

# Isolation and identification of antagonistic fungi of fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico

## Aislamiento e identificación de hongos antagonistas de hongos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México

**Talina Olivia Martínez-Martínez**, <sup>1</sup>Programa de Investigación en Inocuidad de Alimentos. Campo Experimental Bajío-INIFAP. km 6.5 carretera San Miguel de Allende-Celaya, Celaya, Gto. C.P. 38110, México; **Adriana Paola Martínez-Camacho**, Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato. km 1.2 carretera Valle-Huanímaro, Valle de Santiago, Gto. C.P. 38407, México; **Raúl Rodríguez-Guerra**, Programa de Sanidad Vegetal. Campo Experimental General Terán-INIFAP. km 31 carretera Montemorelos-China, Ex Hacienda Las Anacuas, General Terán, N.L. C.P. 67400, México; <sup>1</sup>**Luis Antonio Mariscal-Amaro; Patricia Rivas-Valencia\***, Programa de Investigación en Sanidad Vegetal. Campo Experimental Valle de México-INIFAP. km 13.5 carretera Los Reyes-Textcoco, Coatlinchan, Textcoco, Edo. Méx., C.P. 56250, México.

\* Corresponding autor: [rivas.patricia@inifap.gob.mx](mailto:rivas.patricia@inifap.gob.mx).

Received: 10 February, 2023

Accepted: 24 April, 2023

Martínez-Martínez TO, Martínez-Camacho AP, Rodríguez-Guerra R, Mariscal-Amaro LA and Rivas-Valencia P. 2023. Isolation and identification of antagonistic fungi of fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(2): 268-284.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-1>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** The chili crop (*Capsicum annuum*) in Mexico represents an important economic source; however, every year there are losses in production of 40 to 100% due to the root disease known as wilt, which causes premature death of plants, this disease is caused by the fungi complex formed

**Resumen.** El cultivo de chile (*Capsicum annuum*) en México representa una fuente importante de ingresos; sin embargo, cada año se presentan pérdidas en la producción entre el 40 y 100% por la enfermedad conocida como marchitez. Esta enfermedad provoca la muerte prematura de plantas ocasionada por el complejo formado por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Phytophthora capsici*. El objetivo de esta investigación fue aislar hongos antagonísticos a patógenos asociados a la marchitez del chile a partir de muestras de suelo obtenidas en el sur de Guanajuato, México. Se aislaron hongos con potencial antagónico a *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. Se identificaron tres hongos con actividad antagónica constante, inhibiendo el crecimiento micelial, entre el 41-83%. La identificación molecular de los antagonistas se realizó amplificando las regiones in-

by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Phytophthora capsici*. The objective of this research was to isolate antagonistic fungi to the pathogens causing wilt from soil samples obtained in the southern of the state of Guanajuato, Mexico. Antagonistic fungi potential against *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. and *Phytophthora* spp. were isolated. Then three fungi isolates presented antagonistic potential, inhibiting mycelial growth by 41 to 83%. Molecular identification of the antagonist fungi was performed by amplifying the intergenic transcriptional regions (ITS) of the 18S ribosomal DNA component of fungi. This research contributes to the study of biological control of root pathogens using beneficial native microorganisms present in crop soils affected by pathogens associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico.

**Keywords:** Growth inhibition, beneficial microorganisms, root pathogens.

In 2021, chili pepper (*Capsicum annuum*) production in Mexico reached 3,086,742 t, valued at 30,642.66 million pesos (SIAP, 2022). Despite this, various root diseases have been affecting chili pepper yields in recent years, resulting in wilting and premature plant death (Pérez-Acevedo, 2017). Depending on chili genotypes, environmental conditions, pathogenicity of the pathogens, and inoculum quantity in the soil, wilting can cause losses of 40 to 100% in chili pepper cultivation (Tembhurne *et al.*, 2017). This disease complex is caused by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, and *Phytophthora capsici* (Montero-Tavera *et al.*, 2013), which lead to wilting, premature leaf drop, chlorosis, necrosis, strangulation at the stem base, and soft, watery rot due to vascular bundle obstruction (Pérez-Acevedo,

tergénicas transcripcionales (ITS) del componente ADN 18S ribosomal, identificando los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Esta investigación contribuye al estudio de alternativas de control biológico de patógenos de raíz, empleando microorganismos nativos presentes en suelos de cultivo afectados por la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México.

**Palabras clave:** Inhibición de crecimiento, microorganismos benéficos, patógenos de raíz.

La producción de chile (*Capsicum annuum*) en México en 2021 generó una producción de 3,086,742 t con un valor de producción de 30,642.66 millones de pesos (SIAP, 2022). No obstante, en los últimos años el rendimiento de esta hortaliza ha sido afectado por diversas enfermedades, principalmente de raíz, que provoca síntomas de marchitez y muerte prematura de la planta (Pérez-Acevedo, 2017). Se estima que la marchitez puede causar pérdidas en el cultivo del chile del 40 al 100%, esto dependerá de los genotipos de chile, las condiciones ambientales, la patogenicidad de los patógenos y la cantidad de inóculo en el suelo (Tembhurne *et al.*, 2017). De acuerdo con diversos autores, esta enfermedad es ocasionada por un complejo formado por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Phytophthora capsici* (Montero-Tavera *et al.*, 2013). Este complejo causa marchitamiento y caída prematura de las hojas, clorosis, necrosis y estrangulamiento en la base del tallo, pudrición suave y acuosa, estos síntomas se presentan debido a la obstrucción de los haces vasculares (Pérez-Acevedo, 2017). Además, del daño causado por *P. capsici*, como la pérdida de turgencia y amarillamiento de hojas, necrosis en la base del tallo y muerte de planta en menos de 25 días (Gómez-Hernández *et al.*, 2018; Pérez-Acevedo

2017). *P. capsici* can cause loss of turgidity, yellowing leaves, necrosis at the stem base, and plant death in under 25 days (Gómez-Hernández *et al.*, 2018; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). *Fusarium* spp. causes leaf discoloration and curling, followed by total wilting due to damage to the vascular system and interruption of physiological processes (Morid *et al.*, 2012). During the first days of seedling growth, the association of *Rhizoctonia* sp. and *Phytium* sp. leads to wilting, chlorosis, necrosis at the stem base, epidermis fall, and plant death (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017).

Crop management practices for these pathogens, including agrochemical application, control of soil moisture, and cultural practices (González-Chavira *et al.*, 2009). However, in recent years, studies have focused on biological control to reduce agrochemical use, protect consumer health, and minimize environmental impact (Zhao *et al.*, 2021). Bacteria, actinomycetes, and mycoparasitic fungi are the most commonly used microorganisms for controlling *P. capsici*, *R. solani*, and *F. oxysporum* (Yadav *et al.*, 2021). These biological control agents occur naturally in the soil microbiota, where they can persist in a microscopic mix of thousands and millions of microorganisms per gram of soil (Ezziyani *et al.*, 2004). The importance of biological control relies significantly on native microorganism species, which can function as antagonists through antibiosis, competition for space or nutrients, direct interactions with the pathogen (mycoparasitism and enzymatic lysis), and induction of resistance.

Due to the economic significance of chili cultivation in Guanajuato, Mexico, the objective of this study was to isolate antagonistic fungi from soil samples collected in production areas located in the southern region of the state, with the purpose of determining their effectiveness against fungi associated with chili wilt. By conducting

*et al.*, 2017). De acuerdo con Morid *et al.* (2012) la sintomatología causada por *Fusarium* spp. es la decoloración y enrollamiento de las hojas, seguido del marchitamiento total de la planta causado por el daño al sistema vascular y la interrupción de los procesos fisiológicos para la producción. Durante los primeros días de crecimiento de plántulas se ha determinado la asociación de *Rhizoctonia* sp. y *Phytium* sp. (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017), causando marchitez, clorosis, seguido de necrosis en la base del tallo, caída de epidermis y por último la muerte de la planta.

