

# Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* Causante de Pudrición de Tallos y Frutos de Tomate

## Morphological and Molecular Identification of *Penicillium oxalicum* Causing Stem and Fruit Rot in Tomato

Raúl Allende Molar, Paola Alejandra Picos Muñoz, Isidro Márquez Zequera, José Armando Carrillo Fasio, Raymundo Saúl García Estrada y Josefina León Félix, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. km 5.5 Carretera a El Dorado, Culiacán, Sinaloa, CP 80110, México. Correspondencia: rallende@ciad.mx

(Recibido: Noviembre 21, 2012 Aceptado: Enero 14, 2013)

Allende Molar R, Picos Muñoz PA, Márquez Zequera I, Carrillo Fasio JA, García Estrada RS y León Félix J. 2013. Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. Revista Mexicana de Fitopatología 30 : 13-19.

**Resumen.** Durante los ciclos hortícolas 2008, 2009 y 2010 se observó la presencia de una pudrición de tallos en plantas de tomate en áreas de cultivo en Culiacán, Sinaloa. En los tallos enfermos consistentemente se observó el crecimiento de un hongo de color gris-azul similar a *Penicillium* sp. Considerando que *Penicillium* no es un patógeno común en tomate, el objetivo fue determinar la especie de *Penicillium* que se encontraba infectando tallos y evaluar su potencial para producir pudrición en frutos en poscosecha. La patogenicidad de los aislamientos fue determinada mediante inoculaciones artificiales sobre tallos de plantas y en frutos sanos de tomate. La identificación morfológica del aislamiento fúngico incluyó la velocidad de crecimiento, la coloración de las colonias, los pigmentos producidos en los medios Agar Czapek Levadura y Agar Extracto de Malta y la forma y longitud de las esporas y el conidióforo. La identificación por técnicas moleculares se realizó mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del ADNr, con los iniciadores ITS1/ITS4. *Penicillium oxalicum* Currie & Thom fue identificado como patógeno en plantas y en frutos de tomate en poscosecha en México.

Palabras clave adicionales: Tomate, pudrición del tallo, pudrición poscosecha.

El valle de Culiacán, en Sinaloa, es considerado una de las principales áreas productoras de tomate en México. En el ciclo agrícola 2010 se cultivaron 14,095 ha de tomate en Sinaloa (SIAP, 2012). En los ciclos agrícolas 2007-2008 y 2008-2009 se observó una pudrición en tallos de plantas de tomate establecidas bajo condiciones de malla sombra e invernadero. Los síntomas observados en plantas enfermas

**Abstract.** During the agricultural cycles 2008, 2009, 2010, a tomato stem rot has been observed in tomato growing areas in Culiacan, Sinaloa. A *Penicillium* sp was consistently isolated from infected stem; Since *Penicillium* sp is not a common pathogen on tomato, the objective was to identify the *Penicillium* sp affecting tomato stems and to evaluate the potential of the fungus to cause postharvest rot in tomato fruits. Pathogenicity of the isolates was determined by artificial inoculations made in stems of healthy tomato plants. The morphological identification included the evaluation of colony growth rate and color, pigments of the colonies on Czapek Yeast Agar and Malt Extract Agar and the spore and conidiophore morphology. The identification by molecular techniques was performed by amplification and sequencing of a fragment of rDNA, with primers ITS1/ITS4. *Penicillium oxalicum* was identified as a pathogen on tomato plants and as a postharvest pathogen on tomato fruit.

Additional Keywords: *Penicillium oxalicum*, tomato, stem rot, postharvest rot.

The valley of Culiacan, Sinaloa state, is considered one of the major tomato producing areas in Mexico. During the 2010 agricultural cycle in Sinaloa, 14,095 ha of tomato were grown (SIAP, 2012). During the 2007-2008 and 2008-2009 agricultural cycles, rots in stems of tomato plants under net mesh or greenhouse were observed. The symptoms observed in diseased plants are usually shown in the wounds that occur when the stems are subject to pruning. Wounds turn brown accompanied by a gray-blue fungus in a period of 24-48 h (Figure 1a). The top leaves of affected plants show an irregular growth and color turns yellow. In advanced stages of the disease, it can be seen that the main stem completely dries and kills the plant. Besides these symptoms, it has been observed in tomato plants, that when the fungus infects the fruit, they develop a brown coloration in the wound site and a bluish-gray fungus; lastly, a watery rot can be observed which grows forming a circle from the

