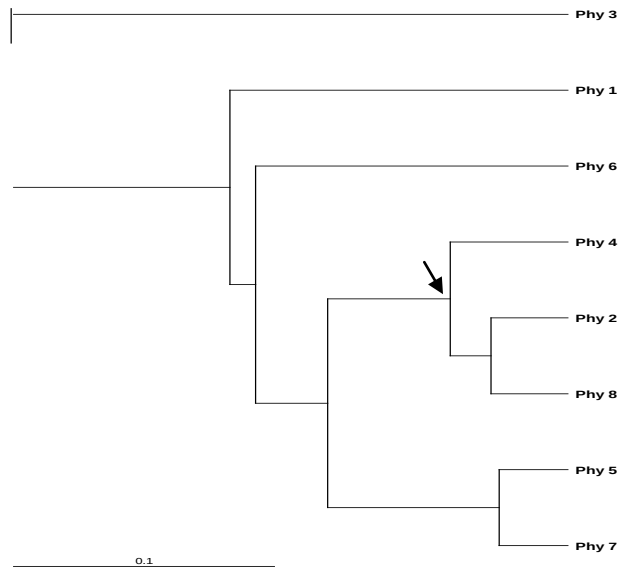


Figura 30. Dendrograma generado con el primer (GGAT)₄ para las cepas *Phytophthora capsici*. Al generar mayor información (numero de bandas) hay mayor diversidad dentro de la misma especie. La flecha indica uno de los nodos generados, de donde se puede observar un mayor número de nodos, marcando distancia entre la misma especie a comparación del primer.

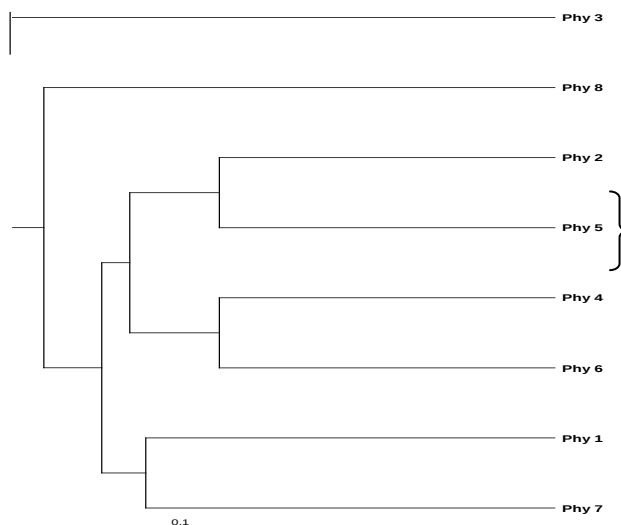


Figura 31. Dendrograma generado por los primers (AC)8YG y (GGAT)₄ para las cepas de *Phytophthora capsici*. La información contenida en el DNA y al ser amplificada por ambos primers mostró que hay variabilidad dentro de la especie

y por lo tanto influir en la agresividad de la cepa, pero no se vio reflejado en la conformación ya que no se puede concluir que cada grupo tiene una característica morfológica atribuible.

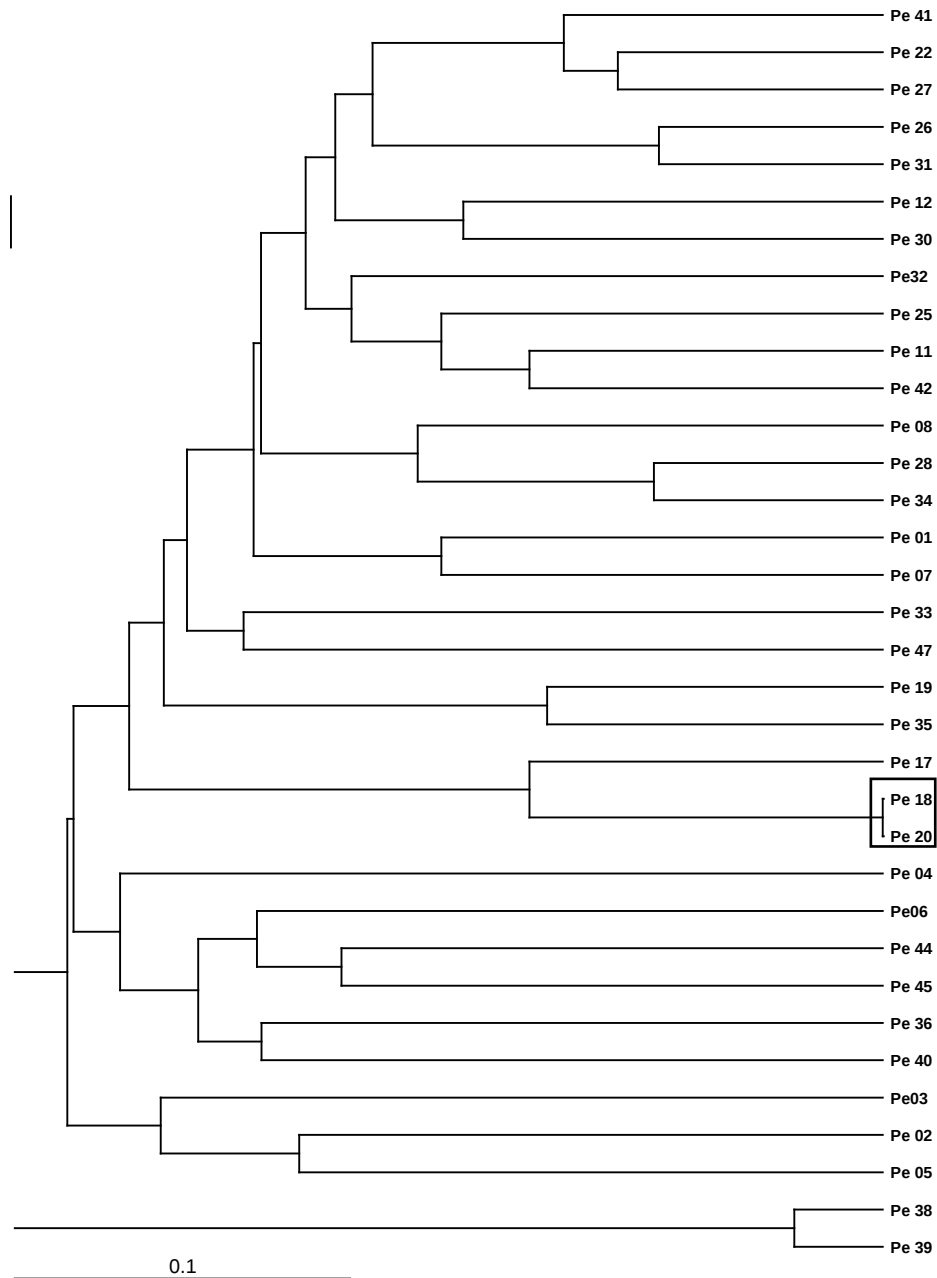


Figura 32. Dendrograma generado con el primer (AC)8YG para las cepas de *Penicillium* sp. Las muestras se agruparon según la semejanza relacionada con el peso molecular de los fragmentos amplificados. En el recuadro se puede

observar semejanza en las cepas Pe 18 y Pe 20 indicando que son posiblemente el mismo organismo.

