



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**ANTAGONISMO DE *Saccharicola*  
sp., CONTRA FITOPATÓGENOS  
DE LA RAÍZ DE CHILE JALAPEÑO  
(*Capsicum annuum*)**

**ANA KARINA UC ARGUELLES**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2016**

La presente tesis titulada: **ANTAGONISMO DE *Saccharicola* sp., CONTRA FITOPATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum*)** realizada por la alumna: **Ana Karina Uc Arguelles** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESOR



Dr. Jesús Pérez Moreno

ASESOR



M. C. Victoria Ayala Escobar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2016

### **Nota aclaratoria**

Se hace la aclaración de que el género *Saccharicola* fue reclasificado como *Stagonospora*; por lo anterior en trabajos posteriores deberá usarse este último término.

ANTAGONISMO DE *Saccharicola* sp., CONTRA FITOPATÓGENOS DE LA RAÍZ DE  
CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum*)

Ana Karina Uc Arguelles, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016

**RESUMEN**

La marchitez es la principal enfermedad del chile (*Capsicum annuum* L.) a nivel mundial. Es causada por un complejo fúngico; sin embargo *Phytophthora capsici* es el principal patógeno, el cual provoca pérdidas de hasta 100% en la producción. El control mediante prácticas culturales y químicos ha sido poco efectivo. El control biológico mediante la introducción de organismos antagonistas constituye una alternativa de manejo de estos patógeno. Por ello, se evaluó la capacidad antagónica de *Saccharicola* sp. *in vitro* e invernadero contra *P. capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Mediante confrontaciones duales se evaluó la reducción de crecimiento de los fitopatógenos y se registró el número de días en que el antagonista invadió el micelio de cada uno de los patógenos, adicionalmente se determinó la viabilidad del micelio invadido y la producción de propágulos de los fitopatógenos. *Saccharicola* sp. causó reducción de 44.8% y 45.1% en el crecimiento de *P. capsici* y *F. oxysporum*, respectivamente a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc) y en *R. solani* 36.2% a los 2 dpc. Para determinar su potencial micoparasítico se realizaron microcultivos. A las 72 h se observó el enrollamiento del antagonista alrededor de *P. capsici*. En *R. solani* desde las 24 h se observaron hundimientos en los sitios de contacto con el antagonista. A pesar que en condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp. mostró un efecto negativo contra los fitopatógenos y hubo evidencia de micoparasitismo, en invernadero no redujo la incidencia y severidad de la enfermedad, ni promovió el crecimiento de las plantas.

**Palabras clave:** control biológico, micoparasitismo, marchitez del chile, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*.

ANTAGONISM OF *Saccharicola* sp., AGAINST ROOT PHYTOPATHOGENS OF  
JALAPEÑO CHILLI (*Capsicum annuum*)

Ana Karina Uc Arguelles, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016

**ABSTRACT**

Wilt is the main disease of chilli (*Capsicum annuum* L.) worldwide. It is caused by a fungal complex; however *Phytophthora capsici* is the main pathogen, which causes losses of up to 100% in production. Control through cultural practices and chemicals has been ineffective. Biological control through the introduction of antagonistic organisms is an alternative for the management of these pathogens. Therefore, the antagonistic ability of *Saccharicola* sp. *in vitro* and in greenhouse was evaluated against *P. capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. By evaluating dual confrontations the reduction of growth of phytopathogens was evaluated and the number of days in which the antagonist invaded the mycelium of each of the pathogens was evaluated, additionally the viability of the invaded mycelium and the production of phytopathogenic propagules were determined. *Saccharicola* sp. originated a reduction of 44.8% and 45.1% in the growth of *P. capsici* and *F. oxysporum*, respectively at 3 days post-confrontation (dpc) and in *R. solani* 36.2% at 2 dpc. Microcultures were performed to determine their mycoparasitic potential. At 72 h the coiling of the antagonist fungus around *P. capsici* was observed. In *R. solani* at 24 h, dents were observed at sites of contact with the antagonist. Although *in vitro* tests *Saccharicola* sp. showed a negative effect against plant pathogens and there was evidence of mycoparasitism, in greenhouse did not reduce the incidence and severity of the disease, nor promoted the growth of plants.

**Keywords:** biological control, mycoparasitism, withered chilli, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al pueblo de México quien a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) financió la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados en particular al Instituto de Fitosanidad por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A la Dra. Emma Zavaleta por sus conocimientos, apoyo, paciencia y comprensión en la realización de la presente investigación.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno por sus consejos, asesoría y apoyo en la realización del presente trabajo.

A la M. C. Victoria Ayala Escobar por su asesoría y apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Daniel Ochoa Martínez por su apoyo en la realización de la tesis.

Al Dr. Remigio Guzmán Plazola por el espacio proporcionado para la realización del experimento.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su asesoría en el análisis estadístico.

A la M.C. Greta Hanako Rosas Saito de la Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic® por el análisis de las muestras.

Al M.C. Victorino Santiago Pérez por su apoyo y asesoría en la realización del presente trabajo.

Al M. C. Manuel Silva Valenzuela por su asesoría en la realización del presente trabajo.

A mis amigos: Yoana, Priscila, Hernán, Florecita, Fernando y Victorino por su amistad y hacer mi estancia placentera.

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme culminar una etapa más en la vida.

A mis padres Amalio Uc Pat y Ernestina Arguelles Huchin por su apoyo, comprensión, sabiduría y amor durante estos años. Por guiarme en cada paso de la vida.

A mi hermana Maricela que en paz descansa.

A mis herman@s Higinia, Fabiana, Eusebia, Susana, Benjamín y Martín por ser parte de mi vida.

A mis sobrinos por los momentos felices que me han brindado.

A mi futuro esposo y amigo Pavel Padilla por su amor, paciencia y apoyo durante la realización de la tesis.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
El cultivo de chile.....	3
Taxonomía.....	3
Importancia económica en México.....	4
Principales enfermedades del cultivo de chile.....	4
Marchitez del chile .....	5
Control biológico.....	7
<i>Saccharicola</i> sp. ....	9
Antecedentes del género .....	9
Taxonomía.....	9
Características morfológicas.....	9
Biología y ciclo de vida .....	10
Potencial antagonico de <i>Saccharicola</i> sp. ....	11
Aislados endófitos de <i>Saccharicola</i> sp.....	11
Importancia industrial de <i>Saccharicola</i> sp. ....	12
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> .....	14
Interacción micelial de <i>Saccharicola</i> sp.- <i>P. capsici</i> y <i>Saccharicola</i> sp.- <i>R. solani</i> .....	16
Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	17
Ensayo para determinar si <i>Saccharicola</i> sp. se establece como endófito en plantas de chile jalapeño .....	17
Pruebas de antagonismo en invernadero .....	18
Tratamientos .....	18
Germinación de semillas .....	19
Preparación del inóculo del antagonista y patógenos e inoculación .....	19

Variables evaluadas .....	20
Análisis estadístico .....	21
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> .....	22
Interacción micelial de <i>Saccharicola</i> sp.- <i>P. capsici</i> y <i>Saccharicola</i> sp.- <i>R. solani</i> .....	25
Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	28
Ensayo para determinar si <i>Saccharicola</i> sp. se establece como endófito en plantas de chile jalapeño .....	29
Antagonismo de <i>Saccharicola</i> sp. en invernadero .....	29
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>34</b>

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Principales estados productores de chile verde en México (SIAP, 2014). .....4
- Cuadro 2.** Efecto de *Saccharicola* sp. (A) sobre el crecimiento micelial de *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) y sobre la producción de esporangios y zoosporas en *P. capsici*. .....22
- Cuadro 3.** Efecto de *Saccharicola* sp. (A) sobre la producción de propágulos (esporangios y zoosporas) de *P. capsici*, *F. oxysporum* (microconidios) y *R. solani* (microesclerocios). .....25
- Cuadro 4.** Efecto de *Saccharicola* sp. en la mortalidad e incidencia de plantas enfermas, altura y peso seco de plantas de chile jalapeño variedad “M” en invernadero. ....30

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Confrontaciones duales para evaluar el efecto antagonico de *Saccharicola* sp. (A) sobre *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs). A) Antagonista-Pc, B) Antagonista-Fo, C) Antagonista-Rs, D) Testigo Pc, E) Testigo Fo y F) Testigo Rs..... 14
- Figura 2.** Pruebas de antagonismo de *Saccharicola* sp. (A) contra *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) a los 4 días posteriores a la confrontación. A) A-Pc, B) A-Fo, C) A-Rs, D) testigo Pc, E) testigo Fo y F) testigo Rs..... 23
- Figura 3.** Antagonismo de *Saccharicola* sp. (A) contra *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) a los 21 y 30 días posteriores a la confrontación (dpc). A) A-Pc, B) testigo Pc a los 21 dpc, C) A-Fo, D) testigo Fo, E) A-Rs y F) testigo Rs a los 30 dpc con desarrollo de microesclerocios. ↑ ..... 23
- Figura 4.** Promedio de crecimiento radial de *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc) y *R. solani* (Rs) a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la confrontación (hpc) con *Saccharicola* sp. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). 24
- Figura 5.** Viabilidad del micelio de *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs), a partir de cilindros de micelio del lado del patógeno invadido por el antagonista. A) crecimiento de Pc y antagonista 5 días después de la siembra (dds) del cilindro, B) crecimiento de Fo sin presencia del antagonista y C) crecimiento de Rs con presencia de microesclerocios y sin presencia del antagonista. .... 25
- Figura 6.** Pruebas de la interacción micelial entre *Saccharicola* sp.-*P. capsici* (A-Pc). A) crecimiento paralelo de las hifas de *Saccharicola* sp. y *P. capsici* (adosamiento) 24 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem). B) formación de células pseudoparenquimatosas (cp) de *Saccharicola* sp. a las 48 hpem. C) enrollamiento de *Saccharicola* sp., en la hifa de Pc a las 72 hpem. D) vacualización (v) del citoplasma y granulaciones (g) de las hifas de Pc, y E) hifas deformes y con apariencia de estar vacías al 7º día posterior al encuentro del micelio de ambos microorganismos..... 27

**Figura 7.** Pruebas de la interacción micelial entre *Saccharicola* sp.-*R. solani* (A-Rs). A) hundimientos (h) en la hifa de Rs formados en los sitios de contacto con el micelio de *Saccharicola* sp. a las 24 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem) y B) hifa de Rs deforme y de coloración menos intensa a las 96 hpem. ....28

**Figura 8.** Pruebas de la interacción micelial entre *Saccharicola* sp.-*P. capsici* (A-Pc). A) enrollamiento de *Saccharicola* sp. en la hifa de Pc. y B) Formación de estructuras (e) en forma de anclaje de *Saccharicola* sp. sobre el micelio de Pc. ....29

## I. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos agrícolas más importantes de México (Castro-Rocha *et al.*, 2012) y es un componente básico de la dieta de la población (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). En México los estados con mayor superficie sembrada y producción son: Zacatecas, Chihuahua, Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Sonora y Tamaulipas (SIAP, 2014). De acuerdo al Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el 2014 la superficie sembrada de chile verde (temporal y riego) fue de 148,968.51 ha con un rendimiento promedio nacional de 19.05 t/ha constituyendo un valor estimado de más de 17 millones de pesos. Sin embargo, de la superficie sembrada solo se cosecharon 143,465.17 ha, debido a diferentes causas, entre ellas el ataque por fitopatógenos como los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn, *Pythium* spp., *Fusarium oxysporum* y el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). Este último es considerado como el patógeno más devastador, capaz de infectar tanto las raíces como la parte aérea (Ristaino, 1991; Hwang y Kim, 1995; Ristaino y Johnston, 1999; Bautista-Calles *et al.*, 2014). Ocasiona la enfermedad conocida como marchitez del chile junto con un complejo fúngico en el que recurrentemente se aíslan *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp., limitando el rendimiento y la calidad del producto (Rico-Guerrero *et al.*, 2004; Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). *P. capsici* es uno de los patógenos más importantes del cultivo ya que ocasiona pérdidas en rendimiento de hasta 80% en regiones productoras de México como el Bajío, Aguascalientes, San Luis Potosí, Zacatecas, Nayarit, Jalisco, Puebla, Veracruz y Guanajuato (Guigón-López y González-González, 2007). Como consecuencia algunas regiones productoras importantes han disminuido la superficie de siembra o los campos de cultivo se han desplazado a nuevas áreas (Avelar, 1989; Pernezny *et al.*, 2003). El control está dirigido principalmente contra *P. capsici* mediante prácticas culturales, variedades resistentes y químicos, siendo estos últimos los más ampliamente utilizados (Guigón-López y González-González, 2007; Anaya-López *et al.*, 2011). Sin embargo, los altos costos de producción, la inducción de resistencia y los problemas de contaminación ambiental, obligan a buscar otras alternativas para el manejo de estos patógenos.