se presentan en las heridas que ocurren cuando los tallos son sujetos a la poda de formación. Las heridas se tornan de color café acompañadas de un moho de color gris-azul en un periodo de 24-48 h (Figura 1a). Las hojas de la parte superior de las plantas afectadas muestran un crecimiento irregular y un color que se torna amarillo. En etapas avanzadas de la enfermedad se puede observar que el tallo principal se seca completamente, causando la muerte de la planta. Además de estos síntomas, en el tomate se ha observado que cuando el hongo infecta los frutos, éstos desarrollan una coloración café en el sitio de la lesión, además de un moho gris azulado; finalmente, se observa una pudrición acuosa, la cual avanza formando un círculo a partir del sitio de la infección inicial. Debido a que existen escasos antecedentes de esta enfermedad y se desconoce el potencial de pérdidas que ésta podría causar en la región, es necesario identificar al agente causal de la pudrición en tallos de tomate y adicionalmente evaluar su potencial patogénico en poscosecha en frutos de tomate.

La identificación tradicional de especies de hongos se basa principalmente en el aislamiento del microorganismo en medio de cultivo y la posterior observación de las características morfológicas. Esta metodología es laboriosa y requiere de conocimiento amplio para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. Actualmente, en la identificación de microorganismos se están utilizando técnicas moleculares en las que se extraen ácidos nucleicos y después se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas basan su utilidad al explotar secuencias polimórficas dentro de los espacios internos transcritos (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal o secuencias únicas en el ADN (Larena y Melgarejo, 2009).

Aunque ya hay un resumen previo publicado (Picos *et al.*, 2011), en este escrito se describen mayores detalles metodológicos, características de crecimiento en medios de cultivo del patógeno responsable de la pudrición de tallos en tomate, técnicas moleculares utilizadas para su identificación y evidencia de patogenicidad en frutos de tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento del microorganismo fitopatógeno.

Muestras de tallos de tomate híbrido imperial se colectaron de dos invernaderos del valle de Culiacán (Figura 1a). Pequeños trozos tomados del margen de las lesiones necróticas desarrolladas en los tallos, se sembraron en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Se realizaron cultivos monospóricos en colonias desarrolladas en PDA y posteriormente, se tomaron discos de crecimiento activo del hongo y se preservaron en tubos con PDA inclinado con aceite mineral.

**Pruebas de patogenicidad.** La patogenicidad del aislamiento fúngico se determinó mediante inoculación de discos de crecimiento activo del hongo (5 mm diámetro) en tallos sanos de plantas de tomate de aproximadamente ocho semanas de edad en los que previamente se había realizado una herida (aproximadamente 5 mm diámetro) con un bisturí. El disco con crecimiento activo del hongo se sujetó

initial infection site. Because there is a limited track record of this disease and the potential losses that it might cause in the region are unknown, it is necessary to identify the causal agent of tomato stem rot and further evaluate its pathogenic potential in postharvest tomato fruits.

Traditional identification of fungus species is mainly based on the microorganism isolation in culture medium and the subsequent observation of their morphological characteristics. This methodology is laborious and requires extensive knowledge to distinguish between closely related species. Currently, in the microorganisms' identification area, the molecular techniques in which nucleic acids are extracted and then amplified by chain reaction (PCR) are used. These techniques rely on their effectiveness by exploiting polymorphic sequences within the internal transcribed spaces (ITS1 and ITS2) of ribosomal DNA or unique DNA sequences (Larena and Melgarejo, 2009).

Although there is a previous review already published (Picos *et al.*, 2011), in this paper, more methodological details, growth characteristics of the pathogen (responsible for the rot in tomato stems) in culture media, molecular techniques used for identification and evidence of pathogenicity in tomato fruits are described.

## MATERIALS AND METHODS

### Phytopathogenic microorganism isolation.

Imperial hybrid tomato stems samples were collected from two greenhouses in Culiacán Valley (Figure 1a). Small pieces taken from borders of the necrotic wounds of the stems were seeded in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium. Monosporic cultures were done on colonies grown on PDA and then fungus active growth discs were sampled and preserved in slanted PDA tubes with mineral oil.