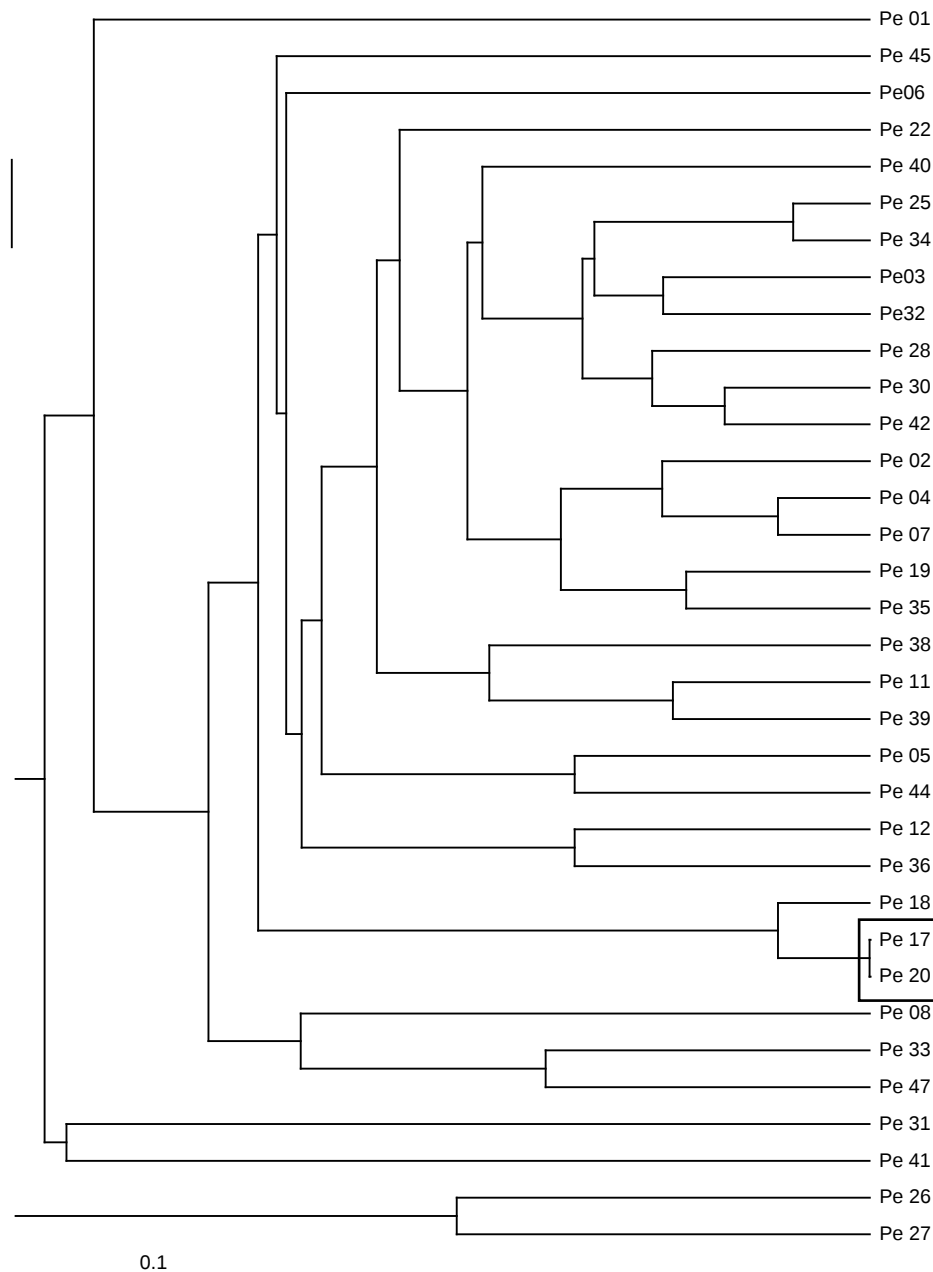


Figura 33. Dendrograma generado con el Primer (GGAT)₄ para las cepas de *Penicillium* sp. Las muestras se agruparon según la semejanza relacionada con el peso molecular de los fragmentos amplificados. En el recuadro se puede observar semejanza ahora entre las cepas Pe 17 y Pe 20. Por lo tanto todas las

demás cepas son variantes o cepas con un marcado polimorfismos respecto a sus iguales.

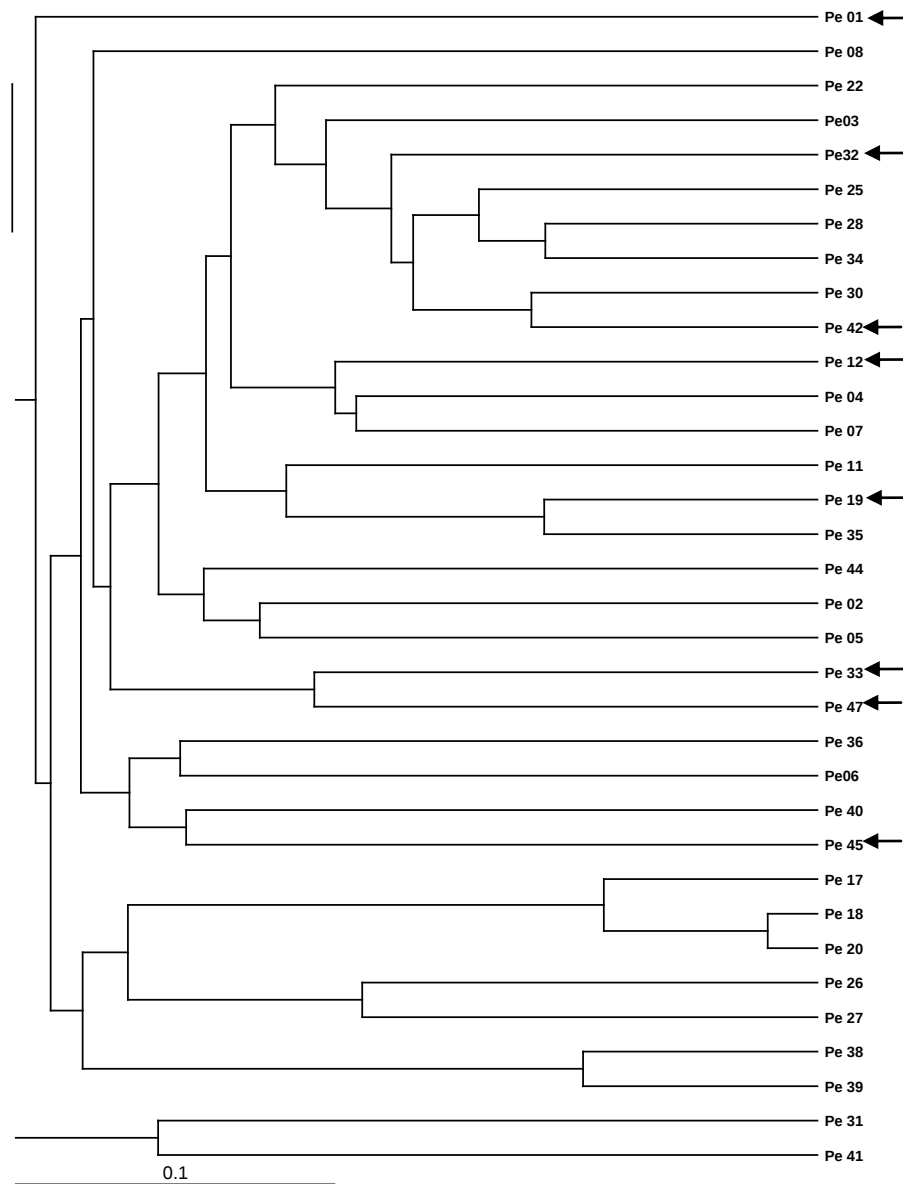


Figura 34. Dendrograma generado con los Primer (AC)8YG y (GGAT)₄ para las cepas de *Penicillium* sp. donde se aprecia que son cepas diferentes o variantes por no presentar coincidencias. Las flechas indican las cepas con mejor antagonismo, pero están distribuidas en el dendrograma pero no agrupadas bajo esta característica.

4.4 Caracterización de cepas de *Phytophthora capsici*

4.4.1 Caracterización en medio de cultivo

Las cepas de *Phytophthora capsici* tuvieron diferentes velocidades de crecimiento dependiendo el medio de cultivo en el que se encontraban. En el Cuadro 14 se muestran la velocidad de crecimiento expresado en centímetros por día (cm/día) de las cepas en los medio de cultivo PDA y V8.

Cuadro 14. Velocidad de crecimiento (cm/día) en los medios PDA y V8.

Cepa	PDA	V8
Phy-1	0.94	1.21
Phy-2	1.06	2.125
Phy-3	1.06	1.41
Phy-4	0.77	0.94
Phy-5	0.77	1.41
Phy-6	1.06	1.21
Phy-7	0.77	1.41
Phy-8	0.94	1.21

En el medio de cultivo PDA las cepas de *Phytophthora capsici* llenaron la caja de Petri entre 8 y 10 días (Figura 35). Es importante destacar a la cepa Phy-2 como la cepa con mayor velocidad de crecimiento en medio V8, llenando la caja en 4 días (Figura 36).

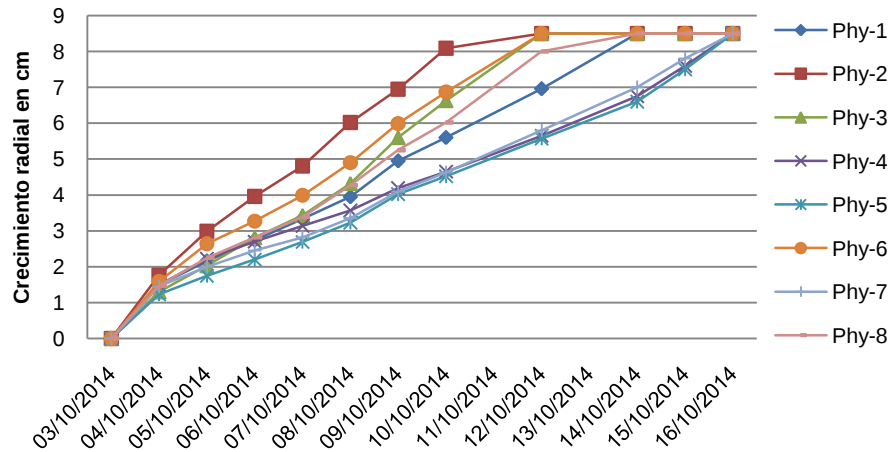


Figura 35. Crecimiento radial de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo PDA.