Para el manejo de estos patógenos, se realiza diferentes prácticas de manejo del cultivo como la aplicación de agroquímicos, control de humedad del suelo y prácticas culturales (González-Chavira *et al.*, 2009). En los últimos años se han desarrollado estudios enfocados en el control biológico con el fin de reducir la aplicación de agroquímicos, además de salvaguardar la salud del consumidor y reducir el impacto al medio ambiente (Zhao *et al.*, 2021). Los microorganismos más utilizados para el control de *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum* son bacterias, actinomicetos y hongos micoparásitos (Yadav *et al.*, 2021). Estos agentes de control biológico se encuentran de forma natural en la microbiota del suelo, donde pueden persistir en una mezcla microscópica de miles y millones de ellos por cada gramo de suelo (Ezziyani *et al.*, 2004). La importancia del control biológico depende en gran medida de las especies nativas de microorganismos que pueden funcionar como antagonistas a través de la antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

Dada la importancia económica del cultivo de chile en Guanajuato, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar hongos antagonistas a partir de muestras de suelo obtenidas en áreas de producción

this investigation, valuable local information is provided for the biological control of wilt-causing fungi.

In July 2017, fungi and oomycetes associated with chili wilt were isolated from three plots of San Luis cv. poblano chili plants at the Bajío Experimental Field of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP). Five plants displaying symptoms of wilt, stem rot, stunting, thick stem, and shoot death selected from each plot, placed in polyethylene bags inside a cooler, and transported to the laboratory for processing. Soil collections were carried out during the OI-2018 and PV-2019 cycles in 25 locations across eight chili-producing municipalities in Guanajuato, where plants in vegetative growth with characteristic symptoms of wilt, stem rot, chlorosis, and stunting were recorded. It was observed in both cycles that no agronomic management was implemented, including soil disinfection before planting; poor weed control, and waterlogging caused by uneven terrain or leaks from the irrigation tape. Five soil subsamples were taken from around the chili plants at a depth of 15-20 cm and homogenized to obtain a composite sample of 500 g (Table 1).

To process the wilted plants, we removed their aerial parts, preserved the stem, root collar, and root, and made 1 cm<sup>2</sup> tissue cuts. The cuts were disinfected with 5% sodium hypochlorite for 30 s and washed twice with sterile water. We placed the tissue on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated it at 25 °C. After five to seven days, we observed mycelial growth and isolated the colonies that developed. We identified all strains of interest according to their morphological characteristics (Sneh *et al.*, 1991; Van der Plaats-Niterink, 1981; Barnett and Hunter, 1972). To purify the strains, we re-isolated them on PDA using hypha tips (*Rhizoctonia* sp., *Phytium* sp., and *Phytophthora*

del sur de Guanajuato, México, para determinar su efecto contra hongos asociados a la marchitez de chile. Con este estudio se aporta información local para el control biológico de los hongos causantes de la marchitez.

En julio de 2017 se aislaron hongos y oomicetos asociados a la marchitez en plantas de chile poblano cv. San Luis cultivada en tres parcelas del Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se seleccionaron cinco plantas de cada parcela que presentaban marchitez, pudrición de tallo, achaparramiento, tallo grueso y muerte de brotes, se colocaron en una hielera en bolsas de polietileno hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento. Durante el ciclo OI-2018 y PV-2019 se realizaron colectas de suelo en 25 localidades de ocho municipios productores de chile en Guanajuato. Se registraron plantas en crecimiento vegetativo con síntomas característicos de marchitez: pudrición en tallo, clorosis y enanismo. En ambos ciclos se constató que no se realizó un manejo agronómico (nula desinfección previa a la siembra del suelo, deficiente control de malezas y encharcamientos causados por el terreno mal nivelado o por fugas de agua de la cinta de riego). Se tomaron cinco submuestras de suelo de alrededor de las plantas de chile a una profundidad de 15-20 cm, estas se homogenizaron para obtener una muestra compuesta de 500 g (Cuadro 1).

Las plantas con síntomas de marchitez se procesaron de la siguiente manera: se eliminó la parte aérea de las plantas, se conservó el tallo, cuello de raíz y raíz, y se realizaron cortes de 1 cm<sup>2</sup> de tejido, mismos que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por 30 s y dos lavados con agua estéril. El tejido se colocó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25°C y se observó el crecimiento de micelio durante cinco a siete días. Una vez que se desarrollaron las colonias se procedió a

**Table 1. Soil and chili bell pepper plant collection sites for isolation of antagonistic organisms associated with chili wilt in southern Guanajuato. Sampling cycles, Fall-Winter 2018 and Spring-Summer 2019.**

**Cuadro 1. Sitios de colecta de suelo y plantas de chile para el aislamiento de organismos antagónicos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato. Ciclos de muestreo, Otoño-Invierno 2018 y Primavera Verano 2019.**

Municipio	Localidad	Coordenadas geográficas	Variedades de chile por unidad de producción
<b>O-I/2018</b>			
Celaya	Rancho "Estrada"	20.530793; -100.869292	Crusadier, Aristóteles
Irapuato	Cuarta Brigada	20.623832; -101.275164	Crusadier, Aristóteles
Irapuato	Rancho "Los Lobos"	20.592263; -101.31285	Crusadier; Aristóteles
Villagrán	Rancho "El Pintor"	20.514751 -100.944374	Imperial
Silao	Loma Bonita	20.992519; -101.507566	Húngaro
Silao	Rancho "Santa Faustina"	20.887298; -101.435176	Secuoya, Estrella
Romita	Fracción Puerta Grande	20.88635; -101.495124	Don Vicente
Pénjamo	Rancho "Buenos Aires"	20.381657; -101.834033	Arista
Pénjamo	Rancho "San Gabriel"	20.429055; -101.598688	5807
Abasolo	Rancho "El Palomar"	20.413018; -101.556484	5807
<b>P-V/2019</b>			
Cortazar	Rancho "Las Fuentes"	20.447392; -100.969701	Serrano
Villagrán	Rancho "La Charca"	20.500479; -101.026391	Bravo
	Villagrán	20.490822; -101.027278	Serrano
J. Rosas	Santiago Cuenda	20.599575; -101.002517	Serrano
	En nombre de Dios	20.548681; -101.549556	Serrano
Abasolo	La Galera	20.441680; -101.569290	Serrano
	Rancho 1	20.450681; -101.595814	Serrano
	Rancho "El Pitayo"	20.470594; -101.575088	Tajín
Pénjamo	Rancho "Buenos Aires"	20.386537; -101.837438	Jalapeño
Guanajuato	San José de Llanos	20.845623; -101.315313	Jalapeño
	Rancho "Santa Faustina"	20.889908; -101.438975	Pimiento
	Parcela junto RSF	20.924923; -101.433522	Pimiento
Silao	Rancho de Elisa	20.935769; -101.435210	Pimiento
	El Ranchito	20.893356; -101.488338	Jalapeño
Romita	La Aldea	20.898463; -101.481889	Serrano

sp.) and single conidial cultures (*Fusarium* sp. and *Alternaria* sp.).