**Pathogenicity tests.** Pathogenicity of the fungal isolate was determined by inoculation of active growth discs of the fungus (5mm diameter) in stems of healthy tomato plants of approximately eight weeks old on which a wound (approximately 5 mm diameter) with a scalpel was previously done. The fungus active growth disc was stuck to the wound with tape. In the control plants, the wound was done and a culture medium disc (5 mm diameter) was placed. The plants were kept in high humidity during 48 h then they were kept at room temperature in the laboratory. Pathogenicity in fruit included the growth of *Penicillium* sp. in PDA and once spores were produced, they were collected in sterile distilled water added with Tween 20 (0.1%) and the suspension was adjusted to  $1 \times 10^6$  spores / mL. A 20  $\mu$ L aliquot of the spore suspension was added to a wound made with a sterile dissection needle. Inoculated fruits were kept in a storage chamber at 25 °C with 90 % relative humidity.

**Morphological characterization.** The isolation and identification of the *Penicillium* genus, was done using the methodology and keys proposed by Pitt (1979), which consist in growing the fungus in two specific culture media for genus: Czapek Yeast Agar (CYA) (3 g NaNO<sub>3</sub>; 5 g yeast extract, 3 g sucrose, 1.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O; 0.5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.5 g KCl; 0.01g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.005 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O; 0.01 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 15 g agar; 1000 mL water; pH 6.3) and Malt Extract Agar (MEA) (30 g malt extract; 1 g

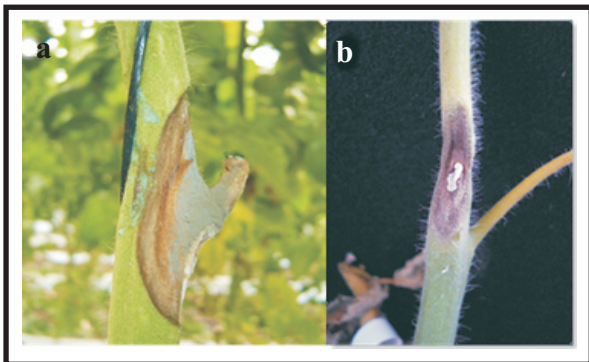


Figura 1. Síntomas de pudrición por *Penicillium* en tallos de tomate; a) Tallo infectado observado en invernadero; b) Tallo de planta de tomate con infección resultado de inoculación artificial.

Figure 1. *Penicillium* rot symptoms on tomato stems; a) Infected stem observed inside a greenhouse; b) Stem of tomato plant with infection, result of artificial inoculation.

a la herida mediante cinta. En las plantas testigo, se realizó la herida y se colocó un disco de medio de cultivo (5 mm diámetro). Las plantas se mantuvieron en alta humedad relativa durante 48 h y posteriormente fueron mantenidas a temperatura ambiente en el laboratorio. La patogenicidad en frutos incluyó el crecimiento de *Penicillium* sp. en PDA y una vez que produjo esporas, éstas se colectaron en agua destilada esterilizada adicionada con Tween 20 (0.1 %) y la suspensión se ajustó a  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Una alícuota de 20  $\mu$ L de esta suspensión de esporas se agregó en una herida causada por una aguja de disección estéril. Los frutos inoculados se mantuvieron en una cámara de almacenamiento a una temperatura de 25 °C con humedad relativa de 90 %.

**Caracterización morfológica.** El aislamiento e identificación del género *Penicillium*, se realizó mediante la metodología y claves propuestas por Pitt (1979), que consistió en sembrar el hongo en dos medios de cultivo específico para el género: Agar Czapek Levadura (CYA) ( $\text{NaNO}_3$  3 g; extracto de levadura 5 g; sacarosa 3 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  1.3 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g; KCl 0.5 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0.01 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.005 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0.01 g; agar 15 g; agua 1000 mL; pH 6.3) y Agar Extracto de Malta (MEA) (Extracto de malta 30 g; bactopectona 1 g; glucosa 20 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; agar 20 g; agua 1000 mL; pH 5.3). Posteriormente, en un periodo de siete días, se midieron las siguientes características macromorfológicas: el diámetro, coloración de la colonia y coloración al reverso de la colonia; y micromorfológicas como la presencia de conidios, fiálides, ramificación, conidióforos, cleistotecios y esclerocios. Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos del Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures) de la Real Academia de Ciencias y Artes de Los Países Bajos.