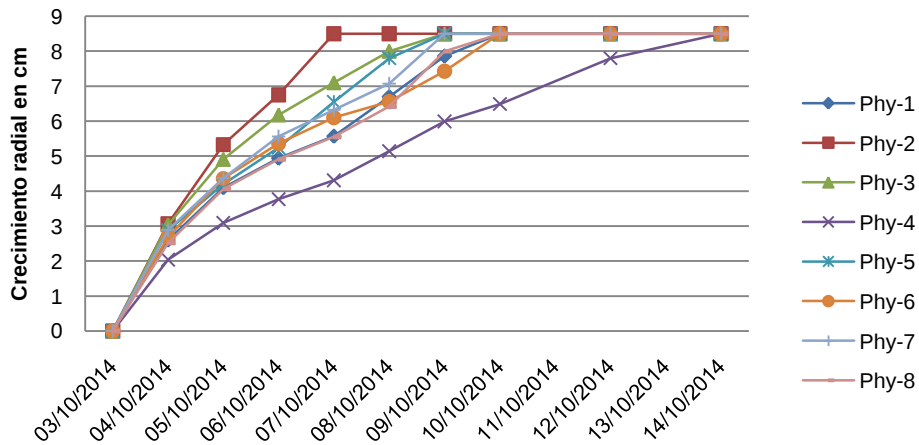


Figura 36. Crecimiento radial de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo V8.

4.4.2 Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Incidencia: En la Figura 37 se puede apreciar el número de plantas que fueron afectadas durante el desarrollo del experimento. Se destacan las cepas de *Phytophthora capsici* (Phy-2 y Phy-3), ya que al transcurrir el quinto día se

apreciaron síntomas en todas las plantas de chile de sus respectivos tratamientos, esto representó el 100% de incidencia.

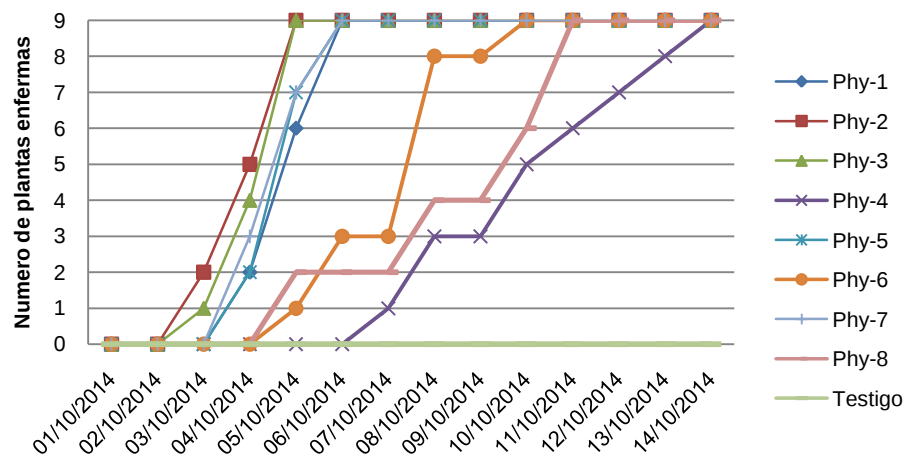


Figura 37. Incidencia de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile.

Los datos de incidencia al aplicarles la formula de Wolcan *et al.*, 2001 son transformados en porcentaje de Incidencia de la Enfermedad (IE %) (Figura 38). Conforme pasan los días el porcentaje de incidencia aumenta. Todas las cepas lograron el 100 % de incidencia lo que vario fue el tiempo en que lo alcanzaron, observándose que las cepas más agresivas a los 5 o 6 días respectivamente llegaron al 100 %, mientras las menos agresivas tardaron 10, 11 y 14 días para presentar el 100 % de incidencia.

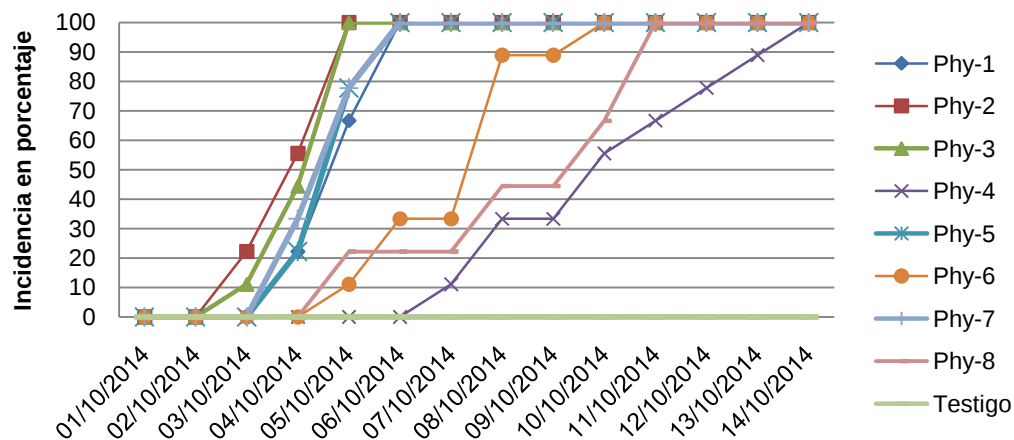


Figura 38. Incidencia de la Enfermedad causada por *Phytophthora capsici* expresado en porcentaje.

Severidad: Al estar colocadas las plantas en agua fue posible apreciar los síntomas y el avance de la enfermedad, por lo cual se realizaron dos evaluaciones la primera a los 6 días y la segunda a los 12 días, esto después del inicio del experimento (Figura 39).



Figura 39. Prueba de patogenicidad *in vitro*. a) Inicio del experimento, b) Término del experimento.

Evaluación del día 6: El análisis de varianza mostro que la fuente de variación se encontró en los tratamientos (cepas de *P. capsici*) con una $R^2 = 0.8366$, un coeficiente de variación de 34.36 y $\alpha = 0.05$. Lo anterior se refiere al grado de severidad o daño ocasionado por cada tratamiento a las plantas de chile, definiendo a la cepa más agresiva, al observar la aparición de síntomas en menos tiempo (A.3 Cuadro 24).

El resultado de la comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) mostró dos agrupaciones, donde se define a las cepas agresivas y las cepas no agresivas (Cuadro 15). Dentro de las cepas agresivas se encuentran las cepas Phy-2, Phy-7, Phy-5, Phy-1 y Phy-3, las cuatro primeras cepas son aislamientos de chile y la ultima de jitomate; la cepa Phy-2 sobresale por el porcentaje de daño ocasionado, alcanzando el 91.6% en 6 días. Las cepas menos agresivas son Phy-6, Phy-8 y Phy-4, de las cuales la cepa Phy-6 y Phy-4 son aislamientos de jitomate y la cepa Phy-8 fue aislada de suelo de la rizosfera de chile.

Cuadro 15. Comparación de medias de la evaluación del día 6.

Tratamiento	Media	Agrupación Tukey*
Phy-2	91.6	A
Phy-7	86.1	A
Phy-5	80.5	A
Phy-1	75.0	A
Phy-3	72.2	A
Phy-6	20.5	B
Phy-8	11.6	B
Phy-4	6.6	B
Testigo	0.0	C

*Tratamientos con la misma letra son significativamente iguales.

Segunda evaluación día 12: El análisis de varianza mostro que la fuente de variación se encontraba en los tratamientos (cepas de *P. capsici*) con una $R^2=0.8337$, un coeficiente de variación de 20.395 y $\alpha=0.05$ (A.3 Cuadro 25).

El resultado de la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) de la evaluación realizada a los 12 días, presentó a las cepas Phy-2, Phy-1, Phy-3, Phy-6, Phy-5, Phy-7 agrupadas con un 100% de severidad en las plantas evaluadas, mientras la cepa Phy-8 con 72.2% y la Phy-4 apenas alcanzó un 40% de daño (Cuadro 16). Esto quiere decir que a los 12 días no importa el origen de la cepa si fue de chile o jitomate, la severidad del daño ocasionado por las cepas de *Phytophthora capsici* alcanzó porcentajes altos.

Cuadro 16. Comparación de medias de la evaluación del día 12/10/2014.

Tratamiento	Media	Agrupación Tukey
Phy-2	100	A
Phy-1	100	A
Phy-3	100	A
Phy-6	100	A
Phy-5	100	A
Phy-7	100	A
Phy-8	72	B
Phy-4	40	C
Testigo	0	D

*Tratamientos con la misma letra son significativamente iguales.

4.5 confrontación dual

Durante el desarrollo del experimento se observó que algunas cepas de *Penicillium* sp. difundieron pigmentos de color amarillo en el medio de cultivo (Figura 40).