The soil samples underwent serial dilutions ( $10^1$ - $10^7$ ), with 1 g of sieved soil sample taken and saline solution (0.8% NaCl) used as the diluent. After homogenization in a Genius® vortex for 1 minute, 500 µL of dilutions  $10^3$ ,  $10^5$ , and  $10^7$  were cultivated in triplicate on Potato Dextrose Agar (PDA) and Luria Agar (LA) by surface spreading, resulting in 18 culture plates per sample. The plates

su aislamiento. Todas las cepas de interés se identificaron de acuerdo con sus características morfológicas (Sneh *et al.*, 1991; Van der Plaats-Niterink, 1981; Barnett y Hunter, 1972). Para la purificación de cepas se hicieron re aislamientos en PDA mediante punta de hifa (*Rhizoctonia* sp., *Phytium* sp. y *Phytophthora* sp.) y cultivos monoconidiales (*Fusarium* sp. y *Alternaria* sp.).

Las muestras de suelo se procesaron mediante diluciones seriadas ( $10^1$ - $10^7$ ), se tomó 1 g de muestra

were then incubated at 25°C for 72 h. Fungi that grew on the culture media were re-isolated on PDA and identified at the genus level based on their macroscopic and microscopic characteristics, including size, color, type of mycelium, and colony shape, as well as hyphae, mycelium, conidia, and conidiophores. Colonies with similar morphological characteristics were discarded, and those with slow growth were eliminated. Monosporic cultures were used to obtain pure strains. To pre-select fungi with possible antagonistic capacity, dual confrontations with *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. were performed. Four points were marked on a PDA culture plate, separated by 1.7 cm, and the candidate antagonist microorganism was seeded at the first point (approximately 1 cm from the edge of the plate), with the remaining three points seeded with the fungus. Possible antagonists were seeded three days prior to the confrontation to give them an advantage in growth. The incubation was carried out at 25°C for five days. The confrontations were performed in triplicate, using 12 culture plates and control. To determine the percentage of radial growth inhibition (PRGI), the growth radius of *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. was measured, and the formula used by Suárez *et al.* (2008) was employed to calculate the PRGI:

$$PRGI = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Where R1: radius of the fungus associated with wilt (control) and R2: radius of the fungus associated with wilt against the antagonist.

The fungi with a PRGI greater than 50% and an antagonistic effect against the confronted fungi were selected. To conduct this test, a PDA medium disk with *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and

de suelo tamizado, como diluyente se empleó solución salina (NaCl 0.8 %). Todas las diluciones se homogenizaron en un vortex Genius<sup>®</sup> por 1 minuto. Se tomaron 500 µL de las diluciones 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>7</sup> y se sembraron por triplicado en medio PDA y Agar Luria (AL) por extensión en superficie, con un total de 18 cajas de cultivo por muestra, que se incubaron a 25°C por 72 h, los hongos que crecieron en los medios de cultivo se re aislaron en medio PDA y se identificaron a nivel género considerando sus características macroscópicas y microscópicas, tales como tamaño, color, tipo de micelio y forma de las colonias; además de hifas, micelio, conidios y conidióforos. Las colonias que presentaban características morfológicas similares fueron descartadas y se eliminaron aquellas con crecimiento lento. Para la obtención de cepas puras se realizaron cultivos monospóricos. Los hongos con posible capacidad antagónica, se sometieron a una preselección a través de confrontaciones duales con *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. En cajas de medio PDA se marcaron en línea cuatro puntos separados por 1.7 cm; en el primer punto (aprox. a 1 cm del borde de la caja) se sembró el microorganismo antagonista candidato y en los tres puntos restantes se sembró el hongo. Los posibles antagonistas se sembraron con tres días de anticipación a la confrontación, con la finalidad de dar ventaja a su crecimiento. La incubación se desarrolló a 25°C durante cinco días. Las confrontaciones se hicieron por triplicado, se emplearon 12 cajas de cultivo y un testigo. Se midió el radio de crecimiento de *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Para el cálculo del PICR se empleó la fórmula utilizada por Suárez *et al.* (2008):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

*Rhizoctonia* spp. mycelium was placed 1 cm from the edge of the Petri dish, and the antagonist fungus was placed at the other end (Correa *et al.*, 2007). Ten repetitions were carried out for this test. The growth diameters of the fungi associated with wilt were measured at 120 hours. The radial growth of *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. in the absence of the antagonist was determined as a control. The PRGI was determined using the formula proposed by Suárez *et al.* (2008). Additionally, the degree of antagonism of the selected isolates was determined using the scale of Bell *et al.* (1982), which classifies the area that the antagonistic organism colonizes in the presence of the phytopathogen into six categories. The PRGI in the pre-selection and dual cultures were analyzed using a factorial design of two factors: antagonist (11 levels) and pathogen (3 levels). The data were transformed using the arcsine function and subjected to analysis of variance and mean comparison. The R version 1.1.1717 software, PBC, was used for the statistical analysis.

DNA extraction from 15-day-old fungal strains was performed using the protocol described by Lievens *et al.* (2003). Genomic DNA was quantified at a wavelength of 260 nm using the Nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific®), and its integrity was verified by electrophoresis on 1% agarose gels. All DNA samples were diluted to concentration of 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . The internal transcribed spacer (ITS) region of the fungal 18S ribosomal DNA component was amplified using the primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), as described by White *et al.* (1990). The expected final PCR product was 650 bp. The PCR product was purified using the ZR DNA Sequencing Cleanup Kit™ D4050S following the manufacturer's protocol. Sequencing was performed at the Genomic Services Department of Langebio, CINVESTAV-

Donde R1: radio del hongo asociados a la marchitez (testigo) y R2: radio del hongo asociados a la marchitez frente al antagonista.

Se eligieron los hongos que presentaron PICR mayor a 50%, además de que tuvieran efecto antagónico frente a los hongos confrontados, esta prueba consistió en colocar a 1 cm del borde de la caja petri un disco de medio PDA con micelio de *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. en el otro extremo el hongo antagonista (Correa *et al.*, 2007). En esta prueba se emplearon 10 repeticiones. Los diámetros de crecimiento de los hongos asociados a la marchitez se midieron a las 120 h. Para el testigo se determinó el crecimiento radial de *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. en ausencia del antagonista, el PICR se determinó con la fórmula utilizada por Suárez *et al.* (2008). Adicionalmente, se determinó el grado de antagonismo de los aislados seleccionados según la escala de Bell *et al.* (1982), que indica en seis clases el área que coloniza el organismo antagónico en presencia del fitopatógeno. Los PICR en la preselección y en los cultivos duales se establecieron bajo un diseño factorial de dos factores: antagonista (11 niveles) y patógeno (3 niveles). Los datos se transformaron con la función arcoseno para realizar un análisis de varianza y comparación de medias. Se empleó el software R versión 1.1.1717, PBC.

Para la identificación molecular de los hongos se utilizó en la extracción de ADN el protocolo de Lievens *et al.* (2003) a partir de cepas de 15 días. El ADN genómico se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific®) a una longitud de onda de 260 nm, y su integridad se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todas las muestras de ADN fueron diluidas a 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Se realizó la amplificación de la región espaciador interno (ITS) del componente ADN 18S ribosomal de hongos, con los iniciadores descritos

Campus Irapuato, and the obtained information was analyzed using the Finch TV program (Version 1.4.0) and compared against the BLAST: Basic Local Alignment Search Tool database.