Una alternativa de manejo de enfermedades lo constituye el control biológico mediante la introducción de organismos antagónicos (Ait-Lahsen *et al.*, 2001; Bautista-Calles *et al.*, 2010; 2014), que integrado con otros métodos puede ayudar en el manejo efectivo de las enfermedades radicales. Entre los microorganismos más ampliamente utilizados para el control de enfermedades

con origen en el suelo están los hongos como *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. y *Coniothyrium* spp. y bacterias de los géneros *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis*, *B. firmus*, *Agrobacterium* spp. y *Streptomyces* spp. (Ezziyyani *et al.*, 2004; 2006). Sin embargo, en la naturaleza existe una gran diversidad de microorganismos con efectos antagónicos contra fitopatógenos; por ejemplo el hongo *Saccharicola* sp. que produce metabolitos secundarios denominados “poliquétidos” (Chapla *et al.*, 2012), que actúan como antibióticos (eritromicina y tetraciclinas), anticancerígenos (epotilonas), inmunosupresores (rapamicina) y anticolesterémicos (lovastatina) (Kwan y Schulz, 2011; Rojas *et al.*, 2011). El efecto antifúngico de *Saccharicola* sp. contra *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* y *Microbotryum violaceum* fue reportado por Chapla *et al.* (2012). Con un aislamiento de *Saccharicola* sp. obtenido de plantas de tule (*Typha domingensis*) se realizaron ensayos preliminares *in vitro* para probar sus propiedades antimicrobianas (Manuel Silva comunicación personal). Con base en lo anterior se consideró relevante investigar qué potencial tiene el hongo *Saccharicola* sp. como antagonista de patógenos de la raíz que causan las mayores pérdidas en Chile. Así el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antagónico de *Saccharicola* sp. contra *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* en condiciones *in vitro* e invernadero.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### El cultivo de chile

El centro de origen y domesticación del chile (*Capsicum annuum*) es Mesoamérica, fue introducido a España y de ahí se dispersó a Europa, Asia y África convirtiéndose en un cultivo de carácter mundial (Ramírez, 1996). El chile es una planta herbácea que llega a medir hasta 1 m, presenta raíz pivotante, que posteriormente desarrolla un sistema radical lateral ramificado, el tallo es glabro, erecto con ramas dicotómicas que le dan aspecto umbelífero. Las hojas son simples, alternas, con simetría bilateral, glabras o esparcidamente pubescentes, generalmente ovadas hasta de 10 cm o más de largo. Flores hermafroditas, solitarias en las axilas foliares; pedicelos erectos en floración y en el fruto erectos o péndulos, androceo libre y cada antera con dos sacos polínicos, ovario con óvulos dispuestos en forma axilar sobre la placenta, a menudo agrandados hasta de 4 cm o más de largo con 4 mm o más de diámetro; cáliz dentado y gamosépalo, con corola blanca de 1-1.5 cm de ancho. El fruto es una baya con pericarpio carnoso que envuelve a varios carpelos donde se desarrollan las venas (Nee, 1986).

### Taxonomía

Clasificación del chile de acuerdo al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Reino: Viridiplantae

Phylum: Streptophyta

Subclase: Asterids

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Subfamilia: Solanoideae

Tribu: Capsiceae

Género: *Capsicum*

Especie: *C. annum*

## Importancia económica en México

El chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes en México (Castro-Rocha *et al.*, 2012; Salazar-Jara y Juárez-López, 2013), ocupa el sexto lugar de mayor valor generado con más de 17 millones de pesos anuales (SIAP, 2014), siendo las principales regiones productoras norte y noreste que comprenden los estados de Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Nayarit, Durango, Baja California, Baja California Sur y Sur de Tamaulipas, además de la región centro o bajío que comprende los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Puebla, San Luis Potosí, Zacatecas y Querétaro y la región sur y sureste que comprenden los estados de Veracruz, Oaxaca, Campeche y Quintana Roo (Caro-Encalada *et al.*, 2014). De acuerdo al SIAP (2014) los principales estados productores y con mayor superficie sembrada son: Zacatecas, Chihuahua, San Luis Potosí, Sinaloa y Michoacán (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Principales estados productores de chile verde en México (SIAP, 2014).

Estado	Superficie sembrada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Zacatecas	33,132.90	295,119.90	8.95
Chihuahua	30,823.74	722,708.61	24.32
San Luis Potosí	15,011.50	169,230.18	11.54
Sinaloa	12,657.24	604,773.60	50.44
Michoacán	7,014.00	154,838.80	28.08

## Principales enfermedades del cultivo de chile

En México el cultivo de chile es afectado por diversos patógenos causantes de siniestros parciales o totales (Avelar, 1989), dentro de estos se encuentran: hongos, bacterias, virus, oomicetos y nematodos cuyos daños pueden variar de acuerdo a la región en la que se ubique el cultivo (Guigón-López y González-González, 2001), como consecuencia, algunas regiones productoras han disminuido su superficie de siembra o se han desplazado hacia nuevas áreas (Avelar, 1989).

Entre los patógenos que atacan al cultivo de chile se encuentra: el virus del mosaico del pepino (CMV), virus Y de la papa (PVY), virus X de la papa (PVX), virus del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus jaspeado del tabaco (TEV), virus del mosaico

de tomate (ToMV), virus de la marchitez manchada del tomate (TsWV) y el virus del moteado del chile (PepMoV), entre otros (Velásquez-Valles *et al.*, 2013). Las enfermedades bacterianas que se reportan son: la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoria*), cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* sub. *michiganensis*), pudrición blanda (*Erwinia carotovora* sub. *carotovora*), marchitez (*Ralstonia solanacearum*) (Álvarez-Zamorano, 2004). Entre los hongos y oomicetos destacan los que ocasionan: damping-off (*Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp.), pudrición de frutos (*Alternaria solani*, *A. alternata*, *Phytophthora capsici*), marchitez (*Phytophthora capsici*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* spp.), mancha gris (*Stemphylium solani*) y manchas foliares (*Cercospora capsici*, *Alternaria* sp. y *Oidiopsis*) (Guigón-López y González-González, 2001; Velásquez-Valles *et al.*, 2001; 2013).

### **Marchitez del chile**

La marchitez del chile es considerada la enfermedad más devastadora del chile a nivel mundial (Ristaino y Johnston, 1999; Mojica-Marín *et al.*, 2009; Bautista-Calles *et al.*, 2014). Es causada por un complejo fúngico en el que recurrentemente se aíslan *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. (Guigón-López y González-González, 2001; Escalona *et al.*, 2006; Pescador-Flores *et al.*, 2006), su presencia se ha reportado en todos los estados productores de chile en México (Guigón-López y González-González, 2001) ocasionando pérdidas a nivel nacional entre 10 y 60%, mientras que en la zona del Bajío y Puebla pueden alcanzar 100% (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Rico-Guerrero *et al.*, 2004; Ramos-Sandoval *et al.*, 2010).

Aunque la marchitez es causada por un complejo fúngico, el oomiceto *P. capsici* se considera uno de los patógenos más importantes ya que puede permanecer latente en el suelo durante varios años (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2004). Fue descrito por Leonian en 1922 como agente causal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) en Nuevo México. En México fue reportado por primera vez por el servicio de cuarentenas de EE.UU. en 1944 en chiles para exportación. Sin embargo fue hasta 1960 cuando Galindo confirmó la presencia del patógeno (Palazón y Palazón 1989). Actualmente se ha reportado en todos los estados productores de chile en México como: Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (García *et al.*, 2000; Guigón-López y González-González, 2001), en donde ocasiona pérdidas de 60 hasta 100 % (Rico-Guerrero *et al.*, 2004; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2004).

*al.*, 2004). *P. capsici* se distribuye mundialmente causando enfermedades en especies vegetales tanto en regiones templadas como tropicales (Castro-Rocha *et al.*, 2012). Presenta dos tipos de reproducción: sexual y asexual. Es heterotálica y para la reproducción sexual es necesaria la presencia de los dos tipos de compatibilidad sexual conocidos como A1 y A2. Estos son tipos compatibles y no corresponden a formas de dimorfismo (Bowers y Mitchell, 1990; Ristaino y Johnston, 1999; Ristaino y Gumperts, 2000).

Produce un gametangio masculino (anteridio) y uno femenino (oogonio). El anteridio es anférgino, con pared delgada. El oogonio se caracteriza por ser esférico, y usualmente se encuentran en el ápice de una hifa (Ristaino y Gumperts, 2000; Castro-Rocha *et al.*, 2012). La meiosis se produce dentro de los gametangios, la plasmogamia y cariogamia resultan en la formación de oosporas pleróticas que pueden germinar a través de un tubo germinativo o por esporangios (Ristaino y Johnston, 1999).

Se reproduce asexualmente a través de esporangios producidos en esporangióforos ramificados. Los esporangióforos se encuentran en un simpodio simple. Los esporangios son generalmente ovoides o elipsoides, con bases redondeadas; sin embargo pueden presentarse formas irregulares, pedicelos laterales y papilas múltiples. El tamaño de los esporangios es de aproximadamente 57 x 32  $\mu\text{m}$  con una relación de largo por ancho cerca de 1.8. Los esporangios germinan directamente bajo condiciones de alta humedad y temperatura y liberan zoosporas biflageladas móviles (Ristaino y Johnston, 1999; Castro-Rocha *et al.*, 2012).

*Phytophthora capsici* afecta a diversas especies de solanáceas y cucurbitáceas (Babadoost, 2004). En 1996, Erwin y Ribeiro reportaron a 49 especies de plantas que pueden ser infectadas por *P. capsici*, entre las que se encuentran: chile (*Capsicum annum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*), sandía (*Citrullus lanatus*), calabacita (*Cucurbita pepo*), calabaza (*Cucurbita máxima*), alfalfa (*Medicago sativa*), melón (*Cucumis melo*), pimienta negra (*Piper nigrum*) y berenjena (*Solanum melongena*). Otras especies afectadas son: *Beta vulgaris* (betabel), *Beta vulgaris* var. *cicla* (acelga), *Phaseolus lunatus* (haba de lima), *Brassica rapa* (nabo), y *Spinacia olerace* (espinaca) (Ristaino y Johnston, 1999; French-Monar *et al.*, 2006).

*Phytophthora capsici* puede causar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo (Foster y Hausbeck, 2010). Los síntomas iniciales en raíz son necrosamiento y pudrición

de raíces secundarias y terciarias; posteriormente de los haces vasculares. Las plantas enfermas presentan una banda parda oscura que ciñe el cuello, debido a esto, las plantas se marchitan y mueren. En las hojas y ramas se presentan tizones de color verde amarillento que posteriormente se convierten de color café. En frutos se desarrollan manchas acuosas cubiertas por micelio del oomiceto. Los frutos permanecen adheridos a la planta. Las semillas también son afectadas ya que al abrir el fruto se observa micelio sobre las semillas podridas (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Velásquez-Valle *et al.*, 2001). Estos síntomas varían en función de las condiciones de susceptibilidad del cultivo, la estructura infectada de la planta y las condiciones ambientales (Bautista-Calles *et al.*, 2014).

### **Control biológico**

El control biológico involucra el uso de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas a densidades menores, ya sea de forma temporal o permanente (Van-Driesche *et al.*, 2007), consiste en la utilización de microorganismos naturales o modificados para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de microorganismos beneficiosos para la planta (Ezziyyani *et al.*, 2006). Cook y Baker (1989) definen el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo, exclusión del hospedante y supresión o desplazamiento del patógeno después de la infección. El control biológico puede darse entre cepas (individuos de un mismo género y especie con algunas modificaciones genéticas) o entre especies (individuos de diferentes especies) (Martínez, 2001).

Los componentes del control biológico de acuerdo con Cook y Baker (1989) son: el patógeno, el hospedante, el ambiente y los microorganismos antagonistas. La población de hospedantes que se encuentran en el ambiente natural forma parte de la estrategia de control biológico ya que ésta se encarga de mantener el balance natural del suelo, suprimiendo a los patógenos la mayoría de las veces (Baker y Cook, 1982). Además de la regulación del inóculo y proporcionar sitios para el establecimiento y acción de uno o más antagonistas (Cook y Baker, 1989). Por su parte el ambiente está involucrado indirectamente en el control biológico. La directa inhibición o muerte del patógeno causado por altas y bajas temperaturas, radiación ultravioleta, pH alto o bajo y toxicidad del suelo es parte del control, pero no califica como control biológico a menos que: 1) el entorno desfavorable para el patógeno sea producido por el hospedante o el antagonista y 2) el control del

patógeno es el resultado del antagonismo o de la resistencia del hospedante favorecido por ambiente (Cook y Baker, 1989).

