

Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*)

Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*)

Ana Karina Uc-Arguelles, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; **Jesús Pérez-Moreno**, Instituto de Edafología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; **Victoria Ayala-Escobar**, **Emma Zavaleta-Mejía***, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230. *Autor para correspondencia: zavaleta@colpos.mx.

Recibido: 17 de Noviembre, 2017.

Aceptado: 03 de Abril, 2017.

Uc-Arguelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V, Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 263-283.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-6

Primera publicación DOI: 1 de mayo, 2017.

First DOI publication: May 1, 2017.

Resumen. Se evaluó la capacidad antagonista de *Saccharicola* sp *in vitro* e invernadero contra *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Mediante confrontaciones duales se evaluó la reducción de crecimiento del fitopatógeno y se registró el número de días en que el antagonista invadió el micelio de los patógenos, se determinó la viabilidad del micelio invadido y la producción de propágulos del fitopatógeno. *Saccharicola* sp causó reducción de 44.8 % y 45.1 % en el crecimiento de *P. capsici* y *F. oxysporum* a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc) y en *R.*

Abstract. The antagonist capacity of *Saccharicola* sp against *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* was evaluated *in vitro* and under greenhouse conditions. Through dual confrontation tests its impact was evaluated on the pathogen's growth and the number of days when the antagonist invaded the pathogen mycelia, and also the viability of the invaded mycelia, and the production of pathogen propagules was determined. *Saccharicola* sp caused a reduction of 44.8 % and 45.1 % in *P. capsici* and *F. oxysporum* growth 3 days after confrontation (dac), and 36.2 % in *R. solani* at 2 dac. The microculture technique was used to determine its mycoparasitic potential. At 72 h, the antagonist winded around *P. capsici* mycelia. In *R. solani* starting at 24 h ac, different types of clefs were observed on its walls, at the points where it was in contact with the antagonist. Although *Saccharicola* sp *in vitro* conditions showed a negative effect against phytopathogens and there was evidence of mycoparasitism, under greenhouse conditions disease incidence and severity did not decrease nor promoted plant growth.

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, micoparásito, marchitez del chile, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*.

El chile (*Capsicum annuum*) es uno de los cultivos agrícolas importantes de México (Castro-Rocha *et al.*, 2012) y es un componente básico de la dieta de la población (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). De acuerdo al Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) para el 2014 la superficie sembrada fue de 148,968.51 ha con un rendimiento promedio nacional de 19.05 ton/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; entre los factores que afectan la producción está el ataque por fitopatógenos que afectan la raíz como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Pythium* spp y *Phytophthora capsici*. (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). Este último es considerado un patógeno devastador capaz de infectar tanto las raíces como la parte aérea (Hwang y Kim, 1995; Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999; Lamour *et al.*, 2012), causa la marchitez del chile junto con un complejo fúngico en el que recurrentemente se aíslan *R. solani* y *Fusarium* spp (Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). El control se ha dirigido principalmente contra *P. capsici* mediante

Key words: biological control, mycoparasitic, chili wilting, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*.

Chili pepper (*Capsicum annuum*) is one of the most important agricultural crops in Mexico (Castro-Rocha *et al.*, 2012), as well as a basic component of the Mexican population diet (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). According to the Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), in 2014 the area grown to chili pepper was 148,968.51 ha with a national average yield of 19.05 ton/ha and estimated value of over 17 million pesos. However, from the area sown to chili pepper only 143,465.17 ha were harvested. One of the factors affecting chili pepper production is phytopathogenic damage to root caused by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Pythium* spp and *Phytophthora capsici*. (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). The latter is considered a lethal pathogen able to infect both root and above-ground plant parts (Hwang and Kim, 1995; Erwin and Ribeiro, 1996; Ristaino and Johnston, 1999; Lamour *et al.*, 2012), because it causes plants to wilt along with a fungal complex in which *R. solani* and *Fusarium* spp are repeatedly isolated (Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). Fungal control has been focused mainly on *P. capsici* using cultural practices, resistant varieties and chemicals, being chemicals the most commonly used. However, the high cost of production and problems caused by the frequent use of chemicals make it necessary to find alternatives for managing these pathogens.

An alternative for disease management is biological control through the introduction of antagonistic organisms, which combined with other methods, may significantly contribute to the effective management of root diseases (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). The *Saccharicola* sp fungus produces

prácticas culturales, variedades resistentes y aplicación de químicos, siendo estos últimos los más utilizados. Sin embargo, los altos costos de producción y problemas inherentes al uso frecuente de los químicos obligan a buscar alternativas para el manejo de estos patógenos.

Una alternativa de manejo de enfermedades lo constituye el control biológico mediante la introducción de organismos antagonistas, que integrado con otros métodos puede contribuir de manera significativa al manejo efectivo de las enfermedades radicales (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). El hongo *Saccharicola* sp produce metabolitos secundarios denominados “poliquétidos” (Rojas *et al.*, 2011; 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).

Recientemente (Silva, 2015) se aisló a *Saccharicola* sp a partir de plantas de tule (*Typha domingensis*) y sabiendo de su potencial como productor de metabolitos tóxicos, se realizaron ensayos preliminares *in vitro* para probar sus propiedades antimicrobianas. Con anterioridad Chapla *et al.* (2012) habían reportado el efecto antifúngico de *Saccharicola* sp contra *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* y *Microbotryum violaceum*. El género *Saccharicola* es un endófito que ha sido aislado de diferentes especies de *Saccharum* (Leme *et al.*, 2013) y de plantas acuáticas como *Eichhornia azurea* y *E. crassipes* (Almeida *et al.*, 2015), entre otras especies de plantas. 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 antagonista de *Saccharicola* sp contra *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* en condiciones *in vitro* e invernadero.

secondary metabolites known as “polyketides” (Rojas *et al.*, 2011; Chapla *et al.*, 2012) that act as antibiotics (erythromycin and tetracycline), anticancer (epothilones), immunosuppressants (rapamycin) and anticholesteremics (lovastatin) (Kwan and Schulz, 2011; Rojas *et al.*, 2011).