Microorganisms associated with chili wilt were identified in the collected samples, with *Fusarium* spp. being the most prevalent, followed by *Rhizoctonia* spp. and *Phytophthora* spp. In addition, the presence of *Pythium* spp. and *Alternaria* spp. was also observed. Table 2 presents the observed symptoms in the collected plants along with the corresponding fungus or oomycete identified.

por White *et al.* (1990) ITS1 (5'TCCGTAGGTGACCTG- CGG3') y ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). El producto de PCR final esperado fue de 650 pb. La purificación del producto de PCR se realizó con el kit ZR DNA Sequencing Cleanup Kit™ D4050S según el protocolo del fabricante. La secuenciación se realizó en el Departamento de Servicios Genómicos del Langebio, CINVESTAV-Campus Irapuato. La información se analizó con el programa Finch TV, Versión 1.4.0. y comparada en la base de datos del BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

**Table 2. Isolates of fungi and oomycetes associated with chili wilt in symptomatic plants collected in southern Guanajuato, Mexico.**

**Cuadro 2. Aislados de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en plantas sintomáticas colectadas en el sur de Guanajuato, México.**

Síntoma	Tejido muestreado	Hongo aislado
Marchitez de planta, achaparramiento	Raíz, tallo	<i>Rhizoctonia</i> spp. (binucleada)
Marchitez de planta, achaparramiento	Raíz, tallo	<i>Rhizoctonia</i> spp. (mono nuclear)
Muerte de brote	Raíz, tallo	<i>Rhizoctonia</i> spp. (binucleada)
Muerte de brote	Raíz	<i>Pythium</i> spp.
Muerte de brote	Raíz, tallo, cuello de raíz	<i>Fusarium</i> spp.
Muerte de brote	Raíz	<i>Alternaria</i> spp.
Muerte de brote	Raíz	<i>Alternaria</i> spp.
Tallo grueso	Tallo	<i>Alternaria</i> spp.
Marchitez	Raíz, tallo, cuello de raíz	<i>Phytophthora</i> spp.

In total, 120 fungi with potential antagonistic activity were isolated and screened for pre-selection as antagonistic agents based on their morphology and growth rate, resulting in the selection of 11 strains. The analysis of variance revealed a significant interaction between the two factors (Table 3) at a significance level of 0.001. H5P1 exhibited the highest inhibitory effect against *Phytophthora* spp. (80.12%), whereas HMZA (80.1%) and H6P2 (82.41%) showed similar inhibitory effects against *Fusarium* spp. for *Rhizoctonia* spp., both HMZA (80.6%) and H6P2 (81.69%) showed the

Los microorganismos asociados a la marchitez del chile presentes en las muestras fueron *Fusarium* spp., seguido de *Rhizoctonia* spp. y *Phytophthora* spp.; sin embargo, también se observó la presencia de *Pythium* spp. y *Alternaria* spp. En el Cuadro 2 se indica la sintomatología observadas en las plantas colectadas y el hongo u oomiceto que se asoció.

Adicionalmente, se obtuvieron 120 hongos con posible actividad antagonista; con la determinación de morfología y velocidad de crecimiento, se eligieron a 11 de ellos para emplearlos en la preselección como agentes antagonistas. El análisis de



**Table 3. Percentage of Radial Growth Inhibition (PRGI %) of pre-selected strains of fungal isolates with antagonistic potential for fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico.**

**Cuadro 3. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR %) de las cepas preseleccionadas de hongos aislados con potencial antagónico para hongos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México.**

Hongo	Hongos antagonistas										
	HMZA	H4P5	H4C12	H5P1	H6P2	H11P	H13P	H14P	H14P3	H20P	H22P
Phy	71.4 ± 2.4 cde	31.45 ± 1.6 nopq	55.58 ± 0.5 f	80.12 ± 1.9 ab	75.38 ± 1.4 bcd	25.58 ± 2.3 pqr	50.04 ± 2.3 fghi	25.14 ± 1.8 gr	29.48 ± 4.4 nopq	27.55 ± 2.1 opqr	25.46 ± 2.0 pqr
Fus	80.1 ± 1.1 ab	20.72 ± 1.5 rs	43.94 ± 1.8 ghij	66.67 ± 1.2 e	82.41 ± 1.3 a	35.86 ± 2.2 jklmn	35.94 ± 1.1 jklmn	50.44 ± 2.0 fgh	33.49 ± 2.5 lmnop	52.41 ± 2.6 fg	52.81 ± 1.8 f
Rhi	80.6 ± 1.2 ab	42.33 ± 2.2 hijk	30.76 ± 0.9 nopq	77.71 ± 0.9 bc	81.69 ± 2.3 a	16.47 ± 3.9 s	41.57 ± 3.6 ijkl	35.22 ± 3.5 klmno	57.23 ± 7.4 f	53.13 ± 5.0 f	40.08 ± 2.6 jklm

Phy: *Phytophthora* spp., Fus: *Fusarium* spp., Rhi: *Rhizoctonia* spp. Note: Equal letters do not present significant statistical differences ( $p < 0.001$ ). Values correspond to the mean and  $\pm$  standard deviation. / Phy: *Phytophthora* spp., Fus: *Fusarium* spp., Rhi: *Rhizoctonia* spp. Nota: Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). Los valores corresponden a la media y  $\pm$  desviación estándar.

highest inhibitions. The lowest PRGI was observed for the confrontation of *Rhizoctonia* spp. against H11P (16.44%). Therefore, strains H5P1, H6P2, and HMZA were selected due to their consistent antagonistic potential with PRGI in the range of 50 to 82% and were identified at the molecular level.

The ITS1 and ITS4 primers were used for amplification, resulting in amplicons of approximately 650 bp, which are characteristic of fungal isolates (White *et al.*, 1990). Following sequencing and gene comparison using BLAST, the isolates were identified with 100% homology. *Aspergillus flavus* (H5P1), *Penicillium* sp. (H6P2), and *Trichoderma harzianum* (HMZA) were identified as the antagonistic fungi (GenBank accession no. KM386418.1, KP131554.1, KJ598874.1, respectively). The average PRGI of the antagonist strains against *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. was observed to be 50-82% (Table 4). An interaction was found between the levels of antagonist and pathogen at a significance level of 0.001. Under the dual confrontation technique, similar behavior was observed, where *A. flavus* (79.72%) and

varianza mostró interacción entre los dos factores a un nivel de significancia de 0.001 (Cuadro 3). El mayor efecto inhibitorio para *Phytophthora* spp. se observó con H5P1 (80.12%). Para *Fusarium* spp. se tuvieron dos resultados similares con HMZA (80.1%) y H6P2 (82.41%). En el caso de *Rhizoctonia* spp., tanto HMZA (80.6%) y H6P2 (81.69%) mantuvieron las mayores inhibiciones. El menor PICR se obtuvo con la confrontación de *Rhizoctonia* spp. contra H11P (16.44%). Por lo anterior se seleccionaron a las cepas H5P1, H6P2 y HMZA debido a que mostraron constante potencial antagónico con PICR en un intervalo de 50 a 82% y se identificaron a nivel molecular.

La amplificación con los iniciadores ITS1 e ITS4 mostraron amplicones de aproximadamente 650 pb, característicos de aislados fúngicos (White *et al.*, 1990). Con la secuenciación y comparación de genes del BLAST se logró la identificación de los aislados con homología del 100%. Los hongos antagónicos identificados fueron *Aspergillus flavus* (H5P1), *Penicillium* sp. (H6P2) y *Trichoderma harzianum* (HMZA). (No. de acceso GeneBank KM386418.1, KP131554.1, KJ598874.1,

**Table 4. Percentage of radial growth inhibition (PRGI) of antagonistic fungi isolated against fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico.****Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de hongos antagonísticos aislados contra hongos asociados a la marchitez de chile en el sur de Guanajuato, México.**

Hongo	<i>T. harzianum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Phytophthora</i> spp.	70.19 ± 2.03 cd	79.72 ± 2.06 ab	75.30 ± 2.55 bc
<i>Fusarium</i> spp.	82.55 ± 1.29 a	66.83 ± 11.69 de	50.77 ± 2.89 g
<i>Rhizoctonia</i> spp.	80.36 ± 1.59 ab	59.18 ± 2.01 f	62.59 ± 2.00 ef

Note: Equal letters do not present significant statistical differences ( $p < 0.001$ ). Values correspond to the mean and  $\pm$  standard deviation. / Nota: Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). Los valores corresponden a la media y  $\pm$  desviación estándar.