Los antagonistas son agentes biológicos con potencial de interferir en el ciclo de vida de un patógeno. Pueden ser: hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus y viroides (Cook y Baker, 1989).

Entre los microorganismos más ampliamente utilizados para el control de enfermedades con origen en el suelo se encuentran los hongos *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Coniothyrium* spp. y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium* y *Streptomyces* (Ezziyani *et al.*, 2004; 2006). Estos microorganismos contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación por lo que presentan diferentes mecanismos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador (Infante *et al.*, 2009). Por otra parte, se encuentran los microorganismos endófitos que permanecen parte o todo el ciclo de su vida dentro de la planta sin causar síntomas aparentes (Wilson, 1995; Leme *et al.*, 2013; Martin y Dombrowski, 2015). Actualmente hongos, bacterias, actinomicetos y fitoplasmas se han descrito como endófitos. Esos microorganismos, en los últimos 20 años han recibido especial atención ya que tienen la capacidad de proteger a su hospedante contra insectos y patógenos además, de producir metabolitos secundarios (Chapla *et al.*, 2012; Chapla *et al.*, 2013).

## *Saccharicola* sp.

### **Antecedentes del género**

El género fue propuesto por Eriksson y Hawksworth en 2003 a partir de un aislamiento identificado como *Leptosphaeria bicolor* agente causal de la quemadura de la hoja del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Kenia (Kaiser *et al.*, 1979). El género surgió al reclasificar dos aislamientos identificados como *Leptosphaeria bicolor* y *L. taiwanensis* a *Saccharicola bicolor* y *S. taiwanensis* respectivamente.

### **Taxonomía**

Clasificación de acuerdo al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Superreino: Eukaryota

Reino: Streptophyta

Subreino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Sub phylum: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Suborden: Massarineae

Familia: Masarinaceae

Género: *Saccharicola*

### **Características morfológicas**

*Saccharicola* sp. produce picnidios inmersos en el tejido del hospedante, subglobosos a ligeramente aplanados de 360-380 µm de diámetro con ostiolo central ligeramente papilado de 18-20 µm. Las paredes del picnidio están compuestas de 3 a 6 capas de células pseudoparenquimatosas siendo las exteriores de color negro, las intermedias de color marrón y las interiores de color marrón claro. En las paredes del interior se observan células conidiogénicas de 4-6 µm de alto y de ancho, aplanadas en el ápice, mamiliformes y hialinas. Los conidios son

producidos en un arreglo tipo uniseriado, en dirección al ostiolo, son elipsoidales con extremos ligeramente truncados, paredes lisas, con 3-4 septos gutulados de (38-) 43-49 (-54) x 7-9 (-10)  $\mu\text{m}$  x 7-9 (-10)  $\mu\text{m}$  (Kaiser *et al.*, 1979; Eriksson y Hawksworth, 2013; Silva-Valenzuela, 2015). En la fase sexual produce pseudotecios inmersos en el tejido muerto (hoja) de la planta, subglobosos de 175-220  $\mu\text{m}$  de ancho x 125-175 de alto. Ostiolo papilado. Pseudoparafisis hialino, filiforme, septado y ramificado. Paredes compuestas por células pseudoparenquimatosas de color marrón oscuro. Ascas sub-cilíndricas a elongadas, bitunicadas surgiendo en la base de la cavidad ascomatal, pediceladas de 110-150 x 20-30  $\mu\text{m}$ , con 8 ascosporas fusiformes a elipsoidales con 1-3 septos. Las ascosporas son hialinas a marrón claro dentro de las ascas y de color marrón mediano después de la liberación, la penúltima célula es color marrón oscuro y es más larga que las otras células, por lo general de 28-42 x 8-12  $\mu\text{m}$  (Punithalingam, 1983; Kaiser *et al.*, 1979; Eriksson y Hawksworth, 2003).

### **Biología y ciclo de vida**

No es claro como ocurre la infección de manera natural y poco se conoce de los factores que favorecen la infección, dispersión y sobrevivencia del patógeno en campo. En un ensayo realizado por Kaiser *et al.* (1979) demostraron que los síntomas aparecen en hojas de caña (*Saccharum officinarum*) en forma de pequeñas lesiones de 0.5-3 x 0.3-1 mm de color rojo a marrón oscuro con un halo clorótico. Con el progreso de la infección el centro de las lesiones adquiere un color paja mientras que el margen color pardo-rojizo. Las lesiones posteriormente se convierten en rayas fusiformes que se unen llegando a medir 14 cm o más. En estados avanzados de la infección se forman los picnidios dentro de las áreas lesionadas de la hoja y en casos severos en toda la hoja excepto en la nervadura central que permanece verde. La enfermedad es más severa en hojas viejas que en hojas jóvenes y durante la estación seca puede causar pérdidas considerables.

La temperatura óptima para la germinación de los conidios es de 20-25 °C y para el crecimiento micelial de 28 °C. Los conidios germinan formando un tubo germinativo, posteriormente se forman los apresorios que penetran por los estomas en el tejido del hospedante. El hongo puede permanecer viable en las hojas infectadas durante meses.

### **Potencial antagónico de *Saccharicola* sp.**

Diferentes autores han evaluado el potencial antagónico *in vitro* de *Saccharicola* sp. Chapla *et al.* (2012) evaluaron una cepa de *Saccharicola* sp. aislada de tallo de *Eugenia jambolana* y encontraron que produce sustancias bioactivas con actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., *Cladosporium cladosporioides* y *Microbotryum violaceum*, antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium* y alguicida contra *Chlorella fusca*. Por otro lado, Honório (2013) y Chapla (2014) evaluaron la actividad antifúngica del extracto crudo de *Saccharicola* sp. contra *Cladosporium phaeospermum*.

### **Aislados endófitos de *Saccharicola* sp.**

Los hongos endófitos son de interés biotecnológico porque pueden ser usados en el control biológico de plagas y enfermedades de plantas y en la industria farmacéutica (Alameida *et al.*, 2015). En Brasil Rojas *et al.* (2011) aislaron de hojas de caña de azúcar una cepa endófito de *Saccharicola* sp., Chapla *et al.* (2012), Paganini-Marques (2013), Honório (2013), Honório *et al.* (2013) y Chapla (2014) también aislaron de hojas, tallo y frutos de *E. jambolana* al hongo *Saccharicola*. Leme *et al.* (2013) encontraron a *Saccharicola* como endófito de hojas de caña de azúcar de las variedades RB 855536 y SP 891115 en Brasil. También en Brasil, Alameida *et al.* (2015) aislaron de hojas de *Eichhornia azurea* 13 hongos endófitos, que identificaron mediante técnicas moleculares como: *Fusarium*, *Diaporthe*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Phoma*, *Bipolaris*, *Pestalotiopsis*, *Microsphaeropsis*, *Bipolaris*, *Pestalotiopsis*, *Microsphaeropsis* y *Saccharicola bicolor*. Martin y Dombrowski (2015) colectaron y aislaron hongos endófitos de la corona de la raíz, hojas y tallos de pastos (*Bromus*, *Amophilia*, *Festuca*, *Hordeum*, *Phalaris*, *Agrostis*, *Lolium* y *Descampsia*) de la costa de Oregón e identificaron a *Saccharicola bicolor*. Todos estos autores señalan que los hongos endófitos modifican la fisiología de la planta, además de brindar protección contra plagas, enfermedades y estrés biótico; también mencionan que *Saccharicola* sp. produce sustancias de interés biotecnológico como enzimas, antibióticos, alcaloides y otros compuestos.

## **Importancia industrial de *Saccharicola* sp.**

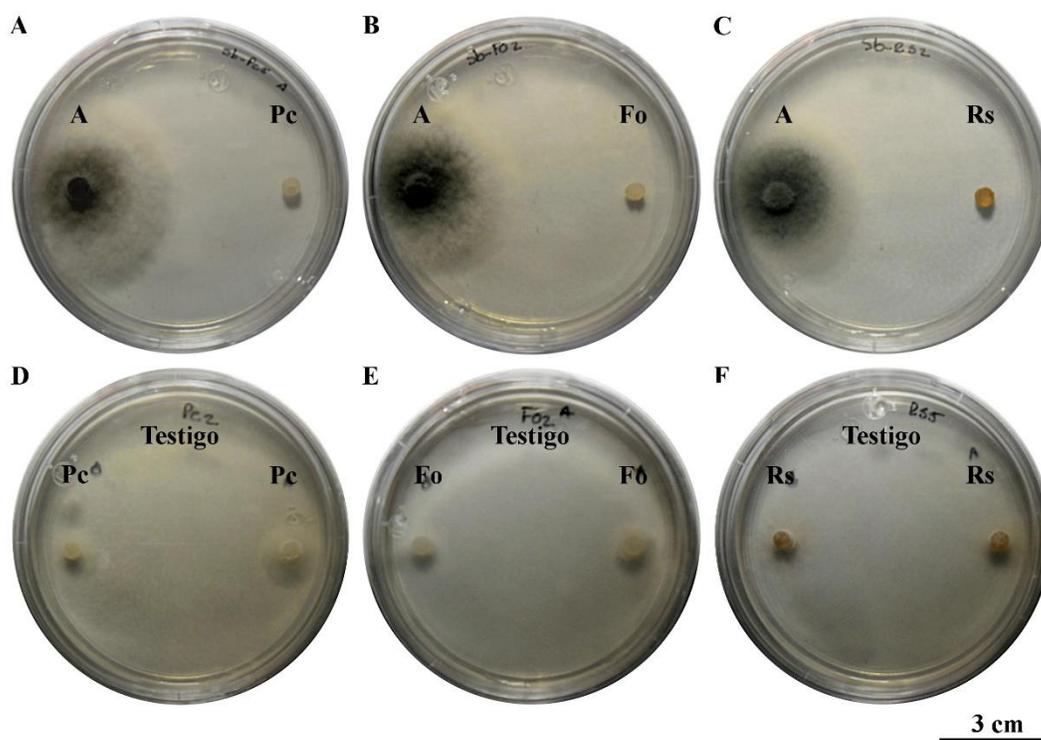
*Saccharicola* sp. representa un recurso con potencial de uso en la industria, medicina y agricultura. Rojas *et al.* (2011) aislaron de caña de azúcar, una cepa endófito de *Saccharicola* sp. en la que se detectaron genes asociados a la producción de metabolitos secundarios denominados poliquétidos. Estos compuestos poseen diversas funciones y estructura química, su biosíntesis es catalizada por poliquétidos sintasas (PKSs). Los poliquétidos son utilizados en medicina humana y animal como agentes terapéuticos con actividad antibiótica (eritromicina y tetraciclinas), anticancerígena (epotilonas), inmunosupresora (rapamicina), anticolesterémica (lovastatina y estatinas), antiparasitaria (avermectina) y antitumoral (daunorubicina y doxorubicina); también tienen aplicación en la agricultura e industria, algunos con alto valor comercial (Cox, 2007; Hertweck, 2009; Kwan y Schulz, 2011). Por otro lado Paganini-Marques (2013) y Paganini-Marques *et al.* (2014) encontraron que en fermentación en estado sólido en bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo (1:1), la cepa *Saccharicola* sp., aislada de tallo de *Eugenia jambolana* produce celulasas (endoglucanasas,  $\beta$ -glicosidasa y Fpsa), xilanasas ( $\beta$ -xilosidasa), amilasas y pectinasas (exopoligalacturanasas), enzimas degradadoras de material vegetal con uso potencial en el proceso de sacarificación del bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol. Estas enzimas son empleadas en la industria textilera, alimenticia y papelera (Vilchez, 2002). Asimismo, Araujo *et al.* (2013) y Honório (2013) reportaron siete metabolitos bioactivos obtenidos a partir del extracto crudo de *Saccharicola* sp. aislado de *E. jambolana*. Entre dichos metabolitos se encuentran: 1) ácido 4-hidróxi-3-prenil benzoico 2) ácido 4-hidroxi-3-(3`-metil-3`buten-1`-il)benzoico 3) 2,2-dimetil-2Hcromeno-6-carboxílico, siendo las sustancias 4-7 ciclohexanos oxigenados inéditos. Borges (2016) consigna cinco sustancias bioactivas obtenidas a partir del extracto crudo de *Saccharicola* sp., entre las que se encuentran: 1) ácido fusárico, micotoxina producida por *Fusarium* sp. (Diniz y Oliveira, 2009) que inhibe la dopamina  $\beta$  hidroxilasa, enzima responsable de la conversión de dopamina en noradrenalina y se ha empleado como antihipertensivo en el tratamiento de algunas disquinesias (Velazco-Martín y Álvarez-González, 1988); 2) 6,7 dihidroxi-4,6 dimetil octanoato, sustancia inédita; 3) 4-hidroximeleina; 4) timidina; y 5) adenosina. Se menciona que las sustancias producidas por *Saccharicola* sp. probablemente protejan a la planta contra plagas y enfermedades y estrés abiótico, además, de promover el crecimiento de la planta. Por otro lado, Fang-Sim *et al.* (2015) aislaron de hojas de *Phragmites* 21 hongos endófitos, de los

cuales, tres (*Trichoderma asperellum*, *Phomopsis* sp. y *Saccharicola bicolor*) mostraron gran potencial en tolerancia y eliminación de materiales pesados de aguas residuales. Estos autores concluyen que los hongos endófitos son potenciales bioabsorbentes para la eliminación de metales pesados en aguas residuales.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Pruebas de antagonismo *in vitro*