**Extracción de ADN.** Para la extracción del ADN, se utilizó el micelio de una colonia crecida durante tres días en medio MEA. El ADN se extrajo siguiendo la técnica de Ahrens y Seemuller (1992), la cual consiste en tomar

bactopectone; 20 g glucose; 0.005 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 20 g agar; 1000 mL water; pH 5.3). Subsequently, after seven days, the following macromorphological characteristics were measured: diameter, coloration of the colony and discoloration on the back of the colony; as for micromorphological characteristics: presence of conidia, phialides, branching, conidiophores, cleistothecia and sclerotia were measured. The results obtained were compared with the database of Fungal Biodiversity Centre (CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures) of the Royal Academy of Sciences and Arts of the Netherlands.

**DNA extraction.** For DNA extraction, the mycelium of a colony grown during three days in MEA was used. DNA was extracted following the Ahrens and Seemuller (1992) technique which involves taking the growing mycelium in culture medium. Mycelia was placed in a mortar and homogenized with 1 ml of CTAB extraction buffer (1M Tris, pH = 8; NaCl 5M; EDTA 5M, pH 8; CTAB 2 %, PVP 1 %); then it was incubated at 65 °C during 30 minutes. The quantity and quality of extracted DNA was determined by measuring absorbance at 260 and 280 nm wavelength on an Eppendorf 6131 BioPhotometer; integrity was verified by electrophoresis in 1 % agarose gels stained with ethidium bromide. DNA samples were stored at -20 °C for later use.

**Amplification of a fragment of the ITS 1 / ITS 2 regions.** An internal fragment of the ITS1 and ITS2 (Internal Transcribed Spacer) regions was amplified between the ribosomal genes (rDNA) 18S - 5.8S and using the following primers: 5.8S - 28S ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). System used was Promega Go Taq Flexi DNA Polymerase and the reaction mixture was made of the following concentrations for each component: 1x Go Taq Flexi Buffer, 2  $\mu$ M  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu$ M dinucleotide triphosphate (dNTP's), 1 U Go Taq Polymerase, 0.2  $\mu$ M of each primer, 200 ng of *Penicillium* sp. DNA and sterile nanopure water to complete a total volume of 50  $\mu$ L. Amplifications were done with an initial cycle of 2 min to activate the enzyme; 35 cycles that included: denaturation at 95 °C for 1 min, alignment at 57 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min; and lastly, one final extension cycle at 72 °C for 10 min.

All Polymerase Chain Reactions (PCR) were carried out on a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, Mexico), amplifications were checked by gel electrophoresis on a 1 % agarose prepared with Tris-Acetate-EDTA 1x and run in the same buffer at 87 V  $\text{cm}^{-3}$  about 1 h. The gel was stained with 1 ml of ethidium bromide (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) and bands were visualized on a UV transilluminator.

**Sequencing of the amplified fragment.** The PCR product obtained with ITS 1/ITS 4 primers was verified by 1 % agarose gel electrophoresis, observing a band of 590 bp. Then, the amplified fragment was purified with the wizard SV Gel system and PCR Clean-Up System (Promega Cat. A9281 Madison, WI, USA). Sequencing was performed by capillary electrophoresis with an ABI PRISM 310 automated sequencer (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems) at the Molecular Biology Unit of the Institute of



micelio en crecimiento en el medio de cultivo. El micelio se depositó en un mortero y se homogenizó con 1 mL de buffer de extracción CTAB (Tris 1 M, pH = 8; NaCl 5 M; EDTA 5 M, pH 8; CTAB 2 %, PVP 1 %); posteriormente, se incubó a 65 °C durante 30 min. La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en un biofotómetro 6131 Eppendorf; la integridad, se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