*Penicillium* sp. (75.30%) showed greater inhibition of radial growth of *Phytophthora* spp., while *T. harzianum* exhibited higher inhibition against *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia* spp. (82.55% and 80.36%, respectively). The lowest inhibition percentages were observed in the confrontation of *Fusarium* spp. against *Penicillium* sp. (50.77%) and *Rhizoctonia* spp. against *Aspergillus flavus*.

Additionally, it was determined that the obtained antagonism belonged to class 2 and 3 according to Bell *et al.*'s (1982) classification system (Table 5). Class 2 antagonism covered two-

respectivamente). En cuanto a la capacidad de inhibición de las cepas los hongos antagonistas contra *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., se observó un PICR promedio de 50 a 82% (Cuadro 4). Se encontró interacción entre los niveles del antagonista y de los patógenos con un nivel de significancia de 0.001. Se observó un comportamiento similar bajo la técnica de confrontación dual, la inhibición del crecimiento radial de *Phytophthora* spp. fue mayor cuando se confrontó con *A. flavus* (79.72%) y *Penicillium* sp. (75.30%); *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. presentaron

**Table 5. Antagonism class according to Bell *et al.* (1982) of *T. harzianum*, *A. flavus* and *Penicillium* sp. vs fungi associated with chili wilt.****Cuadro 5. Clase de antagonismo según Bell *et al.* (1982) de *T. harzianum*, *A. flavus* y *Penicillium* sp. vs hongos asociados a la marchitez del chile.**

Hongo antagonista	Hongo	Clase de antagonismo
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Phytophthora</i> spp.	2
	<i>Fusarium</i> spp.	2
	<i>Rhizoctonia</i> spp.	3
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Phytophthora</i> spp.	2
	<i>Fusarium</i> spp.	2
	<i>Rhizoctonia</i> spp.	2
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Phytophthora</i> spp.	3
	<i>Fusarium</i> spp.	2
	<i>Rhizoctonia</i> spp.	3

thirds of the pathogen's growth area, while class 3 was characterized by the antagonistic agent and pathogen colonizing half of the surface each. Class 3 antagonism was observed in the confrontations of *Penicillium* sp. against *Phytophthora* spp. and *Rhizoctonia* spp., and *T. harzianum* against *Rhizoctonia* spp., as depicted in Figure 1.

The fungi recovered from plants exhibiting wilt symptoms are consistent with those reported by researchers such as Gómez-Hernández *et al.* (2018), Albañil-Juárez *et al.* (2015), and Velásquez-Valle *et al.* (2013), who linked the disease to *P. capsici*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., and *Pythium* sp. *Alternaria* sp was found in the roots of plants that displayed shoot death, although this pathogen is not always detected in chili wilt. Vásquez-López *et al.* (2009) identified *Alternaria* in symptomatic plants, but they could not accurately determine its pathogenicity. Meanwhile, Garibaldi *et al.* (2019) and Begum *et al.* (2010) demonstrated that *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuis* caused symptoms and even severe damage to the production. Albañil-Juárez *et al.* (2015) reported that *F. oxysporum* had the highest incidence, followed by *Rhizoctonia* sp. and *Phytophthora* sp., in the Bajío and southwest of Guanajuato.

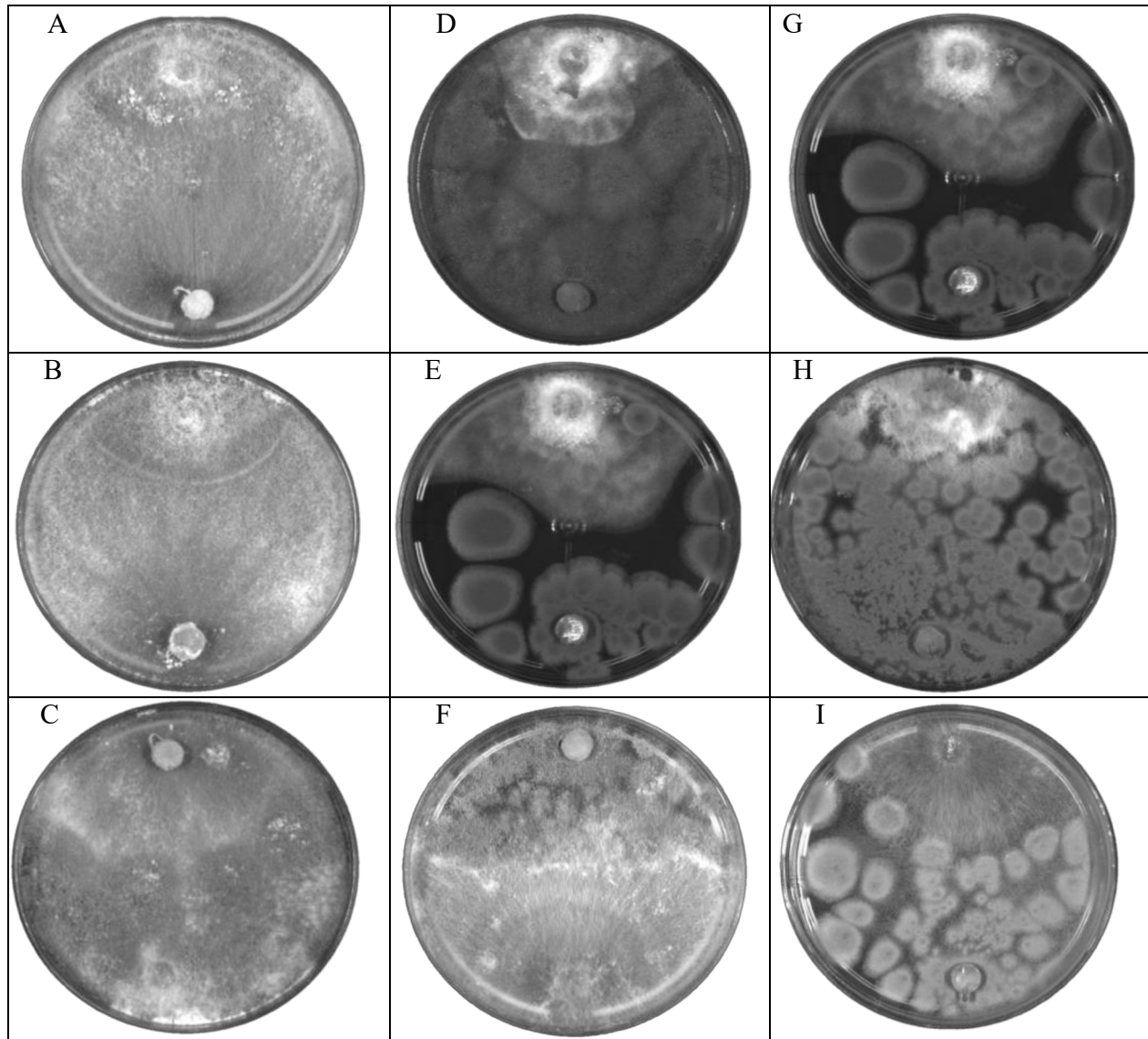
The three antagonistic fungi that exhibited the highest potential for induced systemic resistance (PRGI) have been previously documented as biocontrol agents against various pathogens. For instance, Polanco-Florian *et al.* (2020) identified *Aspergillus* and *Penicillium* as biocontrollers of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fomitopsis meliae*, which are the causative agents of citrus stem-end rot. These fungi were previously considered as saprophytes and toxin producers; however, atoxigenic strains that act via competitive exclusion have been identified, making them suitable for use in commercial formulations of biocontrol products. *Trichoderma*, a widely used biocontrol

mayor inhibición frente a *T. harzianum* (82.55 % y 80.36%, respectivamente). Los porcentajes menores de inhibición se observaron en la confrontación de *Fusarium* sp. contra *Penicillium* sp. (50.77%) y *Rhizoctonia* sp. frente a *Aspergillus flavus*.