*Saccharicola* sp. (A), *Phytophthora capsici* (Pc), *Fusarium oxysporum* (Fo) y *Rhizoctonia solani* (Rs) se crecieron en IPAA (Infusión-papa, azúcar y agar) e incubaron en oscuridad a  $27\pm 1$  °C y una vez que crecieron se realizaron confrontaciones duales para evaluar el efecto antagónico de *Saccharicola* sp. Se estableció un ensayo con siete tratamientos: 1) Antagonista-*Phytophthora capsici* (A-Pc), 2) Antagonista-*Fusarium oxysporum* (A-Fo), 3) Antagonista-*Rhizoctonia solani* (A-Rs), 4) Testigo antagonista (A), 5) Testigo *Phytophthora capsici* (Pc), 6) Testigo *Fusarium oxysporum* (Fo) y 7) Testigo *Rhizoctonia solani* (Rs). Cada tratamiento constó de 10 repeticiones.



**Figura 1.** Confrontaciones duales para evaluar el efecto antagónico de *Saccharicola* sp. (A) sobre *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs). A) Antagonista-Pc, B) Antagonista-Fo, C) Antagonista-Rs, D) Testigo Pc, E) Testigo Fo y F) Testigo Rs.

En cada caja Petri de 90 mm de diámetro conteniendo IPAA se colocó, a 1 cm de la periferia, un cilindro de 5 mm de diámetro con micelio del antagonista y se mantuvieron en oscuridad a  $27\pm 1$  °C. Cuatro días después, se colocó, en el extremo opuesto de la caja, un cilindro de IPAA de 5

mm conteniendo micelio de Pc, Fo o Rs, y en las cajas de los testigos se colocó en cada extremo un cilindro de Pc, Fo o Rs (Figura 1). Las cajas se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas.

El crecimiento micelial en los diferentes tratamientos se midió en cm cada 24 h y se registró para cada uno el número de días en que entraban en contacto las hifas de los aislamientos confrontados; cuando los micelios de ambos (antagonista y patógeno) estuvieron en contacto se calculó el porcentaje de reducción de crecimiento del fitopatógeno, con la fórmula propuesta por Sid-Ahmed *et al.* (1999). Considerando el promedio de crecimiento en cm de los patógenos en las cajas testigo, así como el promedio de crecimiento en la confrontación dual.

$$I= 100-(100(C2)/C1)$$

Dónde:

I= Inhibición (reducción) del crecimiento micelial

C1= Crecimiento en cm del patógeno en la caja testigo

C2= Crecimiento en cm del patógeno en cultivo dual

Las cajas se mantuvieron en observación durante 30 días para registrar el número de días en que el antagonista crecía sobre el micelio de los patógenos. También se evaluó la viabilidad del micelio de los fitopatógenos confrontados con el antagonista cuando éste creció sobre la colonia de los patógenos; para *P. capsici* esto ocurrió a los 21 días posteriores a la confrontación (dpc) y a los 30 para *F. oxysporum* y *R. solani*. Una vez que el antagonista creció sobre la colonia de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* se tomaron, de cinco cajas Petri de cada tratamiento, tres cilindros de medio con crecimiento micelial del fitopatógeno invadido y se sembraron en IPAA para determinar si el micelio de Pc, Fo y Rs permanecía viable. Después de la siembra se realizaron observaciones cada 24 h durante 5 días para determinar si crecía el fitopatógeno. Con la finalidad de conocer el efecto del antagonista sobre la producción de propágulos (esporas o zoosporas) del fitopatógeno a los 21 dpc para *P. capsici* y a los 30 para *F. oxysporum*. Para el caso de *F. oxysporum*, de cinco cajas de los tratamientos A-Fo y del correspondiente testigo (Fo) se tomaron de cada caja tres cilindros de 5 mm de diámetro con micelio del lado de crecimiento del patógeno y se colocaron en tubos (Sarstedt®) con 5 ml de agua destilada estéril, se agitaron y con una micropipeta se tomaron 200

µl de la suspensión y se realizó el conteo de microconidios con la ayuda de un hematocitómetro (Marienfeld®).

Para *P. capsici*, de cada una de cinco cajas Petri se tomaron tres cilindros de 1 cm de diámetro de medio con crecimiento micelial, se colocaron en cajas de 50 mm de diámetro conteniendo agua destilada estéril y se incubaron a  $27\pm 1$  °C durante 48 h con luz blanca para inducir la formación de esporangios. Transcurrido este tiempo y con la finalidad de inducir la liberación de zoosporas las cajas se mantuvieron a 10 °C durante 20 min y después a  $27\pm 1$  °C durante 1 h. Enseguida se realizaron observaciones bajo el microscopio estereoscópico para registrar la abundancia relativa de zoosporas con respecto al testigo.

### **Interacción micelial de *Saccharicola* sp.-*P. capsici* y *Saccharicola* sp.-*R. solani***

Para conocer si el antagonista *Saccharicola* sp., parasita el micelio de *P. capsici* y *R. solani* se realizaron microcultivos de acuerdo a la técnica descrita por Riddell (1950) con algunas modificaciones. El experimento constó de cinco tratamientos y cada 24 h durante 15 días se realizaron observaciones en cuatro repeticiones de cada tratamiento, teniendo un total de 60 cajas Petri para cada tratamiento. Los tratamientos evaluados fueron: 1) Antagonista-*P. capsici* 6143 (A-Pc); 2) Antagonista-*R. solani* (A-Rs); 3) testigo antagonista; 4) testigo Pc; y 5) testigo Rs. Para *F. oxysporum* no se realizaron estas pruebas debido a que a nivel microscópico tanto el micelio del patógeno como del antagonista tienen aspectos similares en septación y diámetro de micelio, lo que dificultaba realizar las observaciones correspondientes.

En cajas Petri con IPAA se sembraron a 1 cm de la periferia de la caja discos de 5 mm con micelio del antagonista. Con una pinza estéril se tomó un cubreobjetos de 18x18 mm previamente esterilizado y se colocó en la parte media de cada caja. Después de 72 y 96 h, en el otro extremo de la caja se colocó un disco de 5 mm a 1 cm de distancia con micelio de Pc o Rs. En todos los casos las cajas se mantuvieron en oscuridad a  $27\pm 1$  °C. En los testigos se procedió de la misma manera.

Cada 24 h durante 15 días se realizaron observaciones de los cubreobjetos en cuatro repeticiones de cada tratamiento, una vez que los micelios de ambos microorganismos se encontraron en la parte media del cubreobjetos, éste se retiró del medio de cultivo con una navaja estéril, se colocó

en un portaobjetos en una gota de azul de algodón y se observó a 100 X en microscopio compuesto OLYMPUS® CX31.

### **Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

En cajas Petri con IPAA se sembraron a 1 cm de la periferia de la caja discos de 5 mm con micelio del antagonista. Con una pinza estéril se tomó un cubreobjetos de 18x18 mm previamente esterilizado y se colocó en la parte media de cada caja. Después de 72 y 96 h, en el otro extremo de la caja se colocó un disco de 5 mm a 1cm de distancia con micelio de Pc o Rs. En todos los casos las cajas se mantuvieron en oscuridad a  $27\pm 1$  °C. En los testigos se procedió de la misma manera.

Cada 24 h durante 10 días se realizaron observaciones de los cubreobjetos en tres repeticiones de cada tratamiento, una vez que los micelios de ambos microorganismos se encontraron en la parte media del cubreobjetos, éste se retiró del medio de cultivo con una navaja estéril, se colocó en un portaobjetos en una gota de azul de algodón y se observó a 100 X en microscopio compuesto. Una vez que se observó el enrollamiento de las hifas de *Saccharicola* sp. alrededor de las hifas de *P. capsici*, las muestras se mandaron para su análisis a la Red de Estudios Moleculares Avanzados del Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic®, Xalapa, Veracruz, México.

### **Ensayo para determinar si *Saccharicola* sp. se establece como endófito en plantas de chile jalapeño**

Para conocer si *Saccharicola* sp. se establece como endófito en las plantas de chile jalapeño, se realizó un ensayo en sustrato estéril en el que se probaron dos tratamientos bajo un diseño de bloques al azar con 10 repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron: 1) Antagonista (A) y 2) Testigo (T).

Semillas de chile jalapeño variedad “M” se desinfectaron con la metodología descrita por Bernardi-Wenzel *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Semillas de chile jalapeño se lavaron con Tritón X100 al 0.1% durante 3 min, seguidamente se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial a 3% por 3 min, en etanol a 70% durante 1 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Inmediatamente se tomó 200 µl del agua del último lavado y se vertió en cajas con IPAA + ácido láctico. Las semillas del tratamiento que involucró al antagonista se introdujeron durante 24 h en

una suspensión de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (ufc) de *Saccharicola* sp. y las semillas correspondientes al testigo en agua de la llave estéril. Las semillas se colocaron en sanitas estériles y se pusieron a germinar en oscuridad a  $27 \pm 1$  °C durante 10 días.

Las plántulas se transfirieron a macetas de polipropileno conteniendo 10 g de una mezcla de peat moss y agrolita (2:1) previamente esterilizada a 65°C y 20 lb de presión en dos ocasiones. A las plántulas del tratamiento con el antagonista se les aplicó una suspensión de  $1 \times 10^8$  ufc (10 ml/plántula) inmediatamente después de transferirlas a las macetas. Las macetas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 14 h luz y 10 oscuridad a  $25 \pm 1$ °C.

Dos semanas después de la aplicación del antagonista, cinco repeticiones de cada tratamiento se utilizaron para re-aislar e identificar al antagonista. De cada una de las cinco plantas de cada tratamiento se cortaron fragmentos de hoja, tallo y raíz y se desinfestaron con la metodología antes descrita (Bernardi-Wenzel *et al.*, 2010), se sembraron en cajas con IPAA + ácido láctico y éstas se incubaron a  $27 \pm 1$ °C. Una vez que se observó desarrollo de micelio y con la finalidad de corroborar si correspondía a *Saccharicola* sp. se tomaron muestras con una aguja de disección y se montaron en portaobjetos conteniendo azul de algodón para observarlos con un microscopio óptico.

## **Pruebas de antagonismo en invernadero**

### **Tratamientos**

Se estableció un ensayo en suelo proveniente de campo colectado de una parcela naturalmente infestada con *P. capsici*. Una parte se esterilizó (SE) en autoclave a 65°C y 20 lb de presión en dos ocasiones, cada una durante 2 h y se ventiló durante 7 días. Otra parte del suelo permaneció sin esterilizar (SN). Se probaron 11 tratamientos bajo un diseño de bloques al azar con 10 macetas (cada una con una planta de chile jalapeño variedad “M”) cada uno. Los tratamientos fueron: 1) Testigo (SE-T), 2) SE-Antagonista (SE-A), 3) SE-*P. capsici* (SE-Pc), 4) SE-Antagonista-*P. capsici* (SE-A-Pc), 5) SE-*F. oxysporum* (SE-Fo), 6) SE-Antagonista-*F. oxysporum* (SE-A-Fo), 7) SE-*R. solani* (SE-Rs), 8) SE-Antagonista-*R. solani* (SE-A-Rs), 9) SE-Antagonista-*P. capsici*-*F. oxysporum*-*R. solani* (SE-A-Pc-Fo-Rs), 10) SN-*P. capsici*-*F. oxysporum*-*R. solani* (SN-Pc-Fo-Rs) y 11) SN-Antagonista-*P. capsici*-*F. oxysporum*-*R. solani* (SN-A-Pc-Fo-Rs). Como referencia de la patogenicidad de la cepa de *P. capsici* utilizada se establecieron también plantas testigo de chile

de la variedad “Yollow wonder”, catalogado como altamente susceptible al oomiceto. El ensayo se realizó en macetas de polietileno conteniendo 500 g de suelo. El ensayo se repitió una vez más

### **Germinación de semillas**

Semillas de chile jalapeño variedad “M” y “Yollow wonder” se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial a 2% por 3 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas de los tratamientos que involucraron al antagonista se introdujeron durante 24 h en una suspensión de  $1 \times 10^8$  ufc de *Saccharicola* sp., las de los demás tratamientos se mantuvieron en agua de la llave estéril. Las semillas se colocaron en sanitas estériles y se pusieron a germinar en oscuridad a  $27 \pm 1$  °C durante 11 días.