**Amplificación de un fragmento de las regiones ITS 1 / ITS 2.** Se amplificó un fragmento de las regiones internas ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer) entre los genes ribosomales (ADNr) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S al utilizar los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Se utilizó el sistema Promega Go Taq Flexi DNA Polymerase y la mezcla de reacción se llevó a las siguientes concentraciones de cada uno de los componentes: 1 X de Go Taq Flexi Buffer, 2 µM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dinucleótidos trifosforados (dNTP's), 1 U de Go Taq Polymerase, 0.2 µM de cada iniciador, 200 ng de ADN de *Penicillium* sp. y el resto de agua nanopura estéril, para un volumen total de 50 µL. La amplificación se realizó con un ciclo inicial de 2 min para la activación de la enzima; 35 ciclos que comprendieron: desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 57 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 2 min; finalmente, un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Todas las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % preparado con amortiguador Tris - Acetato - EDTA 1X y corrido en el mismo amortiguador a 87 V cm<sup>-3</sup> aproximadamente 1 h. El gel se tiñó con 1 µL de bromuro de etidio (10 mg mL<sup>-1</sup>) y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

**Secuenciación del fragmento amplificado.** El producto de PCR obtenido con los iniciadores ITS 1/ITS 4 se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, observándose una banda de 590 pb. Posteriormente, el fragmento amplificado con los iniciadores se purificó con el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Cat. A9281 Madison, WI, USA). La secuenciación se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con una búsqueda de secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov).

## RESULTADOS

### Aislamiento del microorganismo fitopatógeno.

De las muestras de tallos de tomate con síntomas de pudrición, consistentemente se aisló un microorganismo de tipo fúngico. Las colonias del hongo en medio PDA

Cellular Physiology, UNAM. The nucleotide sequence obtained was compared with a search for homologous sequences using the BLASTX algorithm (Altschule *et al.*, 1990), in the database of the NCBI gene bank (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov.gov).

## RESULTS

**Phytopathogenic microorganism isolation.** From the samples with tomato stem rot symptoms, a microorganism of the fungal type was consistently isolated. Fungus colonies on PDA medium showed a bluish green color and a growth diameter of 40 mm after seven days. *Poxal220108* key was assigned to a representative fungal isolate as a reference for subsequent pathogenicity tests and morphological and molecular characterization.

**Pathogenicity tests.** The stems of tomato plants that were artificially inoculated with the fungus strain *poxal220108* and that were kept under high humidity conditions, showed rot symptoms similar to those observed in the field (Figure 1b). From the reisolates of the infected stems, colonies and fungal structures similar to the inoculated fungus (Figure 2a) were obtained, which confirmed pathogenicity of the inoculated fungal isolate. Reisolation of *Penicillium* sp. occurred only in plants with characteristic symptoms of this rot, inoculated plants with the disk medium remained healthy. Fruits inoculation showed that the fungus can potentially infect fruits in which a wound had occurred since in all inoculated fruits, after three days of inoculation, a rot was observed and then mycelium and sporulation of the fungus was observed. Fruits with sterile distilled water on the wounds, remained healthy.

**Morphological identification.** According to the database of the Fungal Biodiversity Center (CBS), the causal agent of stem rot and tomato plants death is the fungus *Penicillium oxalicum*. The growth characteristics of *P. oxalicum* in MEA medium are: colony diameter 30 mm with white coloring on the edges and bluish green towards the center (Figure 2b); in contrast, the growth in CYA medium, colony diameter was 40 mm with creamy white edges and pale brown towards the center. The observed branching pattern was biverticillate. The stipe showed 220 µm length x 5 µm wide, with two verticils. The phialides were ampulliform. Conidia measured 4.24 µm x 3.02 µm, ellipsoidal shape, smooth and in columns. *Poxal220108* isolate was deposited at the National Microbial and Cell Cultures Collection at CINVESTAV-IPN.

**Molecular identification.** The comparative analysis of the amplified DNA sequence was of 545 bp, it contained part of ITS1, the complete sequence of 5.8 s rRNA and part of ITS2 showed 99 % homology with various sequences of the ITS of several *Penicillium oxalicum* isolates (Gene Bank access no. AB378505, AB485602, DQ123663). The sequence of the amplified fragment was deposited at the NCBI database with access number HM452308.

## DISCUSSION

Stem rot causes greenhouse tomato production

mostraron un color verde azulado y un diámetro de crecimiento de 40 mm a los siete días. Se asignó la clave *poxal220108* a un aislamiento fúngico representativo como referencia para las posteriores pruebas de patogenicidad y caracterización morfológica y molecular.