Por otra parte, se determinó que de acuerdo con la clasificación de Bell *et al.* (1982) se obtuvieron antagonismo clase 2 y 3 (Cuadro 5). Para la clase 2 se cubrieron dos terceras partes del área de crecimiento de los patógenos; para la clase 3 el agente antagónico y el patógeno colonizaron cada uno la mitad de la superficie, antagonismo clase 3 se observó con *Penicillium* sp. frente a *Phytophthora* spp. y *Rhizoctonia* spp., de la misma forma *T. harzianum* frente a *Rhizoctonia* spp. (Figura 1).

Los hongos encontrados en las plantas que presentaron síntomas de marchitez coinciden con lo documentado por autores como Gómez-Hernández *et al.* (2018), y Albañil-Juárez *et al.* (2015) y Velásquez-Valle *et al.* (2013), quienes asociaron a la enfermedad con *P. capsici*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp. y *Pythium* sp. En el caso de *Alternaria* sp, se encontró en raíces de plantas que presentaron muerte de brote, este patógeno no siempre ha sido detectado en la marchitez de Chile, autores como Vásquez-López *et al.* (2009) identificaron a *Alternaria* en plantas con síntomas; sin embargo, no determinaron con exactitud su patogenicidad. En tanto, Garibaldi *et al.* (2019) y Begum *et al.* (2010) demostraron que *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuis* causaron síntomas e incluso daños severos en la producción. Albañil-Juárez *et al.* (2015) documentaron en el Bajío y suroeste de Guanajuato que los hongos con mayor incidencia han sido *F. oxysporum*, seguido de *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp.

Los tres hongos antagonísticos que mostraron mayores PICR han sido documentados como agentes de biocontrol para otros patógenos, Polanco-Florian *et al.* (2020) identificaron a *Aspergillus* y



**Figure 1.** Dual confrontation (phytopathogen vs. antagonist) *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia* spp. A) *T. harzianum* vs *Phytophthora* spp., B) *T. harzianum* vs *Fusarium* spp., C) *T. harzianum* vs *Rhizoctonia* spp., D) *A. flavus* vs *Phytophthora* spp., F) *A. flavus* vs *Fusarium* spp., G) *A. flavus* vs *Rhizoctonia* spp., H) *Penicillium* sp. vs *Phytophthora* spp., J) *Penicillium* sp. vs *Fusarium* spp., K) *Penicillium* sp. vs *Rhizoctonia* spp. Above: pathogen strain, below: antagonist strain. Cultures of 5 days of growth.

**Figura 1.** Confrontación dual (fitopatógeno vs. antagonico) *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. A) *T. harzianum* vs *Phytophthora* spp., B) *T. harzianum* vs *Fusarium* spp., C) *T. harzianum* vs *Rhizoctonia* spp., D) *A. flavus* vs *Phytophthora* spp., F) *A. flavus* vs *Fusarium* spp., G) *A. flavus* vs *Rhizoctonia* spp., H) *Penicillium* sp. vs *Phytophthora* spp., J) *Penicillium* sp. vs *Fusarium* spp., K) *Penicillium* sp. vs *Rhizoctonia* spp. Arriba: cepa de patógeno, abajo: cepa de antagonico. Cultivos de 5 días de crecimiento.

agent, is commercially available as a resistance stimulator, biofertilizer, bioplagueicide, and growth enhancer (Asad, 2022). The biocontrol mechanism of *Trichoderma* against soil-borne pathogens has been extensively studied. Abd-El-Khair *et al.* (2019) reported that *Trichoderma* could stimulate plant defense via the production of enzymes that inhibit the pathogen, thereby reducing root wilt and rot. Jamil (2021) indicated that *Trichoderma* acts as an endophytic symbiont by colonizing plant roots and secreting beneficial chemical stimulants for plants. Michael-Aceves *et al.* (2009) demonstrated that *Trichoderma* species maintain a scale of 1 to 3 values of mycoparasitism against phytopathogens. The selection of *Trichoderma* strains for biocontrol depends on their aggressiveness to mycoparasitism and their growth rate advantage over the pathogen (Guédez *et al.*, 2012). In this work, *T. harzianum* was observed to cover or grow over the phytopathogen *Phytophthora* spp. in less than a week at room temperature, similar to the observations made by Ezziyyani *et al.* (2004), where *T. harzianum* was capable of surpassing *P. capsici* and reducing the pathogen's colony in just four days during *in vitro* confrontation. In the case of root pathogens, Andrade-Hoyos *et al.* (2019) demonstrated the effectiveness of *T. asperellum*, *T. viride*, and *T. harzianum* isolated from soil against *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., and *Phytophthora capsici*, with over 85% inhibition of the strains. The authors attributed this response to the synthesis of secondary metabolites and mycoparasitism mechanisms of action. In another study by Mousumi-Das *et al.* (2018), *T. harzianum* exhibited inhibition against *F. oxysporum* of 78.3%, against *P. capsici* of 65.3%, and against *R. solani* of 45.3%. Lastly, Miguel-Ferrer *et al.* (2021) reported a PGRI of 53% and a class 2 antagonism on the Bell scale of *T. harzianum* against *F. solani*.

*Penicillium* shown to control pathogens through nutrient competition, mycelium disintegration, and

*Penicillium* como biocontroladores de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos, los autores indicaron que durante mucho tiempo estos hongos se han considerado saprofitos, incluso productores de toxinas; sin embargo, basándose en otras investigaciones, se indica que existen razas atoxigénicas que actúan por exclusión competitiva y que por estas características han sido considerados para emplearse en formulaciones comerciales de productos para biocontrol. *Trichoderma* se ha usado por años para el control de patógenos de suelo, de forma comercial se ofrece como un estimulador a la resistencia, biofertilizante, bioplagueicida y mejorador de crecimiento (Asad, 2022). El biocontrol que ejerce *Trichoderma* sobre patógenos asociados a enfermedades de raíz ha sido comúnmente estudiado, de acuerdo con Abd-El-Khair *et al.* (2019) es capaz de estimular la defensa de las plantas a través de la producción de enzimas que inhiben al patógeno y por lo tanto se reduce el marchitamiento y pudriciones de raíces. Jamil (2021) indica que *Trichoderma* actúa como simbionte endófito al colonizar las raíces de las plantas y al mismo tiempo secreta estimulantes químicos benéficos para las plantas. Se ha demostrado que especies de *Trichoderma* mantienen valores de micoparasitismo frente a fitopatógenos en una escala de 1 a 3 (Michael-Aceves *et al.*, 2009), para la elección de cepas de este antagonista se hace referencia a su agresividad para micoparasitar y la ventaja contra el patógeno con respecto a su velocidad de crecimiento (Guédez *et al.*, 2012). En este trabajo se observó que *T. harzianum* fue capaz de cubrir o crecer sobre el fitopatógeno *Phytophthora* spp. en menos de una semana a temperatura ambiente, esto coincide con lo mencionado por Ezziyyani *et al.* (2004) quienes observaron que en la confrontación *in vitro*, *T. harzianum* es capaz de sobre pasar a *P. capsici* y llegar a reducir la colonia del patógeno en solo 4 días. Para patógenos de raíz Andrade-Hoyos