Las plántulas se transfirieron a charolas de poliestireno conteniendo una mezcla de peat moss y agrolita (2:1) previamente esterilizada. A las plántulas correspondientes a los tratamientos con el antagonista se les aplicó una suspensión de  $1 \times 10^8$  ufc (10 ml/plántula) inmediatamente después de transferirlas a las charolas. Las charolas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 14 h luz y 10 oscuridad a  $25 \pm 1$  °C hasta que las plántulas desarrollaron el primer par de hojas verdaderas.

### **Preparación del inóculo del antagonista y patógenos e inoculación**

El inóculo del antagonista y de *R. solani* se preparó en frascos Erlenmeyer de 500 ml conteniendo Infusión Papa Azúcar (IPA). Los frascos se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 min. Cinco cilindros de 5 mm de diámetro del antagonista o de *R. solani* se transfirieron asépticamente en los frascos y se mantuvieron por 10 días en una incubadora con agitación LAB-LINE® a 110 revoluciones por minuto (rpm), se retiró el micelio de los frascos y se molió por separado en una licuadora. De cajas Petri con micelio de *F. oxysporum* o *P. capsici*, se tomaron cilindros de 5 mm de diámetro y se sembraron en IPAA y en jugo V8 agar (V8A), respectivamente, enseguida se incubaron en oscuridad a  $27 \pm 1$  °C. Después de 7 días, sobre las cajas con *P. capsici* se vertieron 10 ml de solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9% (Pisa®), enseguida se retiró la solución y con una aguja de disección se dividió el medio en seis fragmentos.

Cada fragmento se transfirió a una caja Petri conteniendo 10 ml de agua de la llave estéril. Las cajas se mantuvieron durante 48 h en luz a 26° C y 48 en oscuridad a 28 h °C. Transcurrido este

tiempo, se colocaron a 4 °C durante 20 min y después a 27±1 °C durante 1 h para inducir la liberación de zoosporas. El número de propágulos del antagonista y patógenos se cuantificó en un hematocitómetro y se ajustó la densidad de inóculo a 1x10<sup>8</sup> para el antagonista, 1x10<sup>7</sup> ufc para *F. oxysporum* y *P. capsici*; para *R. solani* se aplicó 1 g de micelio molido previamente.

La inoculación del antagonista se realizó a las semillas, al momento de pasar las plántulas a charolas y dos aplicaciones de 10 ml a 3 y 1 día antes de transferir las plantas a las macetas e inmediatamente después de trasplantarlas a las macetas. La inoculación de los patógenos se realizó 3 días después de haber inoculado al antagonista. Todas las aplicaciones se realizaron a la base del tallo.

### **Variables evaluadas**

Se registró la incidencia (%) de plantas enfermas y muertas, la severidad, la altura de la planta, el diámetro de la base del tallo y el peso seco de raíz y follaje. Diariamente se realizaron observaciones para registrar las tres primeras variables. La severidad de *P. capsici* se evaluó con la escala numérica propuesta por Morán-Bañuelos *et al.* (2010), donde: 0= hojas y tallos turgentes, 3= hojas inferiores con pérdida de turgencia solamente, 5= hojas medias e inferiores marchitas y punta del tallo con inclinación ligera, 7= hojas marchitas y punta del tallo colgante y 9= Planta muerta. La severidad de *F. oxysporum* se evaluó con la escala de Marlatt *et al.* (1996), donde: 1= planta sin síntoma, 2= planta con clorosis leve y marchitamiento, 3= planta con clorosis moderada y achaparramiento 4= planta con clorosis severa, marchitez y achaparramiento y 5= planta muerta. La severidad de *R. solani* se evaluó con la escala propuesta por Navarrete-Maya (2009), donde: 0= plantas sin síntomas y 4= planta con infección severa marchita o muerta y la severidad de *P. capsici* + *F. oxysporum* + *R. solani* se evaluó con una escala de 0 a 9 donde: 0= hojas y tallos turgentes, 3= planta con clorosis leve y pérdida de turgencia, 5= planta con clorosis moderada, hojas medias e inferiores marchitas, 7= planta con clorosis severa, marchita y con achaparramiento y 9= planta muerta.

Al final del experimento (tres meses después del trasplante), se midió la altura de la planta con una regla milimétrica y el diámetro de la base del tallo con un vernier digital. Seguidamente las raíces se cortaron en la base del tallo. Tanto la parte del follaje como de la raíz se colocaron en bolsas de

papel Kraft y secaron a 60° C en una estufa Felisa® durante 4 días. Cinco plantas de cada tratamiento se tomaron al azar para el registro de peso seco.

### **Análisis estadístico**

Los datos de las variables evaluadas en todos los ensayos se sometieron a la prueba de distribución normal (Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). Para los datos obtenidos en el ensayo de invernadero fue necesario llevar a cabo una transformación logarítmica. Con los datos de cada variable se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), utilizando el paquete SAS versión 9.0 (SAS institute Inc., 2002).

## IV. RESULTADOS

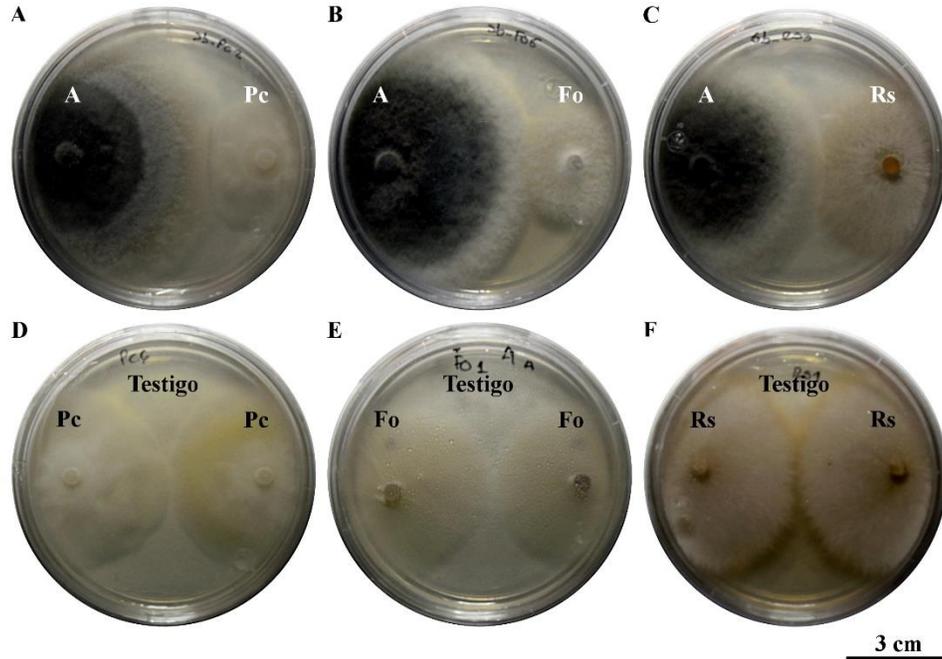
### Pruebas de antagonismo *in vitro*

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp. causó una reducción significativa de 44.8% y 45.1% en el crecimiento micelial de *P. capsici* y *F. oxysporum* a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc), mientras que para *R. solani* la reducción fue de 36.2% a los 2 dpc (Cuadro 2) (Figura 2). A los 21 dpc el antagonista creció sobre la colonia de *P. capsici* y a los 30 dpc sobre la colonia de *F. oxysporum*. En *R. solani* no se observó crecimiento del antagonista sobre él, el crecimiento de ambos llegó a la parte media de la caja a los 30 dpc y ahí se mantuvo; a pesar que el antagonista no invadió al patógeno, fue evidente la ausencia de microesclerocios en la colonia de *R. solani* del lado del cilindro del patógeno, mientras que en ambos cilindros del testigo si se desarrollaron (Figura 3).

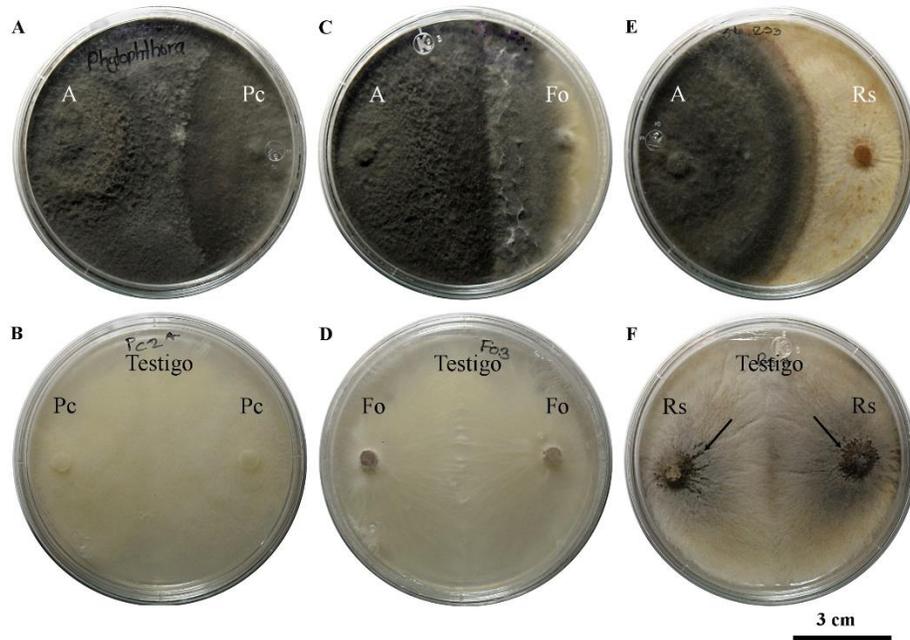
**Cuadro 2.** Efecto de *Saccharicola* sp. (A) sobre el crecimiento micelial de *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) y sobre la producción de esporangios y zoosporas en *P. capsici*.

Tratamiento	Crecimiento en cm a los 2 <sup>o</sup> y 3 <sup>o</sup> dpc	% de reducción del crecimiento a los 2 <sup>o</sup> y 3 <sup>o</sup> dpc	Formación de esporangios a los 21 ddi		Liberación de zoosporas a los 21 ddi	Viabilidad del micelio del patógeno
			Cilindro del lado de <i>P. capsici</i>	Cilindro del lado del antagonista		
Pc-Pc	2.5(±0.11) <sup>‡</sup>		+		+	
A-Pc	1.4(± 1.37) <sup>‡</sup>	44.8 <b>a</b>	++	-	++	SI
Fo-Fo	2.6(±0.08) <sup>‡</sup>					
A-Fo	1.4(±1.32) <sup>‡</sup>	45.1 <b>a</b>				SI
Rs-Rs	3.1(±0.42) <sup>€</sup>					
A-Rs	1.9(±0.77) <sup>€</sup>	36.2 <b>b</b>				SI

dpc= días posteriores a la confrontación, ddi=días después de la invasión del patógeno por el antagonista, Pc-Pc= Testigo *P. capsici*; A-Pc= *Saccharicola* sp.-*P. capsici*; Fo-Fo= Testigo *F. oxysporum*; A-Fo= *Saccharicola* sp.-*F. oxysporum*; Rs-Rs= Testigo *R. solani*; A-Rs= *Saccharicola* sp.-*R. solani*. (-), (+) y (++): denotan la ausencia y presencia escasa y regular de esporangios y zoosporas, respectivamente. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05).