**Pruebas de patogenicidad.** Los tallos de plantas de tomate que se inocularon artificialmente con la cepa del hongo *poxal220108* y que se mantuvieron en condiciones de alta humedad relativa mostraron síntomas de pudrición similares a los observados en campo (Figura 1b). De los reaislamientos, de los tallos enfermos se obtuvieron colonias y estructuras fúngicas similares a las del hongo inoculado (Figura 2a), lo que confirmó la patogenicidad del aislamiento fúngico inoculado. El reaislamiento de *Penicillium* sp. ocurrió sólo en plantas en las que se observaron los síntomas característicos de esta pudrición, las plantas inoculadas con el disco de medio de cultivo permanecieron sanas. La inoculación en frutos mostró que el hongo potencialmente puede infectar a frutos en los que haya ocurrido una herida ya que en todos los frutos inoculados, a los tres días después de la inoculación, se observó una pudrición y posteriormente se observó el micelio y esporulación del hongo. Los frutos en los que se depositó en la herida agua destilada esterilizada permanecieron sanos.

**Identificación morfológica.** De acuerdo con la base de datos del centro de biodiversidad de hongos (CBS), el agente causal de la pudrición de tallos y muerte de plantas de tomate es el hongo *Penicillium oxalicum*. Las características de crecimiento de *P. oxalicum* en medio MEA son: diámetro de la colonia de 30 mm con coloración blanco en las orillas y verde azulado hacia el centro (Figura 2b); en contraste, el crecimiento en medio CYA el diámetro de la colonia fue de 40 mm con una coloración blanco cremoso en las orillas y café pálido hacia el centro. El patrón de ramificación observado fue biverticilado. La estipe mostró una longitud de 220  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  de ancho, con 2 verticilios. Las fiáldes fueron ampuliformes. Los conidios midieron 4.24  $\mu\text{m}$  x 3.02  $\mu\text{m}$ , de forma elipsoidal, lisos y en columnas. El aislamiento *poxal220108* fue depositado en la Colección Nacional Microbiana y de Cultivos Celulares del CINVESTAV-IPN.

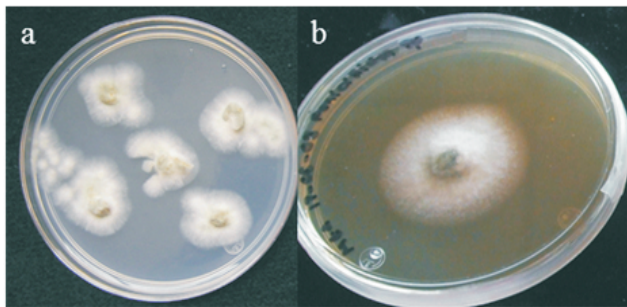


Figura 2. Colonias de *Penicillium*. a) Desarrolladas en PDA a partir de tejidos infectados resultantes de inoculación artificial y b) en medio de cultivo MEA.  
Figure 2. *Penicillium* colonies. a) Developed in PDA from infected tissues resulting from artificial inoculation and b) in MEA culture medium.

losses that have not yet been quantified. *Penicillium oxalicum* species had not been reported as a pathogen of tomato fruits in Mexico, although there is a report of rot caused by this species in tomato stems in Japan (Umamoto *et al.*, 2009) and in tomato fruits in Korea (Kwon *et al.*, 2008). *Penicillium oxalicum* Currie & Thom also has been associated with stem rot on greenhouse cucumber in Canada (Jarvis *et al.*, 1990) and in England, Holland, Denmark, Sweden and Norway (O'Neill *et al.*, 1991). The resulting symptoms include brown lesions in the basal part of the plant with a fungus sporulation in blue-green color and then the death of the plant (Jarvis and Ferguson, 1992).

