



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO DE *PHYTOPHTHORA  
CAPSICI* EN CHILE (*CAPSICUM ANNUUM* L.) POR *TRICHODERMA* SPP.**

**PRESENTA**

**Biol. Estefania Ramírez Delgado**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**TUTOR**

**Dr. José de Jesús Luna Ruíz**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Onésimo Moreno Rico  
Dr. José Luis Hernández Mendoza**

**Aguascalientes, Ags., Noviembre del 2015**

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes** por todo el apoyo brindado durante el proceso de maestría.

Al **Laboratorio de Biología Experimental** y a todo el personal que labora en el **Centro de Biotecnología Genómica**, del **Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN)** por el apoyo y facilidades brindadas para la realización de parte de ésta tesis.

Al **Laboratorio de Fisiología e Investigación Veterinaria** a cargo del **Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores** por haber mostrado siempre la mejor disponibilidad para ayudarme.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada con el número 286770.

Al comité tutorial **Dr. José de Jesús Luna Ruiz, Dr. Onésimo Moreno Rico y al Dr. José Luis Hernández Mendoza** por todo el apoyo y paciencia al darme bases firmes para mi formación profesional.

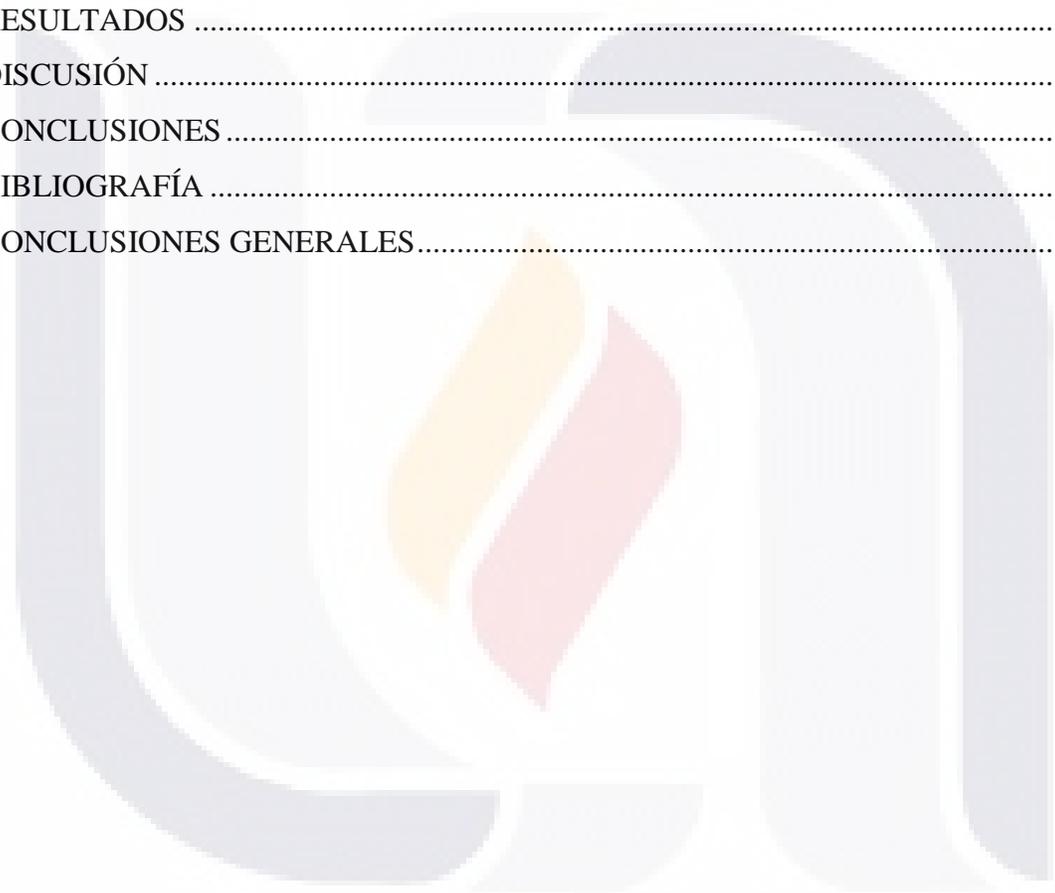
Al **Dr. Rodolfo Velásquez Valle** por su continua retroalimentación al proyecto de tesis en cada seminario.