Recently, *Saccharicola* sp was isolated from tule plants (*Typha domingensis*) (Silva, 2015), and knowing its potential as toxic metabolites producer, preliminary *in vitro* tests were performed to prove its antimicrobial properties. Chapla *et al.* (2012) previously reported the antifungal effect of *Saccharicola* sp against *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* and *Microbotryum violaceum*. The *Saccharicola* genus is an endophyte that has been isolated from different *Saccharum* species (Leme *et al.*, 2013) and aquatic plants such as *Eichhornia azurea* and *E. crassipes* (Almeida *et al.*, 2015), among other species. Based on this information, it was considered relevant to investigate the potential of the *Saccharicola* sp fungus as antagonist of the root pathogens responsible for the greatest losses in chili pepper production. Thus, the objective of this study was to evaluate the antagonistic effect of *Saccharicola* sp against *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, under *in vitro* and greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in laboratories and greenhouses of Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, located in the municipality of Texcoco, State of Mexico. The isolates used were *Phytophthora capsici* 6143, provided by Dr. Fernández-Pavía, from Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; *Saccharicola* sp, *Fusarium oxysporum*

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en los laboratorios e invernaderos del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México. Los aislamientos utilizados fueron: *Phytophthora capsici* 6143 proporcionado por la Dra. Fernández-Pavía, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; *Saccharicola* sp, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* fueron proporcionados en el laboratorio 209 de Fisiología de la Interacción Planta-Patógeno del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

Pruebas de antagonismo *in vitro*

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. En cada caja Petri de 90 mm de diámetro conteniendo Infusión Papa Azúcar y Agar (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±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. Las cajas se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas.

and *Rhizoctonia solani* were provided by the laboratory 209 from Physiology Plant-Pathogen Interaction of Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

Antagonism tests *in vitro*

Dual confrontations were performed in order to evaluate the antagonistic effect of *Saccharicola* sp. A trial with seven treatments was established: 1) Antagonist-*Phytophthora capsici* (A-Pc), 2) Antagonist-*Fusarium oxysporum* (A-Fo), 3) Antagonist-*Rhizoctonia solani* (A-Rs), 4) Antagonist control (A), 5) *Phytophthora capsici* control (Pc), 6) *Fusarium oxysporum* control (Fo) and 7) *Rhizoctonia solani* control (Rs). Each treatment included 10 replications. In each Petri dish 90 mm in diameter filled with Potato-Sugar-Agar Infusion (IPAA), a cylinder 5 mm in diameter containing mycelium of the antagonist was placed 1 cm from the periphery and then kept in darkness at 27±1 °C. Four days later, a cylinder 5 mm in diameter filled with IPAA containing Pc, Fo or Rs mycelium was placed at the opposite end of the dish. A cylinder filled with Pc, Fo or Rs was placed at each end of the control dishes. The dishes were kept under the conditions previously mentioned.

Evaluated variables

Mycelial growth in the different treatments was measured (in cm) every 24 h and the number of days when hyphae of the confronted isolates came into contact was recorded for each treatment. When the mycelium of both the antagonist and the pathogen came into contact, the growth reduction percentage of the phytopathogen was calculated

VARIABLES EVALUADAS

Se midió en cm cada 24 h el crecimiento micelial en los diferentes tratamientos y se registró para cada uno el número de días en que entraban en contacto las hifas de los aislamientos confrontados; cuando el micelio 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.

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 patógenos confrontados con el antagonista cuando éste creció sobre la colonia de los patógenos. 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 hematómetro (Marienfeld®).

using the formula proposed by Sid-Ahmed *et al.* (1999). For this calculation we considered the growth average (in cm) of the pathogens in the control dishes, as well as the growth average from the dual confrontation.

The dishes were kept under observation during 30 days to record the number of days when the antagonist developed on the pathogens' mycelium. The viability of the mycelium of the pathogens confronted with the antagonist was also evaluated when it developed on the pathogens colony. When the antagonist developed on *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani* colonies, five Petri dishes were taken and from each dish three cylinders containing medium and showing mycelial growth of the invaded phytopathogen, and sown in IPAA to determine whether Pc, Fo and Rs mycelium was viable. After sowing, observations were made every 24 h during 5 days to determine if the phytopathogen was developing.

To know the antagonist effect on phytopathogen propagule production (zoospores or spores) at 21 dpc for *P. capsici*, and at 30 dpc for *F. oxysporum*, the following procedure was used: for *F. oxysporum*, from five dishes containing A-Fo treatments and their corresponding control (Fo), three cylinders 5 mm in diameter filled with mycelium were taken from the side where the pathogen developed and placed in tubes (Sarstedt®) filled with 5 ml of sterile distilled water; then the cylinders were shaken, and, using a micropipette, 200 µl of suspension were taken to count micronidia using a hemacytometer (Marienfeld®).

For *P. capsici*, from each of the five Petri dishes, three cylinders 1 cm in diameter filled with mycelial growth were taken and placed in dishes 50 mm in diameter filled with sterile distilled water and incubated at 27±1 °C for 48 h under white light to induce sporangia formation. After this period, and to induce zoospore release, the dishes were kept at 4 °C for 20 min, and then at 27±1 °C for

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 ± 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 4 °C durante 20 min y después a 27 ± 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* (A-Pc); 2) Antagonista-*R. solani* (A-Rs); 3) testigo antagonista; 4) testigo Pc; y 5) testigo Rs.

En cajas Petri con IPAA se sembraron a 1 cm de la periferia cilindros 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 cilindro de 5 mm con micelio de Pc o Rs a 1 cm de distancia. En todos los casos las cajas se mantuvieron en oscuridad a 27 ± 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,

1 h. Observations were made under a stereoscopic microscope to record the relative abundance of zoospores in relation to that of the control.

Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*P. capsici* and *Saccharicola* sp-*R. solani*

To know if the *Saccharicola* sp antagonist infects *P. capsici* and *R. solani* mycelia, microcultures were prepared following the technique described by Riddell (1950) with slight modifications. The experiment consisted of five treatments, and observations were made to four replications every 24 h during 15 days with a total of 60 Petri dishes for each treatment. The evaluated treatments were: 1) Antagonist-*P. capsici* (A-Pc); 2) Antagonist-*R. solani* (A-Rs); 3) antagonist control; 4) Pc control; and 5) Rs control.