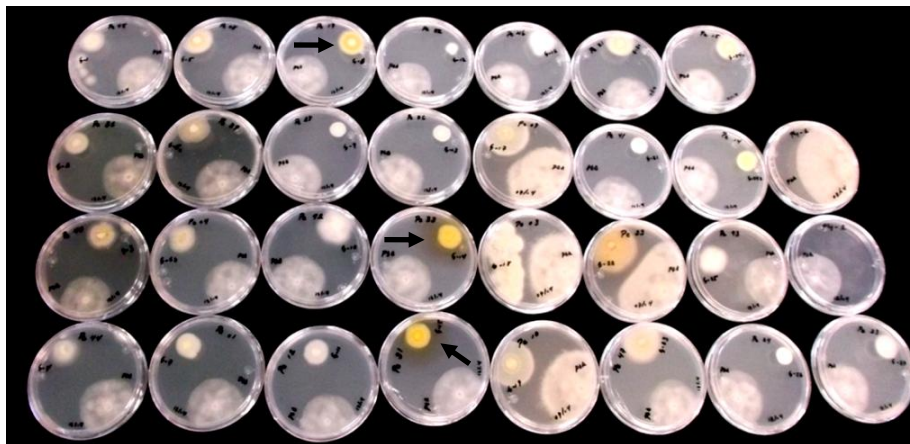


Figura 40. Desarrollo del experimento de confrontación dual. La flecha indican a las cepas de *Penicillium* sp. que difundieron pigmentación en el medio de cultivo.

Porcentaje de inhibición: El experimento se evaluó a los 10 días después del inicio del experimento. El análisis de varianza mostro que la fuente de variación se encontró en los tratamientos con $R^2=0.9211$ y con un coeficiente de variación de 7.9304 (A.3 Cuadro 26); por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 y se acepta la H_a : Al menos una de las cepas de *Penicillium* sp. produce inhibición diferente de las demás sobre el desarrollo de *P. capsici* en confrontación dual.

Al analizar la comparación de medias de los tratamientos se observó que la cepa Pe42 tuvo 63.66% de inhibición, seguido de las cepas Pe45, Pe12, Pe33, Pe32, Pe47, Pe40, Pe19 y Pe01, todos ellos con porcentajes arriba del 50%. Las cepas con menor inhibición respecto al testigo sin antagonista (Phy-2) son Pe43, Pe22 y Pe10, con un 39% de inhibición (Figura 41 y Cuadro 17). A partir de estos resultados se utilizaron en el experimento de confrontación *in vivo* en invernadero.

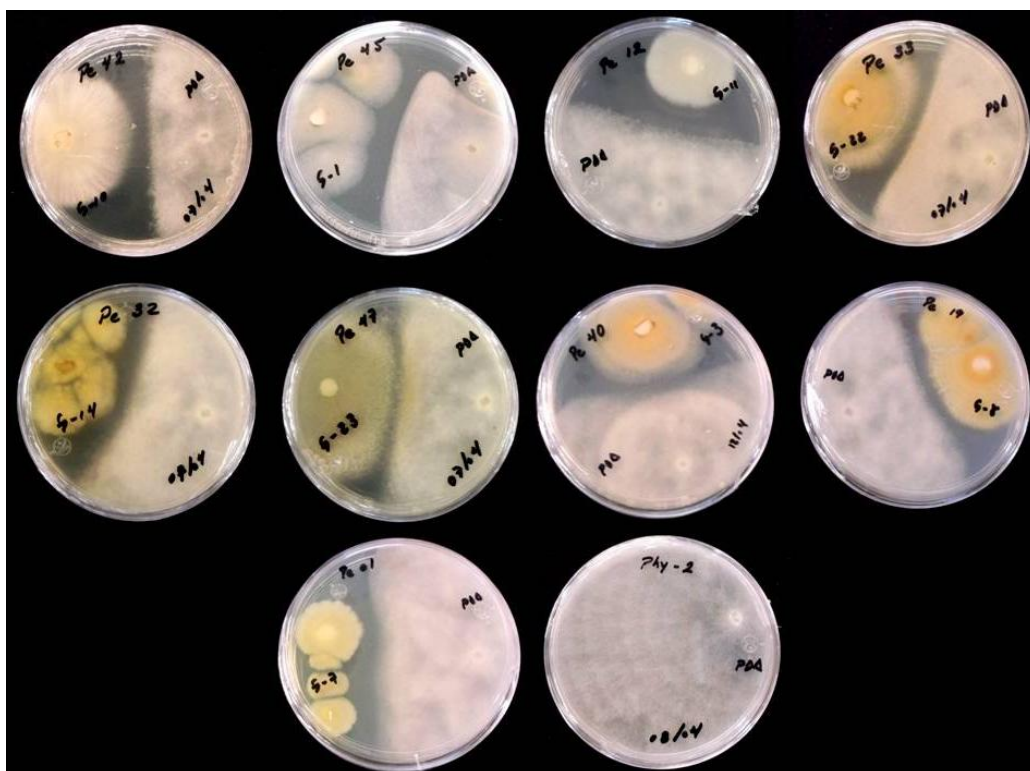


Figura 41. Cepas de *Penicillium* sp. que mostraron inhibición sobre *Phytophthora capsici* (Phy-2).

Cuadro 17. Comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), inhibición porcentual.

Tratamientos	Medias	Agrupamiento Tukey
Pe42	63.66	A
Pe45	58.78	A
Pe12	57.80	A
Pe33	55.61	AB
Pe32	54.03	AB
Pe47	53.45	B
Pe40	52.44	B
Pe19	51.12	B
Pe01	50.80	B
Pe23	49.58	BC
Pe26	48.26	BC
Pe24	46.95	BC
Pe28	45.94	BCD
Pe44	44.89	CD
Pe15	44.25	CD
Pe21	43.91	CD
Pe04	43.74	CD
Pe46	43.47	CD
Pe14	43.04	CD
Pe31	43.04	CD
Pe03	42.36	CD
Pe36	41.79	CD
Pe09	41.42	CD
Pe41	41.25	CD
Pe39	40.85	CD
Pe08	40.37	CD
Pe43	39.83	CD
Pe22	39.16	D
Pe10	36.13	D
Phy-2	0	E

*Tratamientos con la misma letra son significativamente iguales.

Evaluación del tipo de interacción: Para determinar el tipo de interacción de las cepas de *Penicillium* sp. sobre *P. capsici* se continuo con el experimento de

confrontación dual el cual se evaluó ahora a los 25 días después de su inicio. El análisis de varianza mostro que la fuente de variación se encontró en los tratamientos con una $R^2=0.5742$, un coeficiente de variación de 38.43 y una media de 44.16 (A.3 Cuadro 27). Esto determino el porcentaje de antagonismo, al realizar el análisis de comparación de medias con Tukey ($\alpha=0.05$) indico que a los 25 días la cepa Pe 45 tuvo 81.25% de antagonismo creciendo sobre *P. capsici* siendo el mejor tratamiento. Otras cepas sobresalientes son Pe40, Pe47, Pe33, Pe42, Pe32, Pe12 y Pe19 teniendo un porcentaje de antagonismo de entre el 75 al 56% (Cuadro 18). En la Figura 42 se puede observar los tratamientos antes mencionados presentando algún tipo de antagonismo (antibiosis, o competencia por espacio), donde primero se observo que se detuvo el crecimiento de *Phytophthora capsici* para después crecer sobre él, en los días subsecuentes.

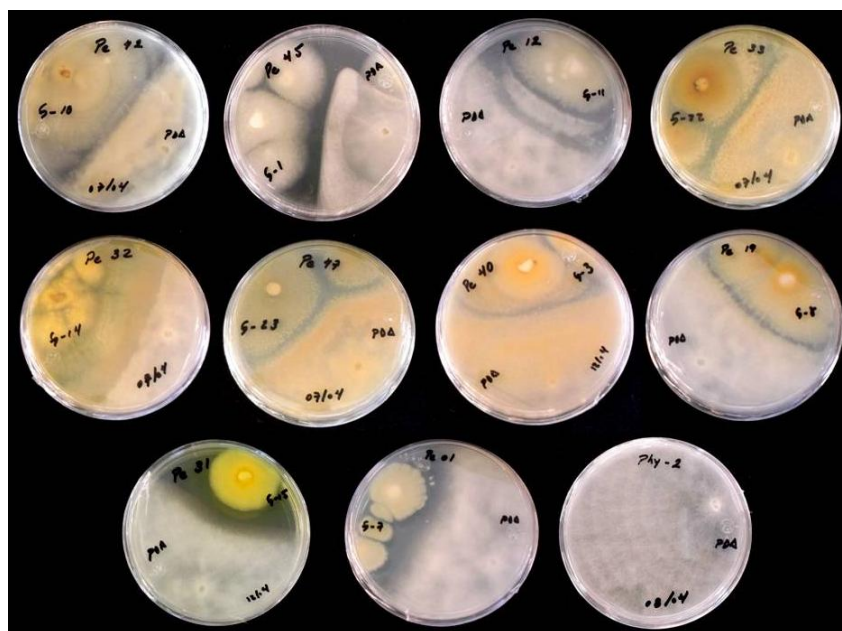


Figura 42. Interacciones observadas 25 días después del inicio del experimento de confrontación dual.