In the characterization by molecular techniques, the PCR-amplified fragment with ITS1/ITS4 primers was of 545 bp, which coincides with that reported by Chen *et al.*, (2001) who used the ITS of these rDNA regions to identify medically important yeast and Umamoto *et al.* (2009), who obtained a 100 % homology in the identification of *Penicillium* species, using sequencing of intergenic regions. Regarding the comparative analysis of the sequences with the NCBI database, the limitation of analyzing nucleotide sequences obtained from rDNA, including *Penicillium* spp. is the presence of polymorphisms. For example, Dupont *et al.* (2006) were able to only identify 35 isolates from a group of group 60 when they used for PCR amplification of the ITS region and a group of restriction enzymes. This suggests that molecular biology studies are helping to understand the phylogeny of the genus *Penicillium*, but reach a monophyletic classification of the mitosporic fungi would be complicated because it would not often correspond



Figura 3. Síntomas de pudrición por *Penicillium* en frutos de tomate a los cinco días después de la inoculación artificial. Los frutos fueron heridos con una aguja de disección estéril y posteriormente una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *Penicillium* sp. fue depositada en la herida.

Figure 3. *Penicillium* rot symptoms in tomato fruits after five days of artificial inoculation. Fruits were wounded with a sterile dissection needle and then a 20  $\mu\text{L}$  aliquot at a concentration of  $1 \times 10^6$  spores / mL of *Penicillium* sp. was deposited in the wound.

Cuadro 1. Comparación de resultados obtenidos a partir de muestras aisladas con *Penicillium oxalicum* (Samsom *et al.* 2004).

Table 1. Comparison of results obtained from samples isolated with *Penicilliumoxalicum* (Samsomet *al.* 2004).

Caracteres	<i>Penicillium</i> sp. <i>Poxal220108</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
<i>Medio YA*25 °C</i>		
Diámetro colonia	37 mm	35-60
Coloración de colonia	Blanco-crema	Blanco-crema
Coloración al reverso de la colonia	Blanco-crema	Blanco-crema
<i>Medio MEA** 25 °C</i>		
Diámetro de la colonia	29 mm	20-50
Coloración de la colonia	Blanco-crema	Blanco-crema
Coloración al reverso de la colonia	Blanco-crema	Amarillo
<i>Conidios</i>		
Longitud	4.24 µm	5-7 µm
Ancho	3.02 µm	2.5-4µm
Forma	Elipsoidal	Elipsoidal
Ornamentos	Liso	Liso
<i>Fiálides</i>		
Forma	Ampuliforme	Ampuliforme
<i>Vesícula apical</i>	Ausente	Ausente
<i>Estipe</i>		
Longitud	220 µm	200-400 µm
Ancho	5 µm	3.5-5 µm
Ornamentos	Liso	Liso
Ramificación	Biverticilada	Monoverticilada, Biverticilada
<i>Cleistotecios</i>	Ausente	Ausente

\*Agar Czapek Levadura

\*\*Agar Extracto de Malta

**Identificación molecular.** El análisis comparativo de la secuencia de ADN amplificado fue de 545 pb, contuvo parte del ITS1, la secuencia completa del 5.8 s ARNr y parte del ITS2 y mostró máxima identidad con secuencias del ITS de varios aislamientos de *Penicillium oxalicum* (Gen Bank no. acceso AB378505, AB485602, DQ123663). La secuencia del fragmento amplificado se depositó en la base de datos del NCBI con el número de acceso HM 452308.

## DISCUSIÓN

La pudrición de tallos de tomate de invernadero ocasiona pérdidas en la producción que aun no han sido cuantificadas. La especie *Penicillium oxalicum* no se había reportado como patógeno de frutos de tomate en México, aunque existe un reporte de pudrición causada por esta especie en tallos de tomate en Japón (Umamoto *et al.*, 2009) y en frutos de tomate en Korea (Kwon *et al.*, 2008). *Penicillium oxalicum* Currie & Thom también se ha asociado con pudriciones de tallos en pepino de invernadero en Canadá (Jarvis *et al.*, 1990) y en Inglaterra, Holanda,

with existing morphological classification (Peterson, 2000). In the present study, the use of morphological and molecular characteristics complement each other and confirm the identification of the *Penicillium* species involved in the stems disease and tomato fruits.

## CONCLUSIONS

The morphological identification and by molecular techniques coincided in assign *Penicillium oxalicum* as the causal agent of stem rot and death of tomato plants. This is the first report in Mexico that demonstrates the potential of *Penicilliumoxalicum* to cause infections in postharvest tomato fruits.

## LITERATURA CITADA

- Ahrens U and Seemuller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rDNA gene. *Phytopathology* 82:828- 832.
- Altschul S, Gish W, Miller, W, Meyer E and Lipman D.