lytic action antibiosis (Jiménez-Camargo *et al.*, 2018). In addition, the production of antimicrobial compounds, such as Glandicolina B, has been identified (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). As for *Aspergillus*, it is generally capable of inhibiting pathogen growth via antibiosis and nutrient competition (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008). This fungus has also found to produce antifungal compounds, such as Fumitremorgin B (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Atalla *et al.* (2020) demonstrated that *Aspergillus oryzae* reduced the linear growth of root rot-causing pathogens, including *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Phoma destructor*, *R. solani*, and *Sclerotium rolfsii*, through the production of xylanase in fava bean. However, Quiroz-Sarmiento *et al.* (2008) noted that although some strains of *Aspergillus* exhibit antagonism against root pathogens, pathogenicity tests are necessary to evaluate the possible production of enzymes and toxicological risks to the plant. There are studies demonstrating effective biological control of root-associated pathogens using *Penicillium*. Boughalleb-M'Hamdi *et al.* (2018) found that applying *P. italicum* and *P. digitatum* reduced root damage and disease severity in melon seedlings. The degree of antagonism of *Aspergillus* and *Penicillium* has not been extensively documented, and there are few studies regarding the type of antagonism they exhibit. Rather than defining the type of antagonism, the percentage of inhibition of pathogen growth is referred to Silva-Acosta and Paez-Redondo (2021) evaluated the effect of strains of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Trichoderma* on the control of *Phytophthora* sp. associated with oil palm. Their results showed that *A. niger* and *Trichoderma* sp. exhibited 74% and 79% inhibition in the growth of the oomycete, respectively. Moreover, Almeyda-León *et al.* (2020) identified *Aspergillus* and *Penicillium* as biocontrollers in the growth of *Macrophomina*

*et al.* (2019) demostraron la efectividad de *T. aspergillum*, *T. viride* y *T. harzianum* aislados de suelo sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora capsici*, sus resultados mostraron que no existieron diferencias significativas en la inhibición de las cepas, que fue superior a 85%; los autores señalaron que esta respuesta se debía a la síntesis de metabolitos secundarios y mecanismos de acción de micoparasitismo. En otro estudio realizado por Mousumi-Das *et al.* (2018) determinaron que *T. harzianum* mostró inhibición frente a *F. oxysporum* de 78.3%, para *P. capsici* de 65.3% y con *R. solani* 45.3%. Por otra parte, Miguel-Ferrer *et al.* (2021), determinaron un PICR de 53% y una clase 2 de antagonismo en la escala de Bell de *T. harzianum* frente a *F. solani*.

En el caso de *Penicillium*, el biocontrol se ha determinado por competencia de nutrientes, desintegración del micelio del patógeno y por antibiosis de acción lítica (Jiménez-Camargo *et al.*, 2018), además también se ha identificado la producción de compuestos antimicrobianos como la Glandicolina B (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). De forma general, *Aspergillus* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos a través de la antibiosis y la competencia por nutrientes (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008), también se ha identificado en este hongo la producción de compuestos antifúngico como la Fumitremorgina B (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Por otra parte, Atalla *et al.* (2020) demostraron que *Aspergillus oryzae* a través de la producción de xilanasa disminuyó el crecimiento lineal de *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Phoma destructor*, *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* causantes de la pudrición de raíz en haba. No obstante, Quiroz-Sarmiento *et al.* (2008) reconocen que, aunque se han encontrado cepas de *Aspergillus* que presentan antagonismos frente a patógenos de raíz, es necesario realizar pruebas de patogenicidad y evaluar la posible

*phaseolina* in percentages above 60%. Similarly, Jiménez-Camargo *et al.* (2018) demonstrated that strains of *Penicillium* caused inhibitions ranging from 54% to 81% in the development of *P. capsici* isolated from seedlings with wilt symptoms.

*Rhizoctonia* spp., *Phythium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. and *Phytophthora* spp. were isolated from chili bell pepper plants grown in production fields located in southern Guanajuato, Mexico. Three strains, namely *T. harzianum*, *A. flavus*, and *Penicillium* sp., exhibit constant antagonism against these pathogens, resulting in inhibition levels ranging from 41% to 83%. Other studies are required to determine if *A. flavus* and *Penicillium* sp. can be used as effective biocontrol agents. These findings suggest that these three organisms are an alternative to control phytopathogens associated with soil wilt in production areas. In light of the *in vitro* inhibitory effect observed, it is crucial to continue and scale up the potential control of the disease *in situ* to ensure its efficacy and practical application.

## CITED LITERATURE

- Abd-El-Khair H, Elshahawy IE, Haggag HEK. 2019. Field application of *Trichoderma* spp. combined with thiophanate-methyl for controlling *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in dry bean. Bulletin of the National Research Centre 43:19. <https://doi.org/10.1186/s4226>.
- Albañil-Juárez JA, Mariscal-Amaro LA, Martínez-Martínez TO, Anaya-López JL, Cisneros López HC y Pérez Ramírez HA. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(spe11):2191-2197. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i11.797>.
- Almeyda-León IH, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI, Rodríguez-Villarreal RA, Robledo-Leal ER, Armijo-Martínez LF. 2020. Caracterización funcional de hongos aislados de suelo por su capacidad antagónica contra *Macrophomina phaseolina*. Biotecnología y Sustentabilidad 5(1):62-74. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v5i1.920>.
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Osorio-Hernández E, Molina-Gayosso E, Landero-Valenzuela N y Barrales-Cureño H. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp.

producción de enzimas y los riegos toxicológicos a la planta. En relación al uso de *Penicillium*, existen estudios que demuestran un control biológico eficaz de patógenos asociados a raíz, Boughalleg-M'Hamdi *et al.* (2018) determinaron que al aplicar *P. italicum* y *P. digitatum* se redujo el daño a raíces en plántulas de melón, además disminuyó la severidad de la enfermedad. El grado de antagonismo de *Aspergillus* y *Penicillium* no ha sido documentado de forma extensa, son escasos los estudios con respecto a la clase de antagonismo que ejercen, no se define el tipo de antagonismo sino refieren el porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos. Silva-Acosta y Paez-Redondo (2021) evaluaron el efecto de cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* sobre el control de *Phytophthora* sp. asociado a palma aceitera, sus resultados demostraron que *A. niger* y *Trichoderma* sp. mostraron 74 y 79% de inhibición en el crecimiento del oomicete, respectivamente. Por otra parte, Almeyda-León *et al.* (2020) identificaron a *Aspergillus* y *Penicillium* como biocontroladores en el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en porcentajes superiores al 60%. De la misma forma, Jiménez-Camargo *et al.* (2018) demostraron que cepas de *Penicillium* causaban inhibiciones del 54 al 81% en el desarrollo de *P. capsici* aislada de plántulas con síntomas de marchitez.