Cuadro 18. Comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), tipo de antagonismo.

Tratamiento	Media	Agrupación Tukey*
Pe45	81.25	A
Pe40	75.00	AB
Pe47	68.75	ABC
Pe33	68.75	ABC
Pe42	62.50	ABC
Pe32	62.50	ABC
Pe12	56.25	ABC
Pe19	56.25	ABC
Pe31	50.00	ABC
Pe08	50.00	ABC
Pe15	50.00	ABC
Pe44	50.00	ABC
Pe04	50.00	ABC
Pe39	43.75	ABCD
Pe26	43.75	ABCD
Pe46	37.50	ABCD
Pe28	37.50	ABCD
Pe03	37.50	ABCD
Pe01	37.50	ABCD
Pe09	37.50	ABCD
Pe21	37.50	ABCD
Pe36	31.25	BCD
Pe24	31.25	BCD
Pe14	31.25	BCD
Pe43	31.25	BCD
Pe10	31.25	BCD
Pe23	31.25	BCD
Pe22	31.25	BCD
Pe41	25.00	CD
Phy-2	0	D

*Tratamientos con la misma letra son significativamente iguales.

4.6 Microcultivo técnica de Riddell o método de laminilla

El objetivo de esta técnica es apreciar a nivel microscópico las interacciones entre ambos microorganismo. En la Figura 43 se puede observar el micelio de *Phytophthora capsici* sin antagonista y también micelio de *Phytophthora capsici* en proceso de desintegración al estar presente el antagonista, esto puede ser a causa de la exposición continua a los metabolitos producidos por las cepas de *Penicillium* sp.

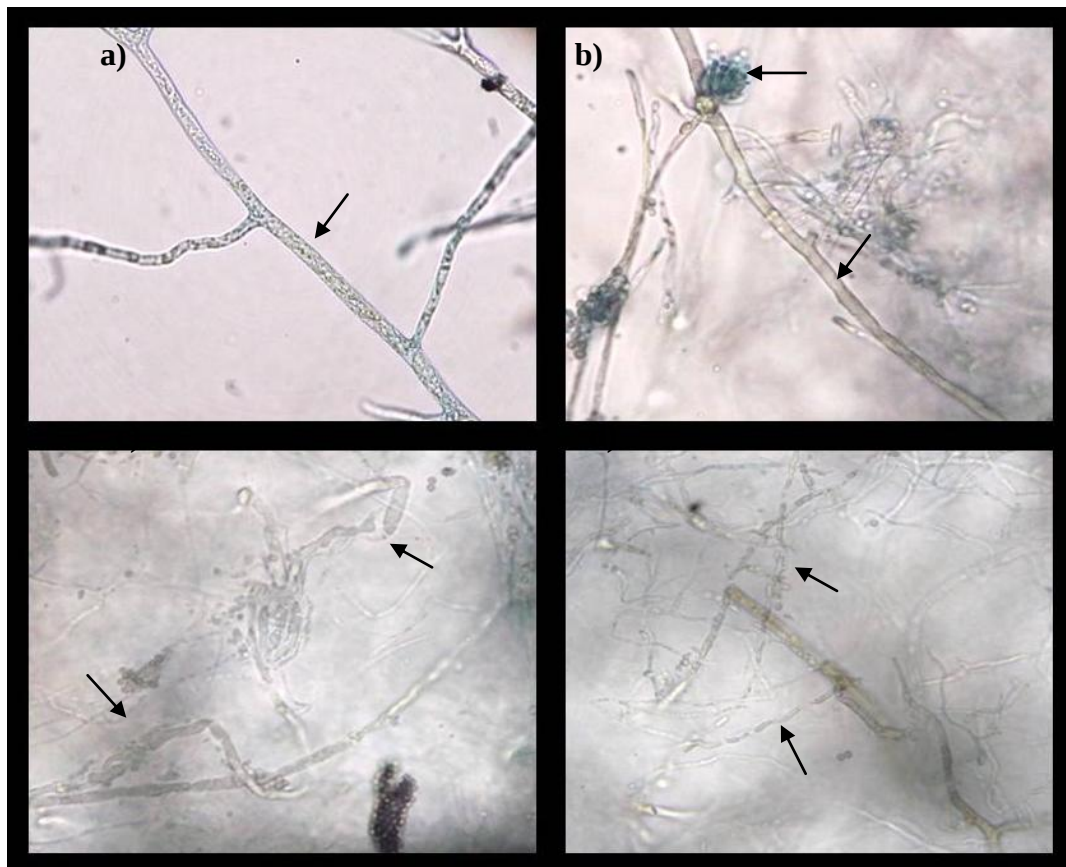


Figura 43. a) Micelio de *Phytophthora capsici* sin antagonistas, b) Micelio de *P. capsici* con *Penicillium* sp., c) y d) Las flechas indican el micelio de *P. capsici* comenzando a desintegrarse.

4.7 Confrontación *In vivo* del antagonismo en invernadero

El experimento inicio a partir del día en que se inoculo *P. capsici*, marcando el comienzo de la interacción. Durante el desarrollo del experimento se registro la incidencia de la enfermedad a los datos obtenidos se les aplicó la formula de Wolcan *et al.* (2001), que refiere a la Incidencia de la enfermedad (IE) en porcentaje de incidencia, así se obtuvo el grafico presentado en la Figura 44.

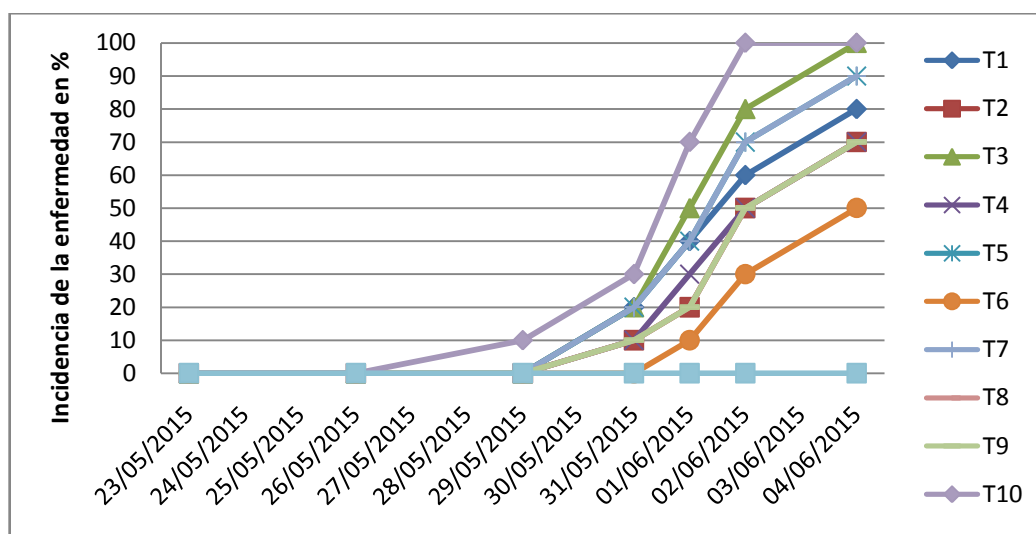


Figura 44. Incidencia de la enfermedad durante el desarrollo del experimento de control de la “Marchitez del chile” en invernadero. El Tratamiento T6 presento la menor incidencia (50%) y los tratamientos T10 y T3, mostraron el 100% de incidencia de la enfermedad.

El experimento se evaluó a los 10 días y se registrando la severidad. El análisis de varianza mostro que la fuente de variación se encontró en los tratamientos con una $R^2=0.6647$, un coeficiente de variación de 69.8727 y una media de 23.8181 (A.3 Cuadro 28). Por lo tanto se rechaza la H_0 y se acepta la H_a : Al menos una de las cepas de *Penicillium* sp., tiene diferente control de las demás

sobre la “Marchitez del chile” ocasionado por *P. capsici* durante el desarrollo de las plantas chile en invernadero.

El análisis de comparación de medias con Tukey ($\alpha=0.05$) a los 10 días indico que los tratamientos con mejor control sobre *P. capsici* fueron T6 y T8 que corresponden a las cepas Pe47 y Pe19, observándose una media de daño menor al 10%; En seguida los tratamientos T9, T2, T1 y T4, que pertenecen a las cepas Pe01, Pe45, Pe42 y Pe33, alcanzando porcentajes de daño entre 10 y 20%. Los tratamientos con el menor control o antagonismo son T7, T3 y T5 que son respectivamente Pe40, Pe12 y Pe32, mostraron un porcentaje de daño de entre el 28 y el 35%.