Dinamarca, Suecia y Noruega (O'Neill *et al.*, 1991). Los síntomas ocasionados incluyen lesiones color café en la parte basal de la planta con una esporulación del hongo en color azul-verdoso y posteriormente la muerte de la planta (Jarvis y Ferguson, 1992).

En la caracterización mediante técnicas moleculares, el fragmento amplificado por PCR con los iniciadores ITS1/ITS4 resultó de 545 pb, lo cual coincide con lo reportado por Chen *et al.* (2001) quienes utilizaron los ITS de estas regiones del ADNr para identificar levaduras de importancia médica y Umemoto *et al.* (2009), quienes obtuvieron una homología del 100 % en la identificación de especies de *Penicillium*, al utilizar la secuenciación de regiones intergénicas. En cuanto al análisis comparativo de las secuencias con la base de datos del NCBI, la limitante de analizar las secuencias de nucleótidos obtenidas del ADNr, en particular de *Penicillium* spp. es la presencia de polimorfismos. Por ejemplo, Dupont *et al.* (2006) solamente identificaron la especie en 35 aislamientos, de un grupo de 60, cuando utilizaron la amplificación por PCR de la región del ITS y la utilización de un grupo de enzimas de restricción. Esto sugiere que los estudios de biología molecular están ayudando a comprender la filogenia de las especies del género *Penicillium*, pero llegar a establecer una clasificación monofilética de los hongos mitospóricos, sería complicado ya que ésta no correspondería en muchas ocasiones, con la clasificación morfológica existente (Peterson, 2000). En nuestro estudio la utilización de características morfológicas y moleculares se complementan y confirman la identificación de la especie de *Penicillium* involucrada en la enfermedad en tallos y frutos de tomate.

## CONCLUSIONES

La identificación morfológica y por técnicas moleculares coincidieron en asignar a *Penicillium oxalicum* como el agente causal de la pudrición de tallos y muerte de plantas de tomate. Este es el primer reporte en México que demuestra el potencial de *Penicillium oxalicum* para causar infecciones en frutos de tomate en poscosecha.

1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Chen Y, Eisner J, Kattar M, Rassoulia K, Uyen B and Limaye A. 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 4042-4051.

Dupont J, Dennetière B, Jacquet C and Roquebert M. 2006. PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. *Revista Iberoamericana de Micología* 23: 145-150.

Jarvis W, Barrie SD, Traquair JA and Stoessl A. 1990. Morphological and chemical studies of *Penicillium oxalicum*, newly identified as a pathogen on greenhouse cucumbers. *Canadian Journal of Botany* 68:21-25.

Jarvis W and Ferguson M. 1992. A survey of *Penicillium* stem rot on greenhouse cucumbers in southwestern Ontario. *Canadian Plant Disease* 72:103-106.

Kwon JH, Shen SS and Jee, HJ. 2008. Occurrence of blue mold on tomato caused by *Penicillium oxalicum* in Korea. *Plant Pathology Journal* 24:87-89.

Larena I and Melgarejo P. 2009. Development of a method for detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* strain 212 by combining PCR and a selective medium. *Plant Disease* 93:919-928.

O'Neill TM, Bagabe M and Ann DM. 1991. Aspects of biology and control of a stem rot of cucumber caused by *Penicillium oxalicum*. *Plant Pathology* 40:78-84.

Peterson S. 2000. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. Pp: 163-178. *In: Samsom R and Pitt J (eds.)*. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Publisher, Amsterdam. 510 p.

Picos-Munoz PA, Garcia-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J and Allende-Molar R. 2011. First report of *Penicillium oxalicum* in tomato (*Solanum lycopersicum*) in Mexico. *Plant Disease* 95:1195.

Pitt JI. 1979. The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, UK. 634 p.

Samson RA, Hoekstra ES and Frisvad JC. 2004. Introduction to Food-and Airborne Fungi. Ed. 7 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Holanda. 389 p.

SIAP. 2012. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) (consulta, octubre 2012).

Umemoto S, Odake Y, Takeuchi T, Yoshida S, Tsushima S and Koitabashi M. 2009. Blue mold of tomato caused by *Penicillium oxalicum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75:399-400.

White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. *In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J and White T (eds.)*. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press Inc. 482 p.