Five mm cylinders containing the antagonist mycelium were sown in Petri dishes with IPAA at 1 cm from the periphery. A previously sterilized 18 x 18 mm cover slip was taken with a sterile tweezer and placed in the middle of each dish. After 72 and 96 h, a 5 mm cylinder containing Pc or Rs mycelium was placed at a distance of 1 cm. In all cases, the dishes were kept in darkness at 27 ± 1 °C. The same procedure was used for the controls. Every 24 h during 15 days observations were made to cover slips in four replications of each treatment; when mycelium of both microorganisms was found in the middle of the cover slip, it was removed from the culture medium using a sterile razor. A drop of cotton blue was added to the cover slip and observed under a 100 X Olympus® model CX31 compound microscope.

Scanning electron microscopy (MEB): The analyzed samples were taken from the interaction areas of confrontation between the antagonist and the pathogen (*P. capsici*) in IPAA medium. The

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®mod. CX31.

Microscopía electrónica de barrido (MEB): Las muestras analizadas se tomaron de la zona de interacción de las confrontaciones entre el antagonista y patógeno (*P. capsici*) en medio IPAA. Las muestras se analizaron en la Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic®, Xalapa, Veracruz, México.

Pruebas de antagonismo en invernadero: Se estableció un ensayo en los meses de noviembre de 2015 a enero de 2016 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-*F. oxysporum* (SE-Fo), 3) SE-*P. capsici* (SE-Pc), 4) SE-*R. solani* (SE-Rs), 5) SE-Antagonista (SE-A), 6) SE-Antagonista-*F. oxysporum* (SE-A-Fo), 7) SE-Antagonista-*P. capsici* (SE-A-Pc), 8) SE-Antagonista-*R. solani* (SE-A-Rs), 9) SE-Antagonista-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SE-A-Fo-Pc-Rs), 10) SN-Antagonista-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-A-Fo-Pc-Rs) y 11) SN-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-Fo-Pc-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

samples were analyzed at the Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic®, Xalapa, Veracruz, Mexico.

Antagonism tests in greenhouse: A trial was established from November 2015 to January 2016 using soil coming from the field and collected in a plot naturally infested with *P. capsici*. One portion of the soil was sterilized (SE) twice (2 h each) in an autoclave at 65 °C and 20 lb pressure, and then ventilated during 7 days. The other portion was not sterilized (SN). Eleven treatments were tested using a random blocks design with 10 pots (a jalapeño pepper plant of the “M” variety in each pot filled with 500 g of soil).

The treatments used were: 1) Control (SE-T), 2) SE-*F. oxysporum* (SE-Fo), 3) SE-*P. capsici* (SE-Pc), 4) SE-*R. solani* (SE-Rs), 5) SE-Antagonist (SE-A), 6) SE-Antagonist-*F. oxysporum* (SE-A-Fo), 7) SE-Antagonist-*P. capsici* (SE-A-Pc), 8) SE-Antagonist-*R. solani* (SE-A-Rs), 9) SE-Antagonist-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SE-A-Fo-Pc-Rs), 10) SN-Antagonist-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-A-Fo-Pc-Rs), and 11) SN-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-Fo-Pc-Rs). As reference of the pathogenicity of the *P. capsici* isolate used, chili plants of the highly susceptible variety “Yollow wonder” were also inoculated. The trial was repeated one more time.

Seed germination

Seeds of the jalapeño pepper M variety were disinfected with 2 % commercial sodium hypochlorite for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water. Seeds from the treatments including the antagonist were introduced in a 1X10⁸ colony-forming unit (ufc) of *Saccharicola* sp suspension; the other treatments were kept in

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" se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 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 1×10^8 unidades formadoras de colonia (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 ± 1 °C durante 11 días.

Las plántulas se transfirieron a charolas de poliestireno conteniendo una mezcla de Peat Mos y Agrolita (2:1) previamente esterilizada. A las plántulas correspondientes a los tratamientos con el antagonista se les aplicó una suspensión de 1×10^8 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 ± 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

sterile running water. The seeds were placed in sterile paper towels (sanitas) and left to germinate in darkness at 27 ± 1 °C for 11 days.

Seedlings were transferred to polystyrene trays containing a previously sterilized mixture of Peat Mos and Agrolita (2:1). To the seedlings from the treatments including the antagonist a 1×10^8 ufc suspension (10 ml/seedling) was added immediately after being transferred to the trays. The trays were kept in a growth room with photoperiods of 14 h light and 10 h in darkness at 25 ± 1 °C until seedlings developed the first pair of true leaves.

Preparing antagonist and pathogen inoculum, and inoculation.

Inoculum of the antagonist and of *R. solani* was prepared in 500 ml Erlenmeyer flasks containing potato-sugar infusion (IPA). The flasks were sterilized in autoclave at 120 °C for 15 min. Five cylinders 5 mm in diameter containing the antagonist or *R. solani* were aseptically transferred to the flasks and incubated for 10 days in a Lab-Line® shaking incubator at 110 revolutions per minute (rpm); mycelium was removed from the flasks and grinded in a blender.

From Petri dishes containing *F. oxysporum* or *P. capsici* mycelium, cylinders 5 mm in diameter were taken and sown in IPAA and in V8 juice agar (V₈A), respectively; then, they were incubated in darkness at 27 ± 1 °C. Seven days later, 10 ml of 0.9 % (Pisa®) sodium chloride isotonic solution were added to the Petri dishes containing *P. capsici*. Later, the solution was removed, and, using a dissection needle, the medium was divided in six fragments. Each fragment was transferred to a Petri dish containing 10 ml of sterile running water.

The dishes were kept under light for 48 h at 26 °C and 48 h in darkness at 28 h °C. After this period, they were placed at 4 °C for 20 min and

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±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 1X10⁸ para el antagonista, 1X10⁷ 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 transplantarlas 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 con síntomas de la enfermedad y la severidad (nivel de daño), 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 dos primeras variables. La severidad de *P. capsici* se

then at 27±1 °C for 1 h to induce zoospore release. The number of antagonist and pathogen propagules was counted in a hemocytometer and adjusted to the inoculum density at 1X10⁸ for the antagonist, and at 1X10⁷ ufc for *F. oxysporum* and *P. capsici*; for *R. solani*, 1 g of previously grinded mycelium was added. The antagonist inoculation was made in seeds, when the seedlings were transferred to trays, plus two 10 ml applications three days later, one day before transferring the plants to pots, and immediately after transplanting them to pots. The pathogen inoculation was made three days after the antagonist was inoculated. All of them were applied at the base of the stem.