Cuadro 19. Comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para evaluación de la severidad experimento en invernadero.

Tratamientos	Media	Agrupación Tukey
T10	85	A
T5	35	B
T3	34.5	B
T7	28.5	B
T4	21	BC
T1	18	BC
T2	16	BC
T9	10.5	BC
T8	8	C
T6	5.5	C
T11	0	C

* Tratamientos con la misma letra son significativamente iguales.

Durante el desarrollo del experimento se observó variación en condiciones climatológicas (temperaturas bajas), lo cual pudo ocasionar que los microorganismos antagónicos detuvieran su desarrollo o la colonización de la rizosfera; ya que se observó que a los 15 días todos los tratamientos tuvieron síntomas de marchitez. Sería conveniente evaluar dosis y número de aplicaciones para extender la protección durante el desarrollo del cultivo de Chile.

4.8 Resultado de secuenciación

Resultado de la secuenciación son los siguientes: Las cepas de *Phytophthora capsici* aisladas (Phy-8, Phy-2 y Phy-5), corresponden a la especie con porcentajes de identidad del 85 al 95% de identidad confirmada (Cuadro 20).

Cuadro 20. Microorganismos secuenciados.

Numero de Muestra	Nombre científico	identidad
Phy-8	<i>Phytophthora capsici</i>	95%
Phy-2	<i>Phytophthora capsici</i>	94%
Phy-5	<i>Phytophthora capsici</i>	85%
Pe40	<i>Penicillium glabrum</i>	98%
Pe32	<i>Penicillium bilaiae</i>	97%
Pe33	<i>Emericella nidulans</i>	99%

Para las cepas representantes de *Penicillium* sp. con destacado control sobre *P. capsici* son la Pe40 (*Penicillium glabrum*) y Pe32 (*Penicillium bilaiae*); Adicional se aisló aparentemente la fase sexual de *Penicillium* (Pe33) que al

secuenciar correspondió al ascomiceto *Emericella nidulans* con un 99% de identidad, siendo la fase sexual de *Aspergillus nidulans*.

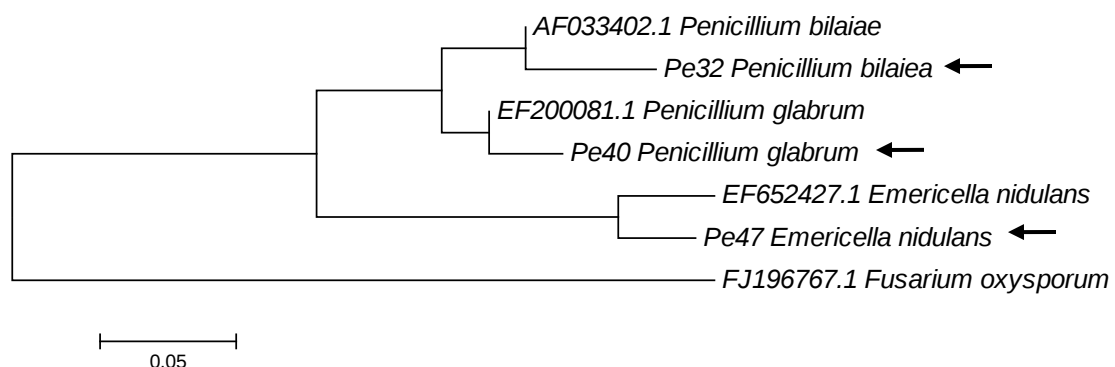


Figura 45. Árbol Filogenético. La flecha indica las cepas aisladas (Pe32, Pe 40 y Pe47) y además comparadas con secuencias del GenBank.

4.9 Discusión general

Ferrera-Cerrato y Alarcón (2007) mencionan que ciertos hongos presentes en el suelo son antagonistas a fitopatógenos y pueden prevenir la infección de las plantas. Este antagonismo contra patógenos vegetales 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* sp. que se aislaron y evaluaron durante el desarrollo del presente trabajo. Dupont *et al.* (2006) menciona que la identificación de especies de *Penicillium* sp. usando características fenotípicas, se mantienen

como algo subjetivo 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. Los estudios morfológicos ya no son suficientes para el estudio de la diversidad de especies es necesario complementarlos con los estudios moleculares.

Fueron varias las cepas que mantuvieron los mejores resultados tanto en confrontación dual como en antagonismo a *P. capsici*, destacando a Pe42, Pe45, Pe47, Pe40, Pe33, Pe32, Pe19 y Pe12. Esto coincide con lo reportado por Kang (2003), quien estudió una cepa de *Penicillium* llamada AF5, la cual posee componentes antifúngicos contra patógenos en el suelo, tales como *P. capsici*; este *Penicillium* posee un esporogen AO-1, el cual se activa, inhibiendo el crecimiento de micelio de *P. capsici*, obteniendo resultados tan efectivos como el metalaxyl. Fang y Tsao (1995), también evaluó a *P. funiculosum*, como agente de control biológico contra *P. cinnamomi*, *P. parasítica* y *P. citrophthora* en la pudrición de raíz de las azalea y la naranja dulce, observando un importante control. Roselló (2003) y Vázquez (2013) hacen referencia a *P. oxalicum* (cepa PO212) en el control del enfermedades vasculares de plantas hortícolas como *F. oxysporum*, *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*, *Botrytis cinerea*, *P. parasitica* y *P. infestans* en tomate, melón y sandia. Esto nos puede dar indicios de los alcances que pueden tener *Penicillium* como un organismo de control biológico, el cual se presta para ser estudiado a más detalle; inclusive para el control de otro tipo de patógenos.

V. CONCLUSIONES

- Los efecto antagónico *in-vitro* entre *Penicillium* sp. y *Phytophthora capsici* fueron inhibición, competencia por espacio y desintegración de micelio de *Phytophthora capsici* posiblemente por antibiosis.
- Las cepas de *Penicillium* sp. con el mejor efecto de inhibición sobre el desarrollo de *Phytophthora capsici* son Pe42, Pe45, Pe12, Pe33, Pe32, Pe47, Pe40, Pe19 y Pe01.
- La agrupación generada por los RFLPs definió la selección de las cepas de *Penicillium* sp. antagónicas que se probaron.
- Los agrupamientos generados por los ISSRs para las cepas de *Penicillium* sp. no coincidieron con la acción antagónica sobre *Phytophthora capsici*.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rincón V. H., T. Corona T., P. López L., L. Latournerie M., M. Ramírez M., H. Villalón M. y J. A. Aguilar C. 2010. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillos, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- Alexopoulos C, J. 1977. Introducción a la Micología, Ed. Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 615 p.
- Aldana D, V. 2006. "Inoculo y manejo químico de la pudrición de raíz y cuello (*Phytophthora capsici* Leo.) En el cultivo de Chile (*Capsicum annuum*) y jitomate (*lycopersicon sculentum*.) en invernadero". Tesis de licenciatura, Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, México. 62 p.
- Aldana D, V. 2009 "Manejo Químico en diferentes aislados de *Phytophthora capsici* Leo., en Chile (*Capsicum annum* L.) Jalapeño en invernadero". Chapingo, México. Tesis de Maestría, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. 77 p.
- Agamez R, E., Barrera V, J. y Oviedo Z, L. 2009. Evaluación del antagonismo y multiplicación del *Trichoderma* sp. en sustrato de plátano en medio liquido estático. Acta biológica Colombiana. 14: 64 p.
- Anaya L, J. 2000. Detección de resistencia o tolerancia a la mezcla de los geminivirus PepGMV-PHV en chile. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya. México. 60 p.
- Anaya L, J. L., González Ch, M. M., Villordo P, E., Rodríguez G, R., Rodríguez M, R., Guevara G, R. G., Guevara O, L., Montero T, V., y Torres P, I. 2011.

- Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2: 373-383.
- Arcos C, G., Hernández H, J., Uriza A, D., Pozo C, O., y Olivera S, A., 1998. "Tecnología para producir chile jalapeño en las planicies costeras del golfo de México". INIFAP. Folleto Técnico Núm. 24. Tlapacoyan, Veracruz, México. 206 p.
- Arias C, E. L. y Piñeros E, P. A. 2008. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde. Tesis de Grado en la Facultad de ciencias carrera de Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. Colombia. 204 p.
- ASERCA. 1998. Claridades Agropecuarias. Una hortaliza de México para el Mundo. Revista de publicación mensual. Editada por Apoyos y Servicios de Comercialización Agropecuaria. 56: 1-16.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. *Illustrated General of Imperfect Fungi*. 3er ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis. Minnesota. U.S.A. 241 p.
- Bell, D. K., Wells, H. D., and Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre, J. R., Colmenárez, Y. C. 2014. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. Facultad de Agronomía. Universidad de Uruguay. 404 p.
- Boosalis, M. G. 1956. Effect of soil temperature and green manure amendment of unsterilized soil on parasitism of *Rhizoctonia solani* by *Penicillium vermiculatum* and *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 46: 473-478.