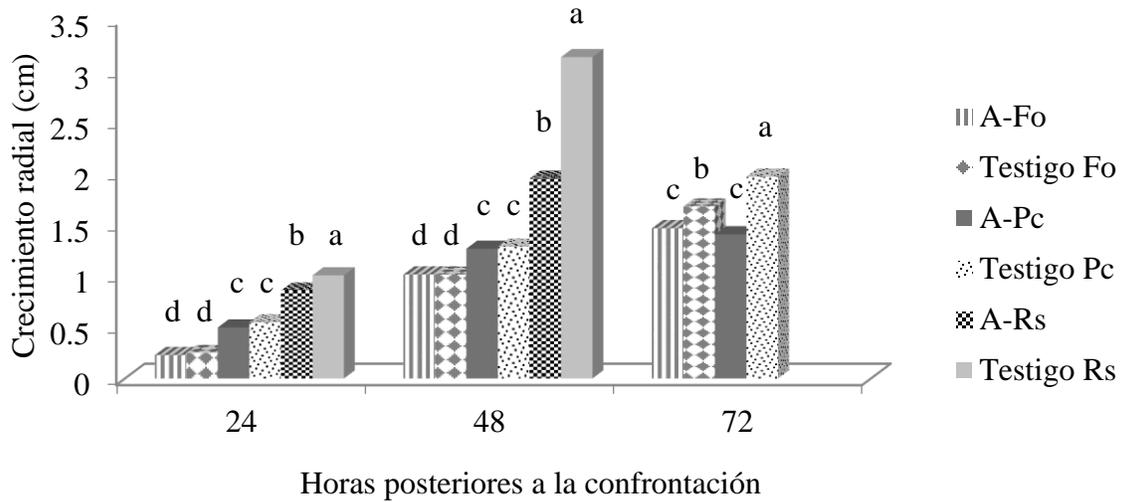


**Figura 2.** Pruebas de antagonismo de *Saccharicola* sp. (A) contra *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) a los 4 días posteriores a la confrontación. A) A-Pc, B) A-Fo, C) A-Rs, D) testigo Pc, E) testigo Fo y F) testigo Rs.



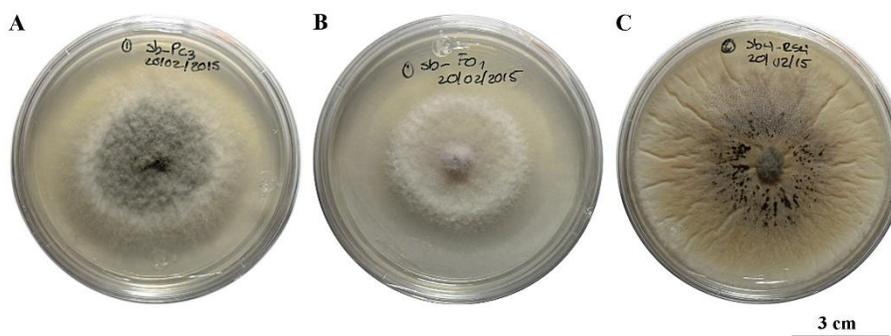
**Figura 3.** Antagonismo de *Saccharicola* sp. (A) contra *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) a los 21 y 30 días posteriores a la confrontación (dpc). A) A-Pc, B) testigo Pc a los 21 dpc, C) A-Fo, D) testigo Fo, E) A-Rs y F) testigo Rs a los 30 dpc con desarrollo de microesclerocios. ↑

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp., causó reducción de crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *P. capsici* a las 72 h posteriores a la confrontación (hpc), en comparación con sus respectivos testigos que presentaron mayor crecimiento, mientras que con *R. solani* la reducción de crecimiento se registró desde las 24 hpc (Figura 4).



**Figura 4.** Promedio de crecimiento radial de *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc) y *R. solani* (Rs) a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la confrontación (hpc) con *Saccharicola* sp. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

A los 3 días después de sembrar (dds) los cilindros con micelio tomados del lado de los patógenos invadidos por el antagonista, se observó el crecimiento de micelio de los patógenos (Cuadro 2) (Figura 5). En los cilindros del tratamiento antagonista-*F. oxysporum* tomados del lado del patógeno se registró menor cantidad de microconidios en comparación con los cilindros del testigo (Cuadro 3). En el tratamiento antagonista-*R. solani* también se observaron microesclerocios. Solo en los cilindros tomados del tratamiento antagonista-*P. capsici* se observó el crecimiento del antagonista sobre el micelio de *P. capsici* a los 5 dds (Figura 5) y en los cilindros provenientes del mismo tratamiento colocados en agua, se registró una mayor liberación de zoosporas en comparación con los cilindros testigos (Cuadro 3).



**Figura 5.** Viabilidad del micelio de *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs), a partir de cilindros de micelio del lado del patógeno invadido por el antagonista. A) crecimiento de Pc y antagonista 5 días después de la siembra (dds) del cilindro, B) crecimiento de Fo sin presencia del antagonista y C) crecimiento de Rs con presencia de microesclerocios y sin presencia del antagonista.

**Cuadro 3.** Efecto de *Saccharicola* sp. (A) sobre la producción de propágulos (esporangios y zoosporas) de *P. capsici*, *F. oxysporum* (microconidios) y *R. solani* (microesclerocios).

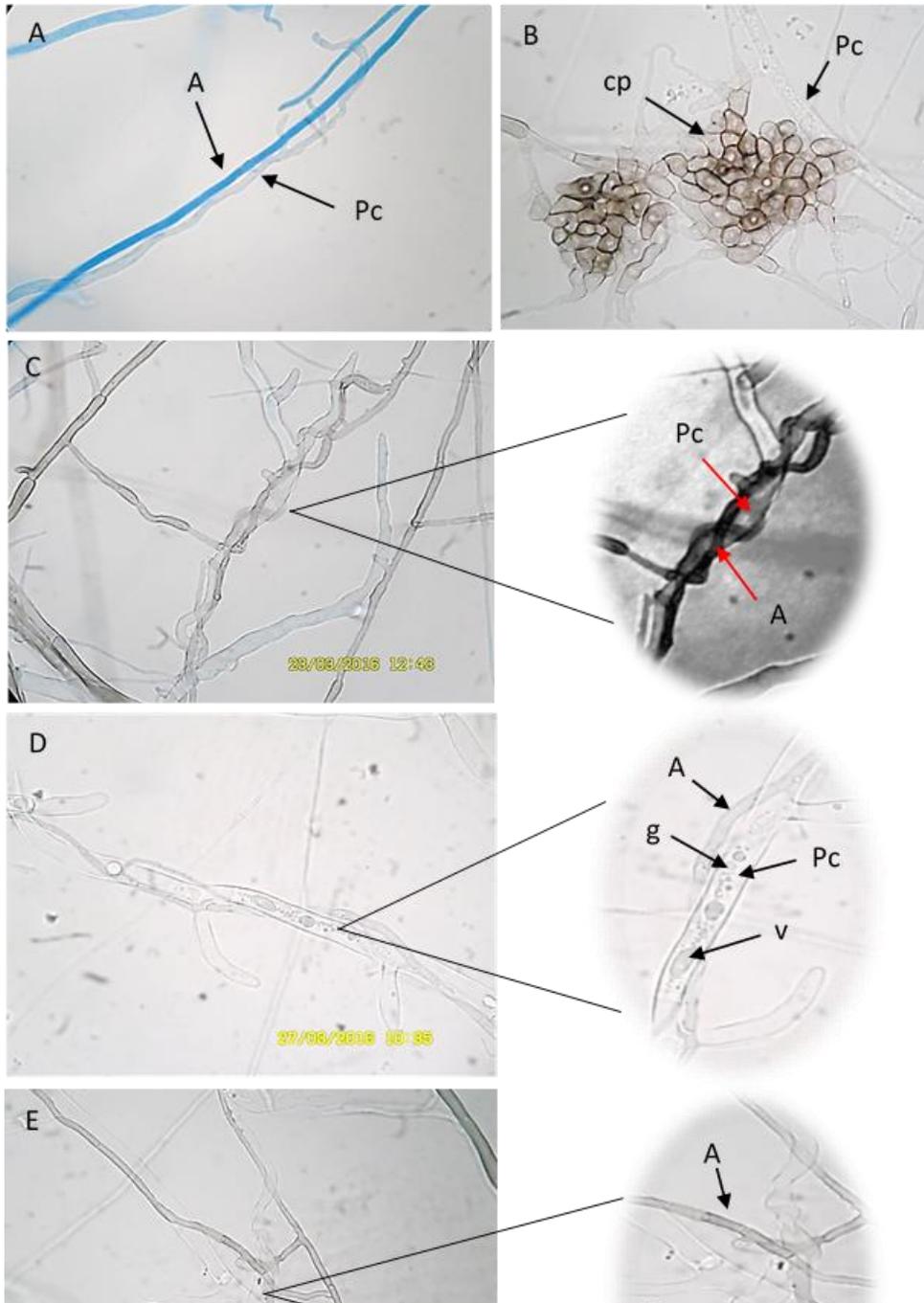
Tratamiento	Producción de propágulos (esporangios y microesclerocios)	Cantidad de zoosporas liberadas y microconidios/ml a los 21 <sup>e</sup> y 30 <sup>e</sup> dpc
Pc-Pc	+	4,000 <sup>e</sup>
A-Pc	++	9,000 <sup>e</sup>
Fo-Fo		1, 730,500 <sup>e</sup>
A-Fo		472, 750 <sup>e</sup>
Rs-Rs	++	
A-Rs	-	

dpc= días posteriores a la confrontación, Pc-Pc= Testigo *P. capsici*; A-Pc= antagonista-*P. capsici*; Fo-Fo= Testigo *F. oxysporum*; A-Fo= antagonista-*F. oxysporum*; Rs-Rs= Testigo *R. solani*; A-Rs= antagonista-*R. solani*; abundancia relativa de propágulos (-) nula, (+) baja y (++) regular.

### **Interacción micelial de *Saccharicola* sp.-*P. capsici* y *Saccharicola* sp.-*R. solani***

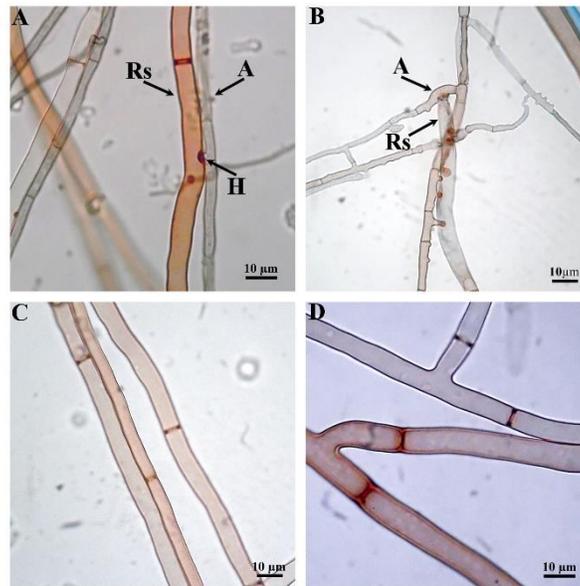
En condiciones *in vitro* la interacción de *Saccharicola* sp. y *P. capsici* se observó a las 24 h posteriores al momento en que los micelios de ambos microorganismos se encontraron, se presentó el fenómeno de adosamiento (crecimiento paralelo de las hifas de ambos microorganismos). A las 48 h fue evidente la formación de células pseudoparenquimatosas de *Saccharicola* sp. sobre las hifas de *P. capsici* y a las 72 h el crecimiento alrededor de las hifas de *P. capsici* (enrollamiento).

A las 96 h se observó la formación de esporangios de *P. capsici*, mientras que en el testigo éstos se evidenciaron hasta el 5º día. Al 7º día las hifas de *P. capsici* se observaron con vacualización y granulaciones en el citoplasma, deformes y con apariencia de estar vacías (Figura 6).



**Figura 6.** Pruebas de la interacción micelial entre *Saccharicola* sp.-*P. capsici* (A-Pc). A) crecimiento paralelo de las hifas de *Saccharicola* sp. y *P. capsici* (adosamiento) 24 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem). B) formación de células pseudoparenquimatosas (cp) de *Saccharicola* sp. a las 48 hpem. C) enrollamiento de *Saccharicola* sp., en la hifa de Pc a las 72 hpem. D) vacualización (v) del citoplasma y granulaciones (g) de las hifas de Pc, y E) hifas deformes y con apariencia de estar vacías al 7º día posterior al encuentro del micelio de ambos microorganismos.