Evaluated variables

Records were taken of the incidence (%) of plants showing disease symptoms and severity (damage level), plant height, diameter of the base of the stem, as well as root and canopy dry weight. Observations were made every day to record the first two variables. *P. capsici* severity was evaluated using the scale proposed by Morán-Bañuelos *et al.* (2010); *F. oxysporum*, using the scale proposed by Marlatt *et al.* (1996), and *R. solani* severity, using the scale proposed by Navarrete-Maya *et al.* (2009). When the experiment ended (3 months after transplanting), the height of the plants and the diameter of the base of the stem were measured. Roots were cut at the base of the stem. Both canopy and roots were placed in Kraft paper and dried at 60° C on a stove (Felisa®) during 4 days. Five plants from each treatment were randomly taken to record their dry weight.

Statistical analysis: Data from the evaluated variables in all the trials were used to perform normal distribution (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov) and variance homogeneity (Bartlett)

evaluó con la escala propuesta por Morán-Bañuelos *et al.* (2010), de *F. oxysporum* con la escala de Marlatt *et al.* (1996) y la severidad de *R. solani* con la escala propuesta por Navarrete-Maya *et al.* (2009). Al final del experimento (3 meses después del transplante), se midió la altura de la planta y el diámetro de la base del tallo. 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. El análisis se realizó con los datos de los dos experimentos.

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 1). 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* el crecimiento de ambos llegó a la parte media de la caja a los 30 dpc y ahí se mantuvo. A pesar de que el antagonista no invadió al patógeno, fue evidente la ausencia de

tests. For data obtained from the greenhouse trial we had to use a logarithmic transformation. Variance analysis (ANOVA) and means comparison (Tukey, $P \leq 0.05$) were performed using the SAS version 9.0 software. The analysis was performed with data from the two experiments.

RESULTS

Antagonism tests *in vitro*: Under *in vitro* conditions, *Saccharicola* sp showed a significant reduction of 44.8 % and 45.1 % in *P. capsici* and *F. oxysporum* mycelial growth 3 days after confrontation (dpc); *R. solani* showed a reduction of 36.2 % at 2 dpc (Table 1). At 21 dpc, the antagonist grew on the *P. capsici* colony, and at 30 dpc, on the *F. oxysporum* colony. On *R. solani*, the growth of both reached the middle of the dish at 30 dpc and stayed there. Although the antagonist did not invade the pathogen, the absence of microsclerotia was evident on the *R. solani* colony on the side of the cylinder containing the pathogen, but they developed in both cylinders containing the control (Figure 1).

Saccharicola sp reduced the mycelial growth of *F. oxysporum* and *P. capsici* 72 h after confrontation (hpc) compared with their corresponding controls, which showed greater growth; growth reduction of *R. solani* was recorded starting at 24 hpc (Figure 2). Three days after sowing (dds), mycelial growth was observed in the cylinders containing mycelium, which were taken from the side of the pathogens invaded by the antagonist (Table 1) (Figure 3). In the cylinders containing the antagonist-*F. oxysporum* treatment, taken from the side of the pathogen, a lower number of micronidia was observed compared with those of the control (Table 2). In the antagonist-*R. solani* treatment microsclerotia were observed. We observed

Cuadro 1. 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*.**Table 1. Effect of *Saccharicola* sp (A) on *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) and *R. solani* (Rs) mycelial growth, and on *P. capsici* sporangia and zoospore production.**

Tratamiento	Crecimiento en cm a los 2 ^e y 3 ^e dpc	% de reducción del crecimiento a los 2 ^e y 3 ^e 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) ^e		+		+	
A-Pc	1.4(± 1.37) ^e	44.8 a	++	-	++	SI
Fo-Fo	2.6(±0.08) ^e					
A-Fo	1.4(±1.32) ^e	45.1 a				SI
Rs-Rs	3.1(±0.42) ^e					
A-Rs	1.9(±0.77) ^e	36.2 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 ($P \leq 0.05$) / dpc= days after confrontation, ddi=days after the pathogen was invaded by the antagonist; Pc-Pc= *P. capsici* control; A-Pc= *Saccharicola* sp-*P. capsici*; Fo-Fo= *F. oxysporum* control; A-Fo= *Saccharicola* sp-*F. oxysporum*; Rs-Rs= *R. solani* control; A-Rs= *Saccharicola* sp-*R. solani*. (-), (+) and (++) denote absence and limited and regular presence of sporangia and zoospores, respectively. Values with the same letter are not significantly different according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

microesclerocios en la colonia de *R. solani* del lado del cilindro del patógeno, mientras que en ambos cilindros del testigo se desarrollaron (Figura 1).

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 2). 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 del micelio (Cuadro 1) (Figura 3). En los cilindros del tratamiento antagonista-*F. oxysporum* tomados del lado del patógeno se registró menor cantidad de microconidios en comparación con los del testigo (Cuadro 2). En el tratamiento antagonista-*R. solani* se observaron microesclerocios. Solo en los cilindros tomados del tratamiento antagonista-*P. capsici* se observó el crecimiento del

antagonist growth on *P. capsici* mycelium at 5 dds only in the cylinders taken from the antagonist-*P. capsici* treatment (Figure 3); in the cylinders from the same treatment placed in water, higher zoospore release was observed compared with that of the control cylinders (Table 2).

Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*P. capsici* and *Saccharicola* sp-*R. solani*.

Under *in vitro* conditions, interaction between *Saccharicola* sp and *P. capsici* was observed 24 h after mycelia of both microorganisms came into contact, and the attachment phenomenon was observed (Figure 4). At 48 h, formation of *Saccharicola* sp pseudoparenchymal cells was observed on *P. capsici* hyphae, and at 72 h, growth around *P. capsici* hyphae (winding) (Figure 4). At 96 h, formation of *P. capsici* sporangia was observed, but in the controls sporangia appeared