- Bosland, P. W. and Lindsey, D. L. 1991. A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper (*Capsicum annuum*). Plant Dis. 75: 1048-1050.
- Boswell, V. R. 1937. Improvement and genetics of tomatoes, peppers, and eggplant. U.S.D.A. Yearbook of Agriculture 1937: 176-206.
- Carrillo, L. 2003. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta. 1er edición. Salta, Argentina. 130p.
- Castro R, A., Fernández P, S. P. y Osuna A, P. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Fitopatología 30:49-65.
- Dick, M. W. 2001. Straminipilous Fungi. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19: 11-15.
- Dupont, J., Denetiere, B., Jacket, C. y Roquebert, M. F. 2006. PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. Iberoamerican Mycology. 23:145-150.
- Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 608 p.
- Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society, St Paul Minnesota. 551 p.

- FAOSTAT. 2015. Estadística Mundial de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO). Última consulta: marzo, 2015. Página web: <http://faostat.fao.org>
- Fang, J. G. and Tsao, P. H. 1995. Efficacy of *Penicillium funiculosum* as biological control agent against Phytophthora root rot of azalea and citrus. *Phytopathology* 85: 871-878.
- Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón A., 2007. Microbiología Agrícola: Hongos, Bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. Ed. Trillas. México, D.F. 568 p.
- Flores O, A., Martínez S, J. P. y Martínez E, A. D. 1997. Nueva tecnología en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *In*: Tópicos selectos de Fitopatología: Genética Molecular. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) 24-43 pp.
- French, E. R. y Herbert, T. T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 289 p.
- Fuentes D, G. y Ferrera-Cerrato, R. 2007. Ecología de la Raíz. 2da edición. Cd. Obregón, Sonora, México. 153 p.
- García R, M. R., Chiquito A, E., Loeza L, P. D., Godoy H, H., Villordo P, E., Pons H, J. L., González Ch, M. M. y Anaya L, J. L. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44: 701-709.

- Galindo A, J. 1960. Estudio preliminar sobre la marchitez de las plantas de chile en México y su agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Tesis Licenciatura ENA., Chapingo, Texcoco, México. 45 p.
- González Ch, M. M., y Simpson, W. J. 1997. Diversidad Genética en Hongos. *In: Tópicos selectos de Fitopatología: Genética Molecular*. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) 4-23 pp.
- González Ch. M. M., Villordo P. E., Pons H. J. L., Delgadillo S. F., Paredes M. R., Godoy H. H., Medina C. T., Anaya L. J. L., Rodriguez G. R., Gámez V. F. P., Ruiz C. E., Ruiz L. A., Cárdenas B. R., Cárdenas A. J. R., Torres P. I., Rendón P. E., Martinez S. J., Mojarro D. F. y Villaseñor E. O. M. 2009. Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato. CONCYTEG. Cetroch Guanajuato. INIFAP. 36p.
- González S, A. 2009. Diagnóstico y Control de Especies de *Aspergillus* Productoras de Ocratoxina A. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. Madrid, España. 236 p.
- Guigón L., C. y González G., P. A. 2001. Estudio Regional de la Enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su Comportamiento Temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19: 49–56.
- Guillén C, R. 2005. Rizobacterias y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* en Dolores Hidalgo,

- Guanajuato, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 68 p.
- Hernández L., A. N., Bautista B., S., Vázquez V., M. G. y Hernández R., A. 2007. Uso de microorganismos Antagonistas en el control de enfermedades Postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 1: 66-74.
- Hidalgo Y, P. I. 2013. Caracterización Bioquímica y Molecular de la Biosíntesis del Antitumoral Andrastina y de la Toxina PR en *Penicillium Roqueforti*. Tesis Doctoral. Universidad De León. Dpto. de Biología Molecular área de Microbiología. Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). León, España. 243 p.
- Kang J, G., Hur J, H., Yun B, S., Yoo I, D. and Kang K, Y. 2003. Antifungal Activity of Sporogen AO-1 and *p*-Hydroxybenzoic acid Isolated from *Penicillium* sp. AF5. *Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 33-37
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. eds. 2001. Dictionary of the Fungi, 9th ed. Wallingford, UK: CABI Publishing. 520 p.
- Kloepper, J. W. 1989. Aqueous Formulation of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Control of Foliar Pathogens. *Phytopathology* 89: 540-550.
- Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12:401-408.
- Long S, J. 1986. "Capsicum y Cultura, La Historia del Chilli" Editorial Fondo de cultura económica, México, D.F. 9-11, 69-101, 115-136 pp.

- Long S, J., Álvarez, M., Camarena, A. 1998. "El placer Del Chile". Editorial Clío, Libro y vídeos, S.A. DE C.V. México D.F. 93 p.
- Martínez B, E. 2003. Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Departamento de Sanidad y Anatomía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis de Doctorado. Barcelona, España. 305 p.
- Martínez S, J. P. y Alvarado G, O. G. 1997. La Reacción en Cadena de la polimerasa en Virología Vegetal. *In*: Tópicos selectos de Fitopatología: Genética Molecular. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) 44-51 pp.
- Mendoza Z, C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 85 p.
- Montes B, R. 1992. Identificación de hongos Fitopatógenos. Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional. Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. 149 p.
- Montes H, S., Heredia G, E. y Aguirre G, j. A. 2004. "Fenología del cultivo del chile (*Capsicum annum* L.)". Sección: Mejoramiento y Recursos Genéticos. *In*: Primera convención mundial del chile 2004, Memoria. 43-48 pp.
- Moreira, M. S. F., Huising, E. J. y Bignell, D. E. (editores). 2012. Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos

- Naturales (Semarnat). Instituto Nacional de Ecología (INE). 1er edición. México, D.F. 360 p.
- Muñoz R, J. J. y Castellanos, J. Z. 2003. "Manual de producción hortícola en invernadero", Instituto de Capacitación para la Productividad Agrícola (INCAPA), México. 226-262, 263-297 pp.
- Naranjo B, L. 2003. Caracterización bioquímica y molecular del metabolismo del ácido pipecólico en *Penicillium chrysogenum*. Universidad de León. Departamento de Ecología, Genética Y Microbiología. Tesis Doctoral. León, España. 200 p.
- Nuez V, F., Gil O, R., Costa G, J. 1996. "El cultivo de pimientos, chiles y ajíes". Ediciones Mundi-Prensa. España-México 15-565 pp.
- Paul, B., 1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiosum*. FEMS Microbiology Letters. 176, 25-30.
- Pérez M, L., Rico J, E., Ramírez M, R. y Sánchez P, J. R. 2004. "Identificación de virus Fitopatogenos en Chile, en el estado de Guanajuato, México". Primera Convención Mundial del Chile. Sección Fitosanidad. 165-169 pp.
- Pérez M, L., Casillas B, S. A. y Ramírez M, R. 2005. "El Cultivo del chile y su importancia económica en el norte del estado de Guanajuato, México". Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas. Guanajuato, México. Primera edición 13-62 pp.
- Perezny, K., Roberts, P., Murphy, J., Goldberg, N. 2003. Compendium of pepper diseases. American Phytopathological Society. 63 p.

- Pitt, J. I. 1980. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pitt, J. I., and Leistner, L. 1991. Mycotoxins and Animal Foods: Toxigenic *Penicillium* species. JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 81-99 pp.
- Pochard, E., Palloix, A., Daubeze, A. M. 1992. Le piment. In: Gallais, A.; Bannerot, H. (Eds.). Amélioration des espèces végétales cultivées: Objectifs et critères de selection. Ed INRA. Paris. 420-447 pp.
- Ramírez A, N. A. 2013. Factores Bióticos y Abióticos Relacionados con el Engrosamiento del Cladodio del Nopal (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 110 p.
- Ramírez V, J. y Sainz R, R. A. 2006. "Manejo integrado de las enfermedades del tomate". Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología, Sinaloa, Agrobiológica, Primera edición, México, 360 p.
- Ramos S, R. U., Gutiérrez S, J. G., Rodríguez G, R., Salcedo M, S. M., Hernández L, C. E., Luna O, H. A., Jiménez B, J. F., Fraire V, S. y Almeyda L, I. H. 2010. Antagonismo de dos Ascomicetos Contra *Phytophthora capsici* Leonian, Causante de la Marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 28: 75-86.
- Rico G, L. 2002. Búsqueda de resistencia natural en plantas de chile (*capsicum spp*) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México. 114 p.