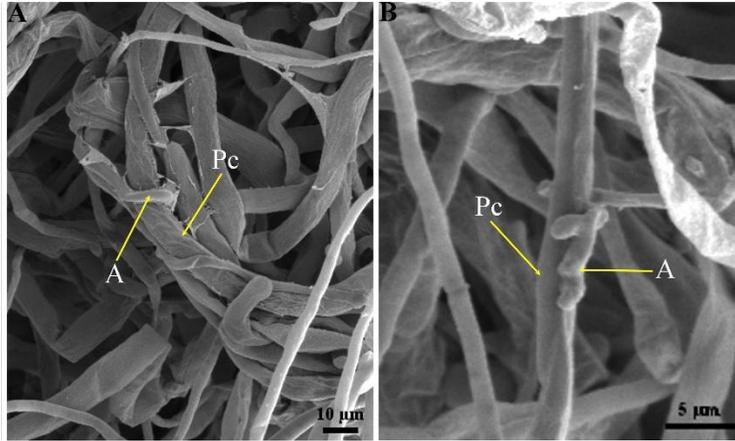
En *R. solani* desde las 24 h posteriores al encuentro de los micelios de ambos microorganismos se observaron hundimientos en las hifas de *R. solani* en los sitios de contacto con *Saccharicola* sp. (Figura 7) y en estos puntos también fue evidente la formación de pequeñas estructuras en las hifas de *Saccharicola* sp. A las 96 h en los sitios de contacto con *Saccharicola* sp., las hifas de *R. solani* presentaban deformación y el micelio mostraba una coloración menos intensa (Figura 7). En los sitios de interacción entre las hifas del antagonista con los patógenos fue evidente que las hifas del antagonista eran de menor diámetro, lo cual sugiere que el micelio joven es el que establece el contacto con las hifas de los patógenos.



**Figura 7.** Pruebas de la interacción micelial entre *Saccharicola* sp.-*R. solani* (A-Rs). A) hundimientos (h) en la hifa de Rs formados en los sitios de contacto con el micelio de *Saccharicola* sp. a las 24 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem) y B) hifa de Rs deforme y de coloración menos intensa a las 96 hpem.

### Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la interacción *Saccharicola* sp.-*P. capsici* se observó el enrollamiento de las hifas del antagonista alrededor de las hifas de *P. capsici* (Figura 8). También se observó la formación de estructuras de anclaje sobre el micelio de *P. capsici*.



**Figura 8.** Pruebas de la interacción micelial entre *Saccharicola* sp.-*P. capsici* (A-Pc). A) enrollamiento de *Saccharicola* sp. en la hifa de Pc. y B) Formación de estructuras (e) en forma de anclaje de *Saccharicola* sp. sobre el micelio de Pc.

### **Ensayo para determinar si *Saccharicola* sp. se establece como endófito en plantas de chile jalapeño**

En condiciones controladas no se pudo re-aislar a *Saccharicola* sp. del tejido de las plantas de chile inoculadas con el antagonista.

### **Antagonismo de *Saccharicola* sp. en invernadero**

En condiciones de invernadero *P. capsici* y *F. oxysporum* fueron patogénicos al chile, el primer ocasionó 100 % de incidencia de plantas enfermas y 50% de mortalidad (cuadro 4). *F. oxysporum* ocasionó 75% de incidencia de plantas enfermas y 50% de incidencia de plantas muertas, mientras que *R. solani* no fue patogénico al chile. Cuando se inoculó el antagonista en conjunto con los tres patógenos tanto en suelo estéril como en suelo naturalmente infestado hubo 100 % de incidencia de plantas enfermas. El antagonista no tuvo un efecto favorable en las variables diámetro de la base del tallo, altura y peso seco del follaje y raíz (Cuadro 4); claramente la aplicación de *Saccharicola* sp. no protegió a las plantas de chile del ataque por fitopatógenos, ni mejoró el desarrollo de las plantas.

**Cuadro 4.** Efecto de *Saccharicola* sp. en la mortalidad e incidencia de plantas enfermas, altura y peso seco de plantas de chile jalapeño variedad “M” en invernadero.

Tratamiento	% de incidencia de plantas enfermas ddi	% de incidencia de plantas muertas ddi	% de severidad	Diámetro de la base del tallo (mm)	Altura en cm	Peso seco (g)	
						Follaje	Raíz
T-Se	0	0	0 c	1.89(±0.08) a	3.06(±0.15) a	1.09(±0.06) bc	1.03(±0.10) c
A-Se	0	0	0 c	2.00(±0.05) a	3.14(±0.13) a	1.25(±0.04) a	1.22(±0.04) a
Pc-Se	100	50	7.8 a	1.81(±0.08) a	3.11 (±0.09) a	1.08(±0.09) bc	0.93(±0.06) d
A-Pc-Se	95	55	7.7 a	1.85(±0.10) a	3.22(±0.15) a	1.09(±0.06) bc	0.91(±0.05) d
Fo-Se	75	45	3.3 b	1.88(±0.18) a	3.11(±0.09) a	1.15(±0.04) ab	1.10(±0.08) bc
A-Fo-Se	65	40	2.85 b	2.01(±0.06) a	3.11(±0.13) a	1.19(±0.02) a	1.15(±0.02) ba
Rs-Se	0	0	0 c	2.00(±0.04) a	3.08(±0.10) a	1.24(±0.07) a	1.16(±0.04) ba
A-Rs-Se	0	0	0 c	1.98(±0.07) a	3.14(±0.08) a	1.21(±0.06) a	1.19(±0.04) a
A-Pc-Fo-Rs-Se	100	50	7.5 a	1.73(±0.10) a	3.07(±0.09) a	1.02(±0.07) c	0.86(±0.05) d
Pc-Fo-Rs-Sn	100	80	8.6 a	0.98(±0.39) b	1.50(±1.05) b	0.73(±0.05) d	0.70(±0.02) e
A-Pc-Fo-Rs-Sn	100	80	8.6 a	1.07(± 0.41) b	1.63(±0.99) b	0.72 (±0.05) d	0.70(±0.01) e

ddi=días después de la inoculación, T=Testigo, A=Antagonista (*Saccharicola* sp.), Pc= *Phytophthora capsici*, Fo=*Fusarium oxysporum*, Rs=*Rhizoctonia solani*, Se= suelo esterilizado, Sn= Suelo naturalmente infestado. Valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, P≤0.05)

## V. DISCUSIÓN

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp. causó una reducción significativa de 44.8% y 45.1% en el crecimiento micelial de *P. capsici* y *F. oxysporum* a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc), mientras que para *R. solani* la reducción fue de 36.2% a los 2 dpc (Cuadro 2) (Figura 2). Chapla *et al.* (2012), también consignaron un efecto similar de *Saccharicola* sp. contra *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* y *Microbotryum violaceum*. El hecho de que el micelio de *Saccharicola* sp. haya entrado en contacto con el de los patógenos a los 3 y 2 dpc sugiere que existe agresividad por parte del antagonista y susceptibilidad en el fitopatógeno (Benhamou y Chet, 1993). En cuanto a la reducción del crecimiento micelial de los fitopatógenos Dennis y Webster (1971) mencionan que la producción de antibióticos por agentes de control biológico, podrían inhibir la tasa de crecimiento del fitopatógeno durante una intensa competencia por nutrientes. Así, la capacidad de *Saccharicola* sp. de crecer sobre el micelio de *P. capsici* y *F. oxysporum*, podría deberse a que compite por los nutrientes del medio de cultivo y a la producción de enzimas como: celulasas, xilanasas, amilasas y pectinasas (Paganini-Marques, 2013; Fernando Chávez comunicación personal). En *R. solani* no se observó crecimiento del antagonista sobre él, el crecimiento de ambos llegó a la parte media de la caja a los 30 dpc y ahí se mantuvo; a pesar que el antagonista no invadió al patógeno, *R. solani* no produjo microesclerocios (Figura 3). Dennis y Webster (1971) indican que los antibióticos producidos por algunos agentes de control biológico tienen efectos fungicidas y fungistáticos, aunque dichos efectos varían dependiendo del hongo fitopatógeno. *Saccharicola* sp. se ha encontrado como endófito en algunas plantas. Un aislamiento endófito aislado de caña de azúcar produjo metabolitos secundarios conocidos como poliquétidos (Rojas *et al.*, 2011); en otro aislamiento obtenido de *Eugenia jambolana* se detectaron metabolitos bioactivos con capacidad antifúngica (Chapla *et al.*, 2012; Honório, 2013; Borges, 2016). Posiblemente el efecto generado por *Saccharicola* sp. en *R. solani* se deba a su capacidad de producir dichos metabolitos que estén ejerciendo un efecto en la reducción del crecimiento micelial de *R. solani* y ausencia de microesclerocios. Este efecto es importante para el control biológico, ya que muchos hongos forman estructuras de resistencia que les permite sobrevivir bajo condiciones adversas del ambiente hasta por más de 20 años (Higuera-Moros *et al.*, 2003).

En la presente investigación el antagonista afectó la producción de propágulos del hongo fitopatógeno, en *P. capsici* la estimuló mientras que en *F. oxysporum* la redujo. El mayor número

de esporangios y mayor liberación de zoosporas por *P. capsici* expuesto al antagonista *Saccharicola* sp. (Cuadro3), es un fenómeno que ha sido consignado por otros investigadores; por ejemplo, Sid-Ahmed *et al.* (1999) observaron la producción de esporangios de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma harzianum*. Estos autores indican que la estimulación en la producción de esporangios está asociado a la inhibición del crecimiento vegetativo de *P. capsici* como resultado de la acción antagonista (Brasier, 1975; Sid-Ahmed *et al.*, 1999) y del desarrollo de mecanismo de defensa del patógeno (Dennis y webster, 1971; Elad *et al.*, 1999). El adosamiento observado en este estudio es un indicativo de afinidad de la composición química de las paredes hifales de los micelios de ambos microorganismos y se le considera como el inicio del micoparasitismo (Pérez-Moreno, 1992). El enrollamiento de las hifas de *Saccharicola* sp. alrededor de *P. capsici* se ha interpretado como una expresión del micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004). En el presente trabajo sólo se observó el enrollamiento de la hifa del antagonista sobre la hifa de *P. capsici*, dicho efecto se constató con microscopia electrónica de barrido, que reveló además la formación de estructuras de anclaje sobre el micelio de *P. capsici*. La vacuolización y granulaciones en el citoplasma de las hifas de *P. capsici*, deformes y con apariencia de estar vacías (Figura 6), posiblemente se deba a la capacidad de *Saccharicola* sp. de producir celulasas (Paganini-Marques, 2013; Fernando Chávez comunicación personal), enzima involucrada en la desintegración de la celulosa, principal componente de la pared celular de *P. capsici* (Köhl y Schösser, 1991; Castro-Rocha *et al.*, 2012). Este mismo efecto fue reportado por Sid-Ahmed *et al.* (1999) quienes observaron la vacuolización y desintegración de las hifas de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma harzianum*. En *R. solani* se observaron hundimientos en sus hifas en los sitios de contacto con *Saccharicola* sp. en donde también se observó la formación de pequeñas estructuras papiladas emergiendo de las hifas de *Saccharicola* sp. Las hifas de *R. solani* mostraron deformación y una coloración menos intensa (Figura 7), posiblemente por efecto de los metabolitos bioactivos producidos por *Saccharicola* sp. (Chapla *et al.* 2012; Honório, 2013; Borges, 2016). A pesar de que en condiciones *in vitro* hubo reducción del crecimiento micelial de los fitopatógenos y en las pruebas de interacción micelial se observaron principios de micoparasitismo de *Saccharicola* sp. sobre las hifas de *P. capsici* y *R. solani*, en condiciones de invernadero posiblemente los microorganismos que colonizaron al suelo esterilizado durante el tiempo de aireación y establecimiento del ensayo y los nativos del suelo no tratado no permitieron el establecimiento de *Saccharicola* sp. o bien en esas condiciones su capacidad antagónica es

pobrementemente expresada. La homeostasis del suelo, dificulta o impide el establecimiento de cualquier especie introducida (Bautista-Calles *et al.*, 2014). Las aplicaciones de antagonistas tendrán más probabilidades de éxito si se aplican frecuentemente durante el ciclo del cultivo; por ello es importante determinar si aplicaciones semanales de *Saccharicola* sp. ayudarían a reducir la incidencia y severidad de los fitopatógenos en el cultivo de chile u otro cultivo. También es importante conocer que metabolitos secundarios están ejerciendo efecto *in vitro* en la reducción micelial de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*.

## **VI. CONCLUSIONES**

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp. causó reducción significativa de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*; sin embargo, en condiciones de invernadero la aplicación de *Saccharicola* sp. no protegió a las plantas de chile del ataque por fitopatógenos, ni mejoró el desarrollo de las plantas.