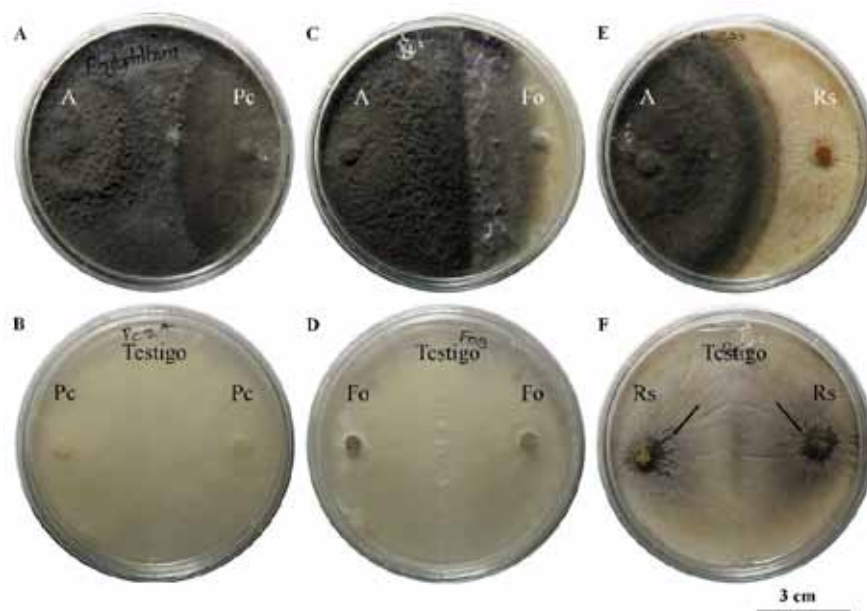


Figura 1. Antagonismo de *Saccharicola* sp (A) contra *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) a los 21 y 30 días posteriores a la confrontación (dpc). A) A-Pc, B) Testigo Pc a los 21 dpc, C) A-Fo, D) testigo Fo, E) A-Rs y F) testigo Rs a los 30 dpc con desarrollo de microesclerocios.

Figure 1. *Saccharicola* sp (A) antagonism against *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) and *R. solani* (Rs) at 21 and 30 days after confrontation (dpc). A) A-Pc, B) Pc control at 21 dpc, C) A-Fo, D) Fo control, E) A-Rs and F) Rs control at 30 dpc showing microsclerotia development.

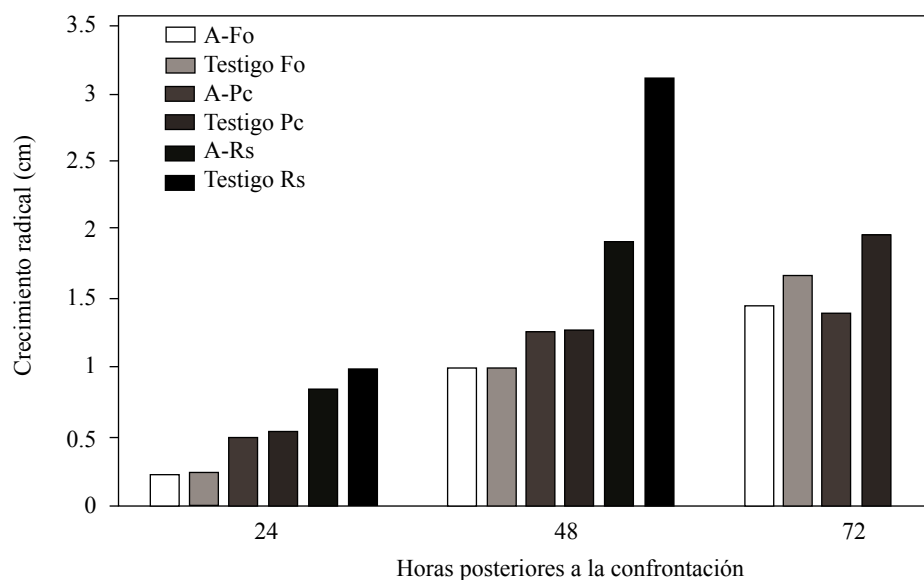


Figura 2. Crecimiento de *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc) y *R. solani* (Rs) a las 24, 48 y 72 h posteriores a la confrontación con *Saccharicola* sp.

Figure 2. *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc) and *R. solani* (Rs) growth at a 24, 48 and 72 h after confrontation with *Saccharicola* sp.



Figura 3. 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 microsclerocios y sin presencia del antagonista.

Figure 3. Viability of *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) and *R. solani* (Rs) from cylinders containing mycelium taken from the side of the pathogen invaded by the antagonist. A) Pc and antagonist growth 5 days after cylinder sowing (dds), B) Fo growth without the antagonist, and C) Rs growth with the presence of microsclerotia and without the presence of the antagonist.

antagonista sobre el micelio de *P. capsici* a los 5 dds (Figura 3) y en los provenientes del mismo tratamiento colocados en agua, se registró una mayor liberación de zoosporas en comparación con los cilindros testigos (Cuadro 2).

until day 5. At day 7, *P. capsici* hyphae showed vacuoles, cytoplasm granulation, deformation, and appeared to be empty (Figure 4).

In *R. solani*, starting 24 h after mycelia of both microorganisms came into contact, sinking

Cuadro 2. Efecto de *Saccharicola* sp (A) sobre la producción de propágulos (esporangios y zoosporas) de *P. capsici*, *F. oxysporum* (microconidios) y *R. solani* (microesclerocios).

Table 2. Effect of *Saccharicola* sp (A) on *P. capsici* propagule production (sporangia and zoospore), *F. oxysporum* (microconidia) and *R. solani* (microsclerotia).

Tratamiento	Producción de propágulos (esporangios y microesclerocios)	Cantidad de zoosporas liberadas y microconidios/ml a los 21 ^e y 30 ^e dpc
Pc-Pc	+	4,000 ^e
A-Pc	++	9,000 ^e
Fo-Fo		1, 730,500 ^e
A-Fo		472, 750 ^e
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 / dpc= days after confrontation; Pc-Pc= *P. capsici* control; A-Pc= antagonist-*P. capsici*; Fo-Fo= *F. oxysporum* control; A-Fo= antagonist-*F. oxysporum*; Rs-Rs= *R. solani* control; A-Rs= antagonist-*R. solani*; relative abundance of propagules (-) none, (+) scarce and (++) 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 (Figura 4). 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) (Figura 4). A las 96 h se observó la formación de esporangios de *P. capsici*, mientras que en el testigo éstos se evidenciaron hasta el 5° día. Al 7° día las hifas de *P. capsici* mostraron vacuolas, granulaciones en el citoplasma, deformación y con apariencia de estar vacías (Figura 4).

was observed in *R. solani* hyphae at the points of contact with *Saccharicola* sp (Figure 5); at those points we also observed the formation of small structures on *Saccharicola* sp. hyphae. At 96 h, at the points of contact with *Saccharicola* sp, *R. solani* hyphae showed deformation, and the mycelium, less intense coloration (Figure 5). At the points of interaction between the antagonist hyphae and the pathogens, we observed that the antagonist hyphae were smaller in diameter, which suggests that young mycelium is the one that comes into contact with the pathogen hyphae.