- Ristiano, J. B., Larking, R. P., Campbell, C. L. 1994. Spatian dynamics of disease symtom expression during Phytophthora epidemics in bell pepper. *Phytopathology* 84: 55.
- Ristaino, J. B. and Johnston, S. A. 1999. Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. *Plant Disease*. 83:1080-1089.
- Romero C, S. 1980. Hongos Fitopatogenos. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México. 374 p.
- Romero C, S. 1999. Hongos Fitopatogenos. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México. 374 p.
- Roselló C, J. L. 2003. Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Valencia, España. 262 p.
- Sánchez C, N. G., Luna R, M., Vázquez T, S. M., Sánchez V, L. R., Santana B, N., Octavio A, P., y Iglesias A, L. G. 2012. Optimización de un protocolo de aislamiento del DNA y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana* Brong. (Zimiaceae). *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 18: 123-133.
- San Martín F, Bailey AM. 1978. Detección de microorganismos antagónicos a *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. en la región manzanera de Laguna de Sánchez, Santiago, Nuevo León, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P. B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciufetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Yahr, R., Groenewald, J. Z., Arzanlou, M., De Hoog, G. S., Crous, P. W., Hewitt, D., Pfister, D. H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M. J., Aptroot, A., Suh S. O., Blackwell, M., Hillis, D. M., Griffith, G. W., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Lumbsch, H. T., Lücking, R., Büdel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D. M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmannkohlmeier, B., Mostert, L., O'donnell, K., Sipman, H., Rogers, J. D., Shoemaker, R. A., Sugiyama, J., Summerbell, R. C., Untereiner, W., Johnston, P., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P., Crittenden, P., Cole, M. S., Hansen, K., Trappe, J. M., Lutzoni, F. & Spatafora, J. W. 2009. The Ascomycota tree of life: A phylum wide Phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology* 58: 224-239.
- Seema, M. and Devaki, N.S. 2012. In vitro evaluation of Biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Technology* 8: 233-240.
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sagarpa. México. Última consulta: marzo, 2015. Página web: <http://www.siap.gob.mx>
- Silva R, H. V., Fernández P, S. P., Góngora C, C., Macías L, B. C. y Ávila Q, G. D. 2009. Distribución Espacio Temporal de la Marchitez del Chile

- (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e Identificación del Agente Causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 134-147.
- Valadez L, A. 1990. Producción de Hortalizas. Editorial Limusa. México, D.F. 298 p.
- Valadez M, E. y Kahl, G. 2005. Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio. Universidad Autónoma de Chapingo. Mundi-Prensa. México, D.F. 147 p.
- Vázquez 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. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid. España. 234 p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants, principles, methods and applications. 2a. Edición. CRC Press. Taylor & Francis Group. USA. 444 p.
- Wolcan, S. M., Lori, G. A., Ronco, L., Mitidieri, A. F. y Fernández, R. 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.

APÉNDICE

A.1 Determinación del efecto del ácido Láctico sobre *Phytophthora capsici*

P. capsici es un microorganismo que requiere de agua para llevar a cabo su ciclo biológico, por tal razón no está exento a presentar contaminación bacteriana, sobre todo al ser recientemente aislada. El ácido láctico es utilizado para acidificar el medio de cultivo e inhibir el desarrollo de bacterias, sobre todo bacterias que contaminan el crecimiento del micelio.

El Experimento consistió en evaluar dosis de ácido Láctico como se indica en el Cuadro 21 (A.1) en medio PDA; siendo cada concentración un tratamiento y cada tratamiento conformado por 6 repeticiones. Se evaluó el crecimiento diario hasta que el testigo sin ácido láctico llenó la caja Petri. La cepa empleada fue Phy-2. Se incubó a 25°C. Se midió el crecimiento radial utilizando un vernier o pie de rey. El experimento se llevó a cabo dos veces utilizando un diseño completamente al azar.

Cuadro 21. Dosis de ácido láctico evaluadas en el experimento.

Tratamiento	Porcentaje considerado	Dosis en µL/L
T1	100%	1200
T2	80%	960
T3	60%	720
T4	40%	480
T5	20%	240
T6	0%	0

A.2 Resultados del efecto del ácido Láctico sobre *Phytophthora capsici*

El análisis de varianza mostro que la fuente de variación se encontraba en los tratamientos con una $R^2 = 0.9953$, un coeficiente de variación de 3.33 y $\alpha = 0.05$ (Cuadro 22 del apéndice). Esto indico que las dosis del ácido láctico influyeron en el crecimiento del micelio de la cepa Phy-2.

Cuadro 22. Resultados del análisis de varianza en el programa SAS, para el experimento de dosis de ácido láctico.

The GLM Procedure					
Variable: MAXCREC					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	221.0803833	22.1080383	529.56	<.0001
Error	25	1.0436917	0.0417477		
Corrected Total	35	222.1240750			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	MAXCREC Mean	
	0.995301	3.333609	0.204322	6.129167	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	5	220.6451917	44.1290383	1057.04	<.0001
REP	5	0.4351917	0.0870383	2.08	0.1010

El resultado de la comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) mostro que el tratamiento PDA 0% y 20% presentaron el mismo comportamiento; mientras que los demás tratamientos conforme aumenta la concentración de ácido láctico, *Phytophthora capsici* reduce su crecimiento (Cuadro 23).

En la Figura 46 se puede apreciar cada uno de los tratamientos evaluados, conforme aumenta la concentración de ácido láctico la cepa de *Phytophthora capsici* reduce su velocidad de crecimiento y se ve reflejado en un lento crecimiento.

Cuadro 23. Comparación de medias (Tukey), concentración ácido láctico.

Tratamiento	media	Agrupación Tukey*
PDA 0 %	8.5	A
PDA 20 %	8.5	A
PDA 40 %	7.67	B
PDA 60 %	6.19	C
PDA 80 %	4.17	D
PDA 100 %	1.73	E

*Tratamientos con la misma letra son significativamente iguales.

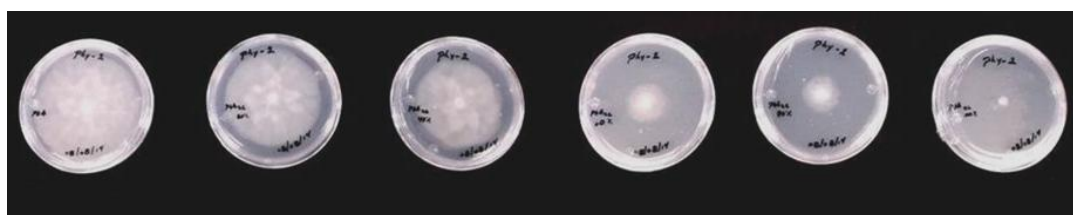


Figura 46. Evaluación de dosis de ácido láctico sobre *Phytophthora capsici* de izquierda a derecha los tratamientos con 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100%.

A.3 Cuadros de Resultados SAS

Cuadro 24. Resultados del análisis de varianza en el programa SAS de la evaluación del día 6.

The GLM Procedure					
Variable: severi					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	106230.2469	13278.7809	46.10	<.0001
Error	72	20738.8889	288.0401		
Corrected Total	80	126969.1358			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	severi Mean		
0.836662	34.36778	16.97174	49.38272		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	8	106230.2469	13278.7809	46.10	<.0001

Cuadro 25. Resultados del análisis de varianza en el programa SAS, evaluación del día 12.

The GLM Procedure					
Variable: severi					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	94083.9506	11760.4938	45.15	<.0001
Error	72	18755.5556	260.4938		
Corrected Total	80	112839.5062			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	severi Mean	
	0.833786	20.39509	16.13982	79.13580	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	8	94083.95062	11760.49383	45.15	<.0001

Cuadro 26. Resultado del análisis de confrontación dual en el programa SAS.

The GLM Procedure					
Variable: Dual					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	13556.21447	467.45567	36.27	<.0001
Error	90	1159.83885	12.88710		
Corrected Total	119	14716.05332			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Dual Mean	
	0.921185	7.930414	3.589860	45.26700	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	29	13556.21447	467.45567	36.27	<.0001

Cuadro 27. Resultado del análisis de varianza del tipo de interacción entre *Penicillium* sp y *Phytophthora capsici*.

The GLM Procedure					
Variable: Dual					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	34979.16667	1206.17816	4.19	<.0001
Error	90	25937.50000	288.19444		
Corrected Total	119	60916.66667			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Dual Mean	
	0.574213	38.43688	16.97629	44.16667	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	29	34979.16667	1206.17816	4.19	<.0001

Cuadro 28. Resultado del análisis de varianza del experimento de la evaluación *In vivo* del antagonismo de cepas de *Penicillium* sp. sobre *P. capsici*.

The GLM Procedure						
Variable: severi						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	10	54376.36364	5437.63636	19.63	<.0001	
Error	99	27420.00000	276.96970			
Corrected Total	109	81796.36364				
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	severi Mean		
	0.664777	69.87270	16.64241	23.81818		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
TRAT	10	54376.36364	5437.63636	19.63	<.0001	