## VII. LITERATURA CITADA

- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E and Llobell, A. 2001. An antifungal exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5833-5839.
- Alameida, T.T., Orlandelli, R.C., Azevedo, J.L and Pamphile, J.A. 2015. Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 14:4920-4931.
- Álvarez-Zamorano, R. 2004. Enfermedades del tomate y del chile bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción Torreón, Coahuila, México, Octubre 13, 14 y 15.
- Anaya-López, J., González-Chavira, M., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., Rodríguez-Martínez R., Guevara-González R., Guevara-Olvera L., Montero-Tavera V y Torres-Pacheco, I. 2011. Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:373-383.
- Araujo, A. R., Chapla, M.V., López, M.N., Silva, D.H.S., Cavalheiro, A.J and Bolzani, V.S. 2013. Two new metabolites from *Saccharicola* sp. an endophytic fungus in *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). *Planta Médica* 79:855.
- Avelar, M.J.J. 1989. Intentos de control de la marchitez del chile ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* L. en la región de Valsequillo, Puebla, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México. 66 p.
- Babadoost, M. 2004. *Phytophthora* Blight: a serious threat to cucurbit industries. *American Phytopathological Society, Feature*. 1-12 pp.
- Baker, K.F and Cook, R.J. 1982. Biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 28-43 pp.

- Bautista-Calles, J., García-Espinosa, R., Montes-Belmont, R., Zavaleta-Mejía, E., Pérez-Moreno, J., Ferrera-Cerrato, R., García de la Cruz, R y Huerta-Lara, M. 2010. Disminución de la marchitez del chile por introducción de antagonistas en cultivos de rotación. *Interciencia* 35: 673-679.
- Bautista-Calles, J., Huerta-Lara, M y García-Espinosa, R. 2014. Antagonistas a *Phytophthora capsici* Leonian inoculados en sustratos de germinación de *Capsicum annuum* y *Mucuna deeringiana* Bort. *Avances e investigación Agropecuaria* 18:95-114.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C and Condón, A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260.
- Benhamou, N and Chet, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83:1062-1071.
- Bernardi-Wenzel, J., García, A., Filho C.J.R., Prioli, A.J and Pamphile J.A. 2010. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biological Research* 43:375-384.
- Borges, M.S. 2016. Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). México. Tesis de Maestría en Química. Universidad de Estadual Paulista. Araraquara. 50-106 pp.
- Bowers, J.H and Mitchell, D.J. 1990. Relationship between inoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. *Phytopathology* 81:178-184.
- Brasier, M.C. 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. *New Phytologist* 74:183-194.
- Caro-Encalada, M., Leyva-Morales, C y Ríos-Santana, J. 2014. Competitividad mundial de la producción de chile verde en México. *Revista de Economía* 83:95-128.

- Castro-Rocha, A., Fernández P.S y Osuna A.P. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Fitopatología 30:49-65.
- Chapla, M.V., Somensi, A., Cavalheiro, J.A., Bolzani, S.V y Araujo, A.R. 2012. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana*. 35a Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Química. Brasil, 1 pp.
- Chapla, M.V. 2014. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp. Tesis de doctorado en Química. Universidad de Estadual Paulista. Araraquara. 14-171 pp.
- Chapla, V.M., Biasetto, C.R y Araujo, A.R. 2013. Fungos endofíticos uma nova fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos productos naturais. Revista Virtual de Química 5:421-437.
- Cook, R.J and Baker K.F. 1989. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 57-82 pp.
- Cox, R.J. 2007. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. Organic & Biomolecular Chemistry 5:2010–2026.
- Dennis, C and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.
- Diniz, S.P.S.S and Oliveira, R.C. 2009. Effects of fusaric acid on *Zea mays* L. seedlings. ΦYTON 78:155-160.
- Elad, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A and Kirshner, B. 1999. *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. 459-467 pp. In: H. Lyr (ed) Modern Fungicides and Antifungal Compounds II. Andover, Hants, UK, 505 pp.
- Eriksson, O.E and Hawksworth, D.L. 2003. *Saccharicola*, a new genus for two *Leptosphaeria* species on sugar cane. Mycología 95:426-433.

- Erwin, D.C and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Escalona, Y., Rodríguez, D., Contreras, N y Jiménez, N. 2006. Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del municipio Jiménez, estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 18:3-13.
- Ezziyyani, M., Ahmed, S., Pérez-Sánchez, C., Requena, M.E y Candela, M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Ezziyyani, M., Ahmed, S., Pérez-Sánchez, C., Requena, M.E y Candela, M.E. 2006. Control biológico por organismos antagonistas. *Horticultura* 191:8-15.
- Fang-Sim, C.S., Wei-Shang, T and Yien-Ting, A.S. 2015. Endophytes from phragmites for metal removal: evaluating their metal tolerance, adaptive tolerance behaviour and biosorption efficacy. *Desalination and Water Treatment* 57: 6959-6966.
- Foster, J.M and Hausbeck, M.K. 2010. Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. *Plant Disease* 94:24-30.
- French-Monar, R.D., Jones, J.B and Roberts, P.D. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Disease* 90:345-350.
- García, R.S., Juárez, C., Carrillo, J.A., Allende, R., Marquéz, I y Muy-Rangel, M.D. 2000. Marchitez bacteriana en chile bell causada por *Erwinia carotovora* sub spp. *Carotovora*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:120-124.
- Guigón-López, C y González-González, P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.
- Guigón-López, C y González-González, P. 2007. Manejo de plagas en el cultivo de chile y su impacto ambiental en la zona agrícola de Jiménez-Villa López, Chihuahua, México. *Tecnociencia Chihuahua* 1: 36-47.

- Hertweck, C. 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie* 48: 4688-4716.
- Higuera-Moros, A., Fontalvo, J., Niño, L., Sánchez, J., Delgado, J., Villalobos, R y Montiel, M. 2003. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo de harina de semillas de frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp., frijol chino *Vigna radiata* L. y quinchoncho *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences* 11:14-21.
- Honório, A.E. 2013. Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). Tesis de Maestría en Química. Universidad de Estadual Paulista. Araraquara. 39-104 pp.
- Honório, A.E., Gubiani, R.J., Chapla, M.V., Bolzani, da S.V., Cavalheiro, J.A y Araujo, R.A. 2013. *Saccharicola* sp. um endófito de *Eugenia jambolana*, um prolífico productor de metabolitos bioactivos. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Brasil, 1 p.
- Hwang, B.K and Kim, A.H. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease* 79:221-227.
- Infante, D., Martínez, B., González, N y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal* 1:14-21.
- Kaiser, W.J., Ndimande, B.N and Hawksworth, D.L. 1979. Lea-scorch disease of sugar in Kenya caused by a new species of *Leptosphaeria*. *Mycología* 71:479-492.
- Köhl, J and Schösser, E. 1991. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and cellulolytic activity of strains of *Trichoderma*. In: Beemster, A.B.R., Bollen, G.J., Gerlagh, M., Ruissen, M.A., Schippers, B and Tempel, A. Biotic interactions and soil-borne diseases. Amsterdam: Elsevier. 160-164 pp.
- Kwan, D.H and Schulz, F. 2011. The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules* 16:6092-6115.

- Leme, A.C., Bevilaqua, M., Rhoden, S., Mangolin, C., Machado, M and Pamphile, J. 2013. Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. *Genetics and Molecular Research* 12:4095-4105.
- Marlatt, M.L., Correll, J.C and Kaufman, P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease* 80:1336-1342.
- Martin, R and Dombrowski, J. 2015. Isolation and identification of fungal endophytes from grasses along the Oregon coast. *American Journal of Plant Sciences* 6:3216-3230.
- Martínez, M. 2001. Libro de agricultura orgánica. Bogotá. 20, 186, 191, 192 pp.
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H., Sandoval-Coronado, C., Pereyra-Alfárez, B., Morales-Ramos, L., González-Aguilar, N., Hernández-Luna, C y Alvarado-Gómez, O. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 78:105-110.
- Morán-Bañuelos, S.H., Aguilar-Rincón, V., Corona-Torres, T y Zavaleta-Mejía, E. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotécnica México* 33:21-26.
- Navarrete-Maya, R., Trejo-Albarrán, E., Navarrete-Maya, J., Prudencio-Sains, J.M y Acosta Gallegos, J.A. 2009. Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. *Agricultura Técnica en México* 35:455-466.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information [online]. Website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (consulta, agosto 2015).
- Nee, M. 1986. Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. Fascículo 49. Pp 21-23.

- Paganini-Marques, N. 2013. Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Estadual Paulista. Araraquara. 31-86 pp.
- Paganini-Marques N., Araújo A. R., Gomes E y Bocchini-Martins D. A. 2014. Physico-chemical characteristics of crude cellulases and xylanases produced by two endophytic fungi *Botryosphaeria* sp. AM01 and *Saccharicola* sp. EJC04. 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals April 28-May 1 Hilton Clearwater Beach.
- Palazón, C y Palazón, I. 1989. Estudios epidemiológicos sobre la tristeza del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 15:233-262.
- Pérez-Moreno, J. 1992. Aspectos ecológicos; aislamiento de cepas, síntesis de micorriza y pruebas “*in vitro*” contra patógenos de diversos hongos ectomicorrízicos del parque nacional Zoquiapan, Edo. de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Edo de México. 87-90 pp.
- Pérez-Moreno, L., Durán-Ortiz, L., Ramírez-Malagón, R., Sánchez-Pale, J y Olalde-Portugal, V. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 1:19-25.
- Pernezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F and Goldberg, N.P. 2003. Compendium of Pepper Diseases. The American Phytopathological Society. USA. 63 p.
- Pescador-Flores, B., Almanza-Sánchez, L., Rodríguez-Kessler, M., Jiménez-Bremont, F y Fraire-Velázquez, S. 2006. Expresión diferencial de genes en planta de chile retada con *Rhizoctonia* binucleada avirulenta. Revista Digital de la Universidad Autónoma de Zacatecas Nueva Época 3:1-2.
- Punithalingam, E. 1983. *Leptosphaeria bicolor*. CMI Descr Path Fungi Bact, No.771.
- Ramírez, J. 1996. El chile. CONABIO. Biodiversitas 8:814.
- Ramos-Sandoval, R.U., Gutiérrez-Soto, J.G., Rodríguez-Guerra, R., Salcedo-Martínez, S.M., Hernández-Luna, C.E., Luna-Olvera, H.A., Jiménez-Bremont, J.F., Fraire-Velázquez, S y

- Almeyda-León, 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-Guerrero, L., Medina-Ramos, S., Muñoz-Sánchez, C., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R., Guerrero-Aguilar, B., Torres-Pacheco, I y Rodríguez-Guerra R., González-Chavira, M. 2004. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de Fitopatología 22:1-6.
- Riddell, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia 42:265-270.
- Ristaino, J.B. 1991. Influence of rainfall, drip irrigation, and inoculum density on the development of *Phytophthora* root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. The American Phytopathological Society 81:922-929.
- Ristaino, J.B and Gumpertz, M.L. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. Annual Reviews Phytopathology 38:541-576.
- Ristaino, J.B and Johnston, S.A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. Plant Disease 83:1080-1089.
- Rodríguez-Moreno, V., Luna-Ruiz, J., Valle-García, P., Tiscareño-López, M y Ruiz-Corral, J. 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el centro-norte de México mediante un sistema de información geográfica. Revista Mexicana de Fitopatología 1:72-81.
- Rojas, J.D., Durães, S.L., de Araujo, W.L., Garcez, L.M.S., Ferreira, da S.L., Furlan, R.A.R and Padilla, G. 2011. The diversity of poliketide synthase genes from sugarcane-derived fungi. Microbial Ecology 63:565-57.
- Salazar-Jara, F.I y Juárez-López, P. 2013. Requerimiento macronutritional en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.). Biociencias 2:27-34.

- SAS, Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Versión 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Sid-Ahmed, A., Pérez-Sánchez, C., Egea, C and Candela, M.E. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* 48:58–65.
- Silva-Valenzuela, M. 2015. *Saccharicola* sp., agente de control biológico del tule (*Typha domingensis* Pers). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México. 40 p.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/siap/index> (Consulta, febrero 2016).
- Van-Driesche, R.G., Hoddle, M.S., Center, T.D., Ruíz, C.E., Coronada, B.J y Álvarez, J.M. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. *Forest Health Technology Enterprise Team* 2:3-46.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M.M y Luna-Ruiz, J.J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum*) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181.
- Velásquez-Valles, R., Reveles-Torres, L.R., Chew-Madinaveitia, Y.I y Mauricio-Castillo, J.A. 2013. Virus y fitoplasmas asociados con el cultivo de chile para secado en el norte centro de México. Folleto Técnico 49. Campo experimental Zacatecas CIRNOC-INIFAP. 54 p.
- Velazco-Martín, A y Álvarez-González, J.F. 1988. Compendio de psiconeurofarmacología. Editorial. Díaz Santos, S.A. Madrid. 229 p.
- Vilchez, P. L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaras. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 77 p.
- Wilson, D. 1995. The evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* 2: 274-276.