Scanning electron microscopy (MEB)

In the interaction *Saccharicola* sp-*P. capsici*, winding of the antagonist hyphae around *P. capsici* mycelium was observed (Figura 6), as well as

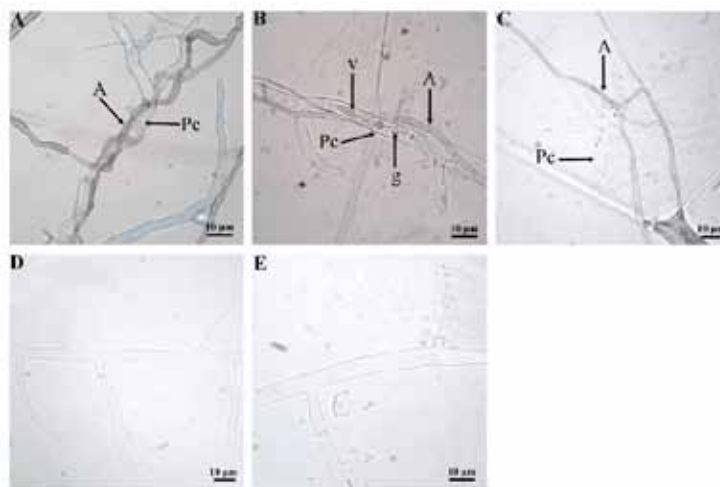


Figura 4. Interacción micelial entre *Saccharicola* sp-*P. capsici*. A) Enrollamiento de *Saccharicola* sp en la hifa de Pc a las 72 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem), B) hifas con vacualización (v) y granulaciones en el citoplasma, C) hifas deformes y con apariencia de estar vacías al 7° día posterior al encuentro del micelio de ambos microorganismos, D) y E) *P. capsici* testigo a las 72 y 7° día respectivamente.

Figure 4. Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*P. capsici*. A) *Saccharicola* sp winding around Pc hyphae 72 h after mycelia of both organisms came into contact (hpem), B) hyphae showing vacuoles (v) and cytoplasm granulation, C) deformed hyphae and seeming to be empty 7 days after mycelium of both microorganisms came into contact, D and E) *P. capsici* control at 72 h and 7 days after, respectively.

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 5) 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 5). 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,

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la interacción *Saccharicola* sp-*P. capsici* se observó el enrollamiento de las hifas del antagonista alrededor del micelio de *P. capsici* (Figura 6), así como también la formación de estructuras de anclaje sobre el mismo fitopatogeno.

Antagonismo de *Saccharicola* sp en invernadero

En condiciones de invernadero *P. capsici* y *F. oxysporum* fueron patógenos al chile, el primero ocasionó 100 % de incidencia y el 50 % de mortalidad en plantas enfermas. Con *F. oxysporum* se registró un 75 % de incidencia y 50 % de plantas muertas, mientras que *R. solani* no fue patógeno 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 en las plantas de chile. El antagonista no tuvo un efecto favorable en las variables diámetro de la base del tallo, altura y peso seco del follaje y raíz; claramente la aplicación de *Saccharicola* sp no protegió a las plantas de chile del ataque

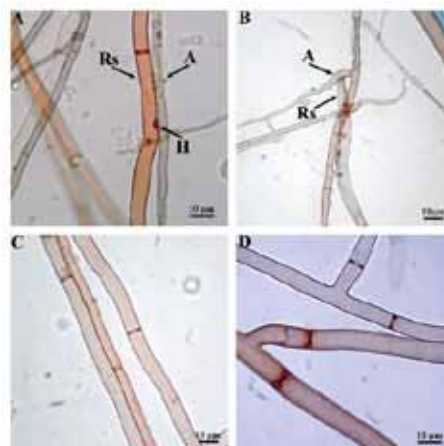


Figura 5. Interacción micelial entre *Saccharicola* sp-*R. solani* (A-Rs). A) Hundimientos (h) en la hifa de Rs formados en los sitios de contacto con el micelio de *Saccharicola* sp a las 24 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem). B) Hifa de Rs deforme y de coloración menos intensa a las 96 hpem.

Figure 5. Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*R. solani* (A-Rs). A) Rs hyphae (h) sinking at the points of contact with *Saccharicola* sp mycelium 24 h after the mycelium of both organisms came into contact (hpem). B) Rs hypha deformed and with less intense coloration at 96 hpem.

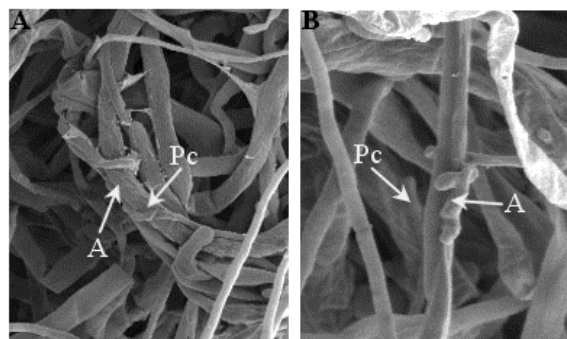


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido. A) Enrollamiento de *Saccharicola* sp en la hifa de Pc; B) Estructura de anclaje de *Saccharicola* sp sobre Pc.

Figure 6. Scanning electron microscopy. A) *Saccharicola* sp winding around Pc hyphae; B) *Saccharicola* sp anchoring structure on Pc.

por fitopatógenos, ni mejoró el desarrollo de las plantas.

DISCUSIÓN

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp causó 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 1). 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 compiten por los nutrientes del medio de cultivo y a una parasitosis en la que participa la producción de enzimas como: celulasas, xilanasas, amilasas y pectinasas (Paganini-Marques, 2013).

En la interacción *R. solani*-*Saccharicola* sp no se observó inhibición, ni formación de estructura de anclaje del antagonista sobre patógeno, a los 30 dpc; sin embargo, *R. solani* no produjo microesclerocios (Figura 3). Dennis y Webster (1971) indican que los antibióticos producidos por algunos agentes de control biológico tienen efectos inhibitorios, que varían dependiendo del hongo fitopatógeno.

formation of anchored structures on the same phytopathogen.