Se aislaron *Rhizoctonia* spp., *Phythium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. y *Phytophthora* spp. asociados a plantas de chile en predios de producción, ubicados en el sur de Guanajuato, México. Con el muestreo realizado en las unidades productoras de chile con problemas de marchitez, se identificaron tres cepas (*T. harzianum*, *A. flavus* y *Penicillium* sp.) que presentaron antagonismo constante, con inhibición de 41 al 83%. En el caso de *A. flavus* y *Penicillium* sp., es importante continuar con estudios detallados para determinar si es posible utilizarlos como biocontroladores. Los

- vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(6):1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>.
- Asad SA. 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases-A review. Ecological complexity 49: 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>.
- Atalla SMM, Ahmed NE, Awad HM, El Gamal NG, El Shamy AR. 2020. Statistical optimization of xylanase production, using different agricultural wastes by *Aspergillus oryzae* MN894021, as a biological control of faba bean root diseases. Egyptian Journal of Biological Pest Control 30:125. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00323-z>.
- Barnett H. and Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul Minnesota. USA. 218 p.
- Begum MF, Rahman MA and Alam MF. Biological Control of *Alternaria* fruit rot of chili by *Trichoderma* species under field conditions. 2010. Mycobiology 38(2):113-117. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.2.113>.
- Bell D, Well H and Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>.
- Boughalleb-M'Ha mdi N, Sa le m I.B a n d M'Ha mdi M. 2018. Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil - borne fungi of melon and watermelon. Egyptian Journal of Biological Pest Control 28:25.
- Correa S, Mello M, Ávila Z, Minare L, Pádua R y Gomes D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SAAC. Fitosanidad 11(1): 3 -9.
- Ezziyanyani M, Pérez SC, Sid AA, Requena ME y Candela ME. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 26:35-45.
- Garibaldi A., Gilardi G., Matic S., Gullino M. L. 2019. First report of *Alternaria alternata* on chili pepper (*Capsicum frutescens*) in Italy. Plant Disease 103(5):1024-1025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1616-PDN>
- Gómez-Hernández D, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C. 2018. Pathogenicity of *Phytophthora capsici* Leon and *Rhizoctonia solani* Khün, on seedlings of 'costeño' pepper (*Capsicum annuum* L.). Revista BioCiencias 5,e356. <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e356>.
- González-Chavira M M, Villordo-Pineda E, Pons-Hernández JL, Delgadillo-Sánchez F, Paredes-Melesio R, Godoy-Hernández H, Anaya-López JL, Gámez-Vázquez FP, Medina-Cazares T y Rodríguez-Guerra R. 2009. Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato. México: Prometeo Editores. Primera Edición. ISBN. 978-607-953013-6.
- Guédez C, Cañizalez L, Castillo C y Olivar R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y resultados sugieren a estos tres organismos como alternativa de control biológico para fitopatógenos asociados a la marchitez del suelo empleando los antagonistas que están en estrecha relación dentro de las áreas de producción. De acuerdo con el efecto inhibitorio *in vitro* observado, se precisa continuar y escalar el posible control de la enfermedad *in situ* que aseguren su efectividad y uso.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 32(1):44-49. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562012000100009](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100009).
- Jamil A. 2021. Antifungal and plant growth promoting activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonizing tomato. Journal of Plant Protection Research 61(3): 243-253. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137950>
- Jiménez-Camargo A, Valadez-Moctezuma E y Lozoya-Saldaña H. 2018. Antagonismo de *Penicillium* sp. contra *Phytophthora capsici* (Leonian). Revista Fitotecnia Mexicana 41(2), 137-148. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.137-148>
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Lévesque CA, Cammue BPA and Thomma BPHJ. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. FEMS Microbiology Letters 223(1): 113-122. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00352-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00352-5).
- Michael-Aceves AC, Otero-Sánchez M and Solano-Pascacio L. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "escoba de bruja" del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27:18-26. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S0185-33092009000100003&](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S0185-33092009000100003&)
- Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA y Fernández-Pavía SP. 2021. Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco. Revista Mexicana de Fitopatología 39(2):228-247.: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>
- Montero-Tavera V, Guerrero-Aguilar BZ, Anaya-López JL, Martínez-Martínez TO, Guevara- Olvera L y González-Chavira MM. 2013. Diversidad genética de aislados de



- Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. Revista Mexicana de Fitopatología 4(7):1043-1054. <https://doi.org/10.29312/remexca.v4i7.1144>.
- Morid B, Hajmansoor S, Kakvan N. 2012. Screening of resistance genes to *Fusarium* root rot and *Fusarium* wilt diseases in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars using RAPD and CAPs markers. Euro Journal of Experimental Biology 2:931-939. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/79909>
- Mousumi MD, Haridas M and Sabu A. 2018. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>.
- Pérez-Acevedo CE, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C, Enríquez del Valle R, Villegas-Aparicio Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del Chile en Valles Centrales de Oaxaca. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(2): 281-293. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.50>.
- Polanco-Florián LG, Alvarado-Gómez OG, Olivares-Sáenz E, González-Garza R y Pérez-González O. 2020. Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. Revista mexicana de ciencias agrícolas 11(5):1069-1081. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Quiroz-Sarmiento VF, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, y Lara Hernández ME. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Micología 26: 27-34. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802008000100005](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000100005)
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Acciones y Programas. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. En línea: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (Consulta, junio 2022)
- Sánchez-Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez A, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC y Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP 16(2): 132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9).
- Silva-Acosta GE y Paez-Redondo AR. 2021. Antagonismo *in vitro* de nueve hongos aislados del Caribe colombiano sobre *Phytophthora* sp. asociado a palma aceitera. Ingeniería y Desarrollo 39(2):2145-9371. <https://dx.doi.org/10.14482/inde.39.2.579.546>
- Sneh BL and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Am Phytopathol Soc Press. St. Paul, Minnesota. 133 pp.
- Suárez C, Fernández R, Valero N, Gámez R y Páez A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología 10(3): 35-43. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752008000200005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752008000200005).
- Tembhurne B, Belabadevi B, Kisan B, Tilak I, Ashwathanarayana D, Suvarna N and Naik M. 2017. Molecular Characterization and Screening for *Fusarium* (*Fusarium solani*) Resistance in Chili (*Capsicum annuum* L.) Genotypes. International Journal Current Microbiology Applied Science. 6:1585-1597. 23. DOI:10.20546/ijcmas.2017.609.195.
- Van del Plaats-Niterink A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in micology 21:1-242. <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim21/full%20text.htm>.
- Vásquez L A, Tlapal BB, Yáñez MM, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del “Chile de agua” (*Capsicum annuum*) en Oaxaca, México. Revista Fitotecnica de México 32 (2): 127-134. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n2/v32n2a8.pdf>.
- Velásquez-Valle R y Amador-Ramírez, MD. 2007. Análisis sobre la investigación del Chile seco (*Capsicum annuum* L.), realizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en los estados de Aguascalientes y Zacatecas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 25:80-84. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092007000100011](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100011).
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols a guide to methods and applications 315 -322. Academic Press, San Diego. 1990.
- Yadav M., Kumar D.M. and Sanmukh U.R. 2021. Systemic Resistance in Chilli Pepper against Anthracnose (Caused by *Colletotrichum truncatum*) Induced by *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus dendritiformis*. Journal of Fungi (Basel) 7(4): 307. <https://doi.org/10.3390/jof7040307>.
- Zhao X, Liu X, Zhao H, Ni Y, Lian Q, Qian H, He B, Liu H and Ma Q. 2021. Biological control of *Fusarium* wilt of sesame by *Penicillium bilaiae* 47M-1. Biological Control 158, 104601. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104601>