Saccharicola sp antagonist activity in the greenhouse

Under greenhouse conditions, *P. capsici* and *F. oxysporum* were pathogenic to chili pepper. The first caused 100 % disease incidence and 50 % mortality in infected plants. In *F. oxysporum*, 75 % incidence was recorded and 50 % dead plants; *R. solani* was not pathogenic to chili pepper. When the antagonist was inoculated along with the three pathogens, both in sterile soil and naturally infested soil, there was 100 % incidence in the chili pepper plants. The antagonist had no favorable effect on the diameter of the base of the stem, height or canopy and root dry weight. It was obvious that the application of *Saccharicola* sp did not protect the chili pepper plants from phytopathogens attack nor improved the plant development.

DISCUSSION

Under *in vitro* conditions, *Saccharicola* sp caused a significant reduction of 44.8 % and 45.1 % in *P. capsici* and *F. oxysporum* mycelial growth 3 days after confrontation (dpc), but the reduction in *R. solani* was of 36.2 % at 2 dpc (Table 1). Chapla *et al.* (2012) also referred a similar effect for *Saccharicola* sp against *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* and *Microbotryum violaceum*. The fact that *Saccharicola* sp mycelium come into contact with the pathogens mycelium at 3 and 2 dpc suggests that there is antagonist aggressiveness and pathogen susceptibility (Benhamou and Chet, 1993).

Regarding phytopathogens mycelial growth, Dennis and Webster (1971) mentioned that the

Saccharicola sp se ha encontrado como endófito en algunas plantas. Un aislamiento endófito aislado de caña de azúcar produjo metabolitos secundarios conocidos como poliketidos (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 y que estén ejerciendo una acción inhibitoria en la formación 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 (Cuadro 2), 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 interpreta como una expresión de parasitismo (Benítez *et al.*, 2004).

production of antibiotics by biological control agents may inhibit the phytopathogen growth rate during an intense competition for nutrients. Thus, *Saccharicola* sp capacity to grow on *P. capsici* and *F. oxysporum* mycelium may result from the competition for nutrients in the culture medium and parasitosis that involves enzyme production (cellulases, xylanases, amylases and pectinases) (Paganini-Marques, 2013).

In the interaction *R. solani*- *Saccharicola* sp no inhibition or anchoring structures formation on the pathogen at 30 dpc was observed. However, *R. solani* did not develop microsclerotia (Figure 3). Dennis and Webster (1971) stated that antibiotics produced by some biological agents have inhibitory effects that may vary depending on the phytopathogen fungus.

Saccharicola sp has been found as endophyte in some plants. An endophyte isolate obtained from sugarcane produced secondary metabolites known as polyketides (Rojas *et al.*, 2011); in another isolate obtained from *Eugenia jambolana* bioactive metabolites with antifungal activity were detected (Chapla *et al.*, 2012; Honório, 2013; Borges, 2016). It is possible that the effect produced by *Saccharicola* sp in *R. solani* may have resulted from its capacity to produce such metabolites and that they have inhibitory action on microsclerotia formation. This effect is important to biological control, since many fungi form resistance propagules that allow them survive under environmental harsh conditions even more than 20 years (Higuera-Moros *et al.*, 2003).

In this study, the antagonist affected the capacity of the phytopathogen to produce fungus propagules: in *P. capsici* it was stimulated, but in *F. oxysporum* it was reduced. The greater number of sporangia and higher release of *P. capsici* zoospore when exposed to the *Saccharicola* sp antagonist (Table 2) is a phenomenon that has been reported by other researchers. For example, Sid-Ahmed

En este trabajo se observó el enrollamiento de la hifa del antagonista sobre *P. capsici*, dicho efecto se constató con microscopía electrónica de barrido, que reveló la formación de estructuras de anclaje, vacuolización, granulaciones en el citoplasma y deformación de las hifas de *P. capsici*, con apariencia de estar vacías (Figura 4), lo cual posiblemente se deba a la capacidad de *Saccharicola* sp de producir celulasas (Paganini-Marques, 2013;). Dichas enzimas están involucradas en la desintegración de la celulosa, principal componente de la pared celular (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 5), 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*, esta acción no se expresó en invernadero, probablemente debido a la homeostasis del suelo, que dificulta o impide el establecimiento de cualquier especie introducida (Bautista-Calles *et al.*, 2014). Las aplicaciones de antagonistas tendrían más oportunidad 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 fito-

et al. (1999) observed the production of *P. capsici* sporangia in the presence of *Trichoderma harzianum*. These authors stated that the stimulation of sporangia production was associated with the inhibition of *P. capsici* vegetative growth as a result of the antagonist action (Brasier, 1975; Sid-Ahmed *et al.*, 1999) and the development of a defense mechanism by the pathogen (Dennis y webster, 1971; Elad *et al.*, 1999).

The attachment observed in this study is an indicator of the chemical composition affinity of mycelia hyphae walls of both microorganisms and it is considered as the beginning of mycoparasitism (Pérez-Moreno, 1992). *Saccharicola* sp hyphae winding around *P. capsici* is interpreted as a parasitism expression (Benítez *et al.*, 2004).

In this study we observed the antagonist hyphae to wind around *P. capsici*. Such effect was proven using scanning electron microscopy, which showed development of anchoring structures and vacuolization, granulation and deformation of *P. capsici* hyphae with appearance to be empty (Figure 4). This effect may have been caused by *Saccharicola* sp capacity to produce cellulases (Paganini-Marques, 2013). Those enzymes are involved in cellulose disintegration, which is the main component of cell walls (Köhl and Schösser, 1991; Castro-Rocha *et al.*, 2012). The same effect was reported by Sid-Ahmed *et al.* (1999), who observed *P. capsici* vacuoles and hyphae disintegration in the presence of *Trichoderma harzianum*.

In *R. solani*, sinking in hyphae was observed at the points of contact with *Saccharicola* sp, where also formation of small papillated structures emerging from *Saccharicola* sp was detected. *R. solani* hyphae showed deformation and less intense coloration (Figure 5), possibly because of the effect of bioactive metabolites produced by *Saccharicola*

patógenos en el cultivo de chile u otro cultivo. Así como también, conocer que metabolitos secundarios ejercen efecto *in vitro* en la reducción micelial de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*.

CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp causó reducción significativa del crecimiento micelial 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.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por los recursos económicos otorgados para la realización de la presente investigación, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y 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.

LITERATURA CITADA

- Ait-Lahsen H, Soler AM, de la Cruz J, Monte E and Llobell A. 2001. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67:5833-5839. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.12.5833-5839.2001>
- Almeida T.T., Orlandelli R.C., Azevedo J.L. y 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.11.25>
- Bautista-Calles J, Huerta-Lara M y García-Espinosa R. 2014. Antagonistas a *Phytophthora capsici* inoculados en sustratos de germinación de *Capsicum annuum* Leonian y *Mucuna deeringiana* Bort. Avances en investigación Agropecuaria 18:95-114. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83731110007>

sp (Chapla *et al.* 2012; Honório, 2013; Borges, 2016).

Although under *in vitro* conditions, the phytopathogens mycelial growth was reduced, and in the mycelial interaction tests we observed the beginning of *Saccharicola* sp parasitism on *P. capsici*, as well as mycoparasitism on *R. solani*, this action was not expressed in the greenhouse, possibly because of soil homeostasis that limits or prevents the establishment of any introduced species (Bautista-Calles *et al.*, 2014). The antagonist applications could be more successful if they are frequently made during the crop cycle. For this reason, it is important to determine if *Saccharicola* sp weekly applications could help reduce phytopathogens incidence and severity in chilli pepper or other crops. It is also important to know which secondary metabolites have *in vitro* effect on *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani* mycelial reduction.

CONCLUSIONS

Under *in vitro* conditions *Saccharicola* sp significantly reduced *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* mycelial growth. However, under greenhouse conditions, *Saccharicola* sp did not protect the chilli pepper plants from phytopathogen attacks nor improved the plants development.

ACKNOWLEDGMENTS

To Colegio de Postgraduados for funding this research, to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted, and to M.Sc. Greta Hanako Rosas Saito from the Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic® for samples analysis.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-83-1062>
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC and Condón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260. Disponible en línea: [revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/9480/9476](http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/9480/9476)
- Borges MS. 2016. Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). Tesis de Maestría en Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 50-106 pp. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/11449/136385>
- Brasier CM. 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. *New Phytologist* 74:183-194. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1975.tb02604.x>
- Castro-Rocha A, Fernández PS y Osuna AP. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:49-65. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225129005.pdf>
- Chapla MV, Somensi A, Cavalheiro JA, Bolzani SV y Araujo AR. 2012. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana*. 35a Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Química. Brasil. 1p. Disponible en línea: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/35ra/resumos/T1941-1.pdf>
- Dennis C and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 25-39. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1536\(71\)80077-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1536(71)80077-3)
- Elad Y, David DR, Levi T, Kapat A, Kirshner B, Gavrin E and Levin A. 1999. *Trichoderma harzianum* T39 mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. 459-467 pp. In: Lyr H, Russell PE, Dehne HW and Sisler HD (eds.). *Modern fungicides and antifungal compounds II*. Intercept Publishers: Andover, England. 505 p. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00417-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00417-3)
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 262-268 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.0179a.x>
- 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. *Ciencia* 11:14-21. Disponible en línea: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/ciencia/article/view/9144/9133>
- Honório AE. 2013. Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). Tesis de Maestría en Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 39-104 pp. Disponible en línea: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136385>
- Hwang BK and Kim AH. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease* 79:221-227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/pd-79-0221>
- Köhl J and Schösser E. 1991. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and cellulolytic activity of strains of *Trichoderma*. *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology* 23:160-164. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-88728-3.50029-9>
- Kwan DH and Schulz F. 2011. The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules* 16:6092-6115. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16076092>
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Leme, AC, Bevilacqua MRR, Rhoden SA, Mangolin CA, Machado MFPS and Pamphile JA. 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. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013 September 27.11 September 2013>
- Marlatt ML, Correll JC 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/pd-80-1336>
- Morán-Bañuelos SH, 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. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61014255004>
- Navarrete-Maya R, Trejo-Albarrán E, Navarrete-Maya J, Prudencio-Sains JM y Acosta Gallegos JA. 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. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S0568-25172009000400011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S0568-25172009000400011)
- Paganini-Marques N. 2012. Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 31-86 pp. Disponible en línea: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88017/000721712.pdf?sequence=1>
- Pérez-Moreno J. 1992. Aspectos ecológicos; aislamiento de cepas, síntesis de micorriza y pruebas “in vitro” contra patógenos de diversos hongos ectomicorrizicos del parque nacional Zoquiapan, Edo. de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Edo. de México. 87-90 pp.
- Ramos-Sandoval RU, Gutiérrez-Soto JG, Rodríguez-Guerra R, Salcedo-Martínez SM, Hernández-Luna CE, Luna-Olvera HA, Jiménez-Bremont JF, Fraire-Velázquez S y Almeida-León IH. 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. Disponible en línea: [http://www.redalyc.org/pdf/612/Resumenes/Resumen\\_61218468001\\_1.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/612/Resumenes/Resumen_61218468001_1.pdf)
- Rico-Guerrero L, Medina-Ramos S, Muñoz-Sánchez C, Guevara-Olvera L, Guevara-González R, Guerrero-Aguilar B, Torres-Pacheco I, Rodríguez-Guerra R y 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. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222101.pdf>
- Riddell RW. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia 42:265-270. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3755439>
- Ristaino JB and Johnston SA. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. Plant Disease 83:1080-1089. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1080>
- Rojas JD, Durães SL, de Araujo WL, Garcez LMS, Ferreira da SL, Furlan RAR and Padilla G. 2011. The diversity of poliketide synthase genes from sugarcane-derived fungi. Microbial Ecology 63:565-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9938-0>
- 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).
- Sid-Ahmed A, Pérez-Sánchez C, Egea C and Candela ME. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. Plant Pathology 48:58-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00317.x>
- Silva VM. 2015. *Saccharicola* sp., agente de control biológico del tule (*Typha domingensis* Pers.). Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 56 pp. Disponible en línea: [colposdigital.colpos.mx:8080/js-pui/handle/10521/48](http://colposdigital.colpos.mx:8080/js-pui/handle/10521/48)
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM y Luna-Ruiz JJ. 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. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219207>