A mis compañeros de maestría por haber hecho de éste recorrido algo tan ameno.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	1
ÍNDICE DE CUADROS .....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	4
ACRÓNIMOS .....	5
RESUMEN .....	6
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
JUSTIFICACIÓN .....	14
OBJETIVOS .....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos .....	15
HIPÓTESIS .....	16
Hipótesis general .....	16
Hipótesis específicas.....	16
MARCO TEÓRICO .....	17
CAPÍTULO I. SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> Y <i>Phytophthora capsici</i> .....	27
INTRODUCCIÓN .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS .....	34
DISCUSIÓN .....	45
CONCLUSIONES .....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49
CAPÍTULO II. PRUEBAS DE ANTAGONISMO EN PLANTA.....	55
INTRODUCCIÓN .....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
RESULTADOS .....	66

DISCUSIÓN .....	73
CONCLUSIONES .....	76
BIBLIOGRAFÍA .....	77
CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DEL PATOSISTEMA: PATÓGENO-ANTAGONISTA-PLANTA.....	
INTRODUCCIÓN .....	81
MATERIALES Y MÉTODO .....	84
RESULTADOS .....	86
DISCUSIÓN .....	92
CONCLUSIONES .....	94
BIBLIOGRAFÍA .....	95
CONCLUSIONES GENERALES.....	96



## ÍNDICE DE CUADROS

No.	Contenido	Página
1.1	Lista de casos de <i>Trichoderma</i> como agentes de control.....	21
1.2	Crecimiento medio (mm) de <i>Trichoderma</i> spp. confrontada con <i>P. capsici</i> cada 12 h.....	37
1.3	Crecimiento promedio (mm) de <i>P. capsici</i> (RES y RDP1) cada 12 h en presencia de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
1.4	Prueba de Tukey para comparación de medias del número de esporangios observados por campo, en presencia y ausencia de cada antagonista en el medio.....	44
2.1	Tratamientos incluidos en el experimento.....	62
2.2	Distribución de charolas y tratamientos para la producción de planta.....	64
2.3	Promedio de necrosis basal en planta de chile de diferente tratamiento...	66
2.4	Comparación de medias de necrosis basal, según el tipo de inoculación de <i>T. koningiopsis</i> .....	67
2.5	Comparación de medias de necrosis basal, según el tipo de inoculación de <i>T. harzianum</i> .....	68
2.6	Comparación de medias de necrosis basal, según el tipo de inoculación de <i>T. koningiopsis</i> y <i>T. harzianum</i> .....	68
2.7	Promedio del nivel de marchitez en planta de chile con diferentes tratamientos.....	70
2.8	Promedio del grosor de las plantas de acuerdo a dds, antagonismo y tipo de inoculación.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Contenido	Página
1.1	Laminilla de acetato cuadrículada sobre los discos con micelio.....	33
1.2	Morfología microscópica de las cepas obtenidas de <i>P. capsici</i> .....	34
1.3	Visualización de ADN genómico en gel de agarosa al 1%.....	35
1.4	Imagen del programa BLASTn.....	36
1.5	Cultivos duales de <i>T. harzianum</i> y <i>P. capsici</i> .....	39
1.6	Cultivos duales de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>P. capsici</i> .....	40
1.7	Microfotografía de la interacción entre los micelios de <i>Trichoderma</i> y <i>P. capsici</i> .....	41
1.8	Hifa de <i>T. koningiopsis</i> hiperparasitando a <i>P. capsici</i> .....	43
1.9	Promedio de esporangios producidos por las dos cepas de <i>P. capsici</i> (RDP1 y Res) en presencia y ausencia de los tres antagonistas.....	44
2.1	Ciclo de la marchitez del chile causado por <i>P. capsici</i> .....	60
2.2	Tamaño de las lesiones necróticas causadas por <i>P. capsici</i> , en plantas de chile según su tipo de inoculación y tratamiento.....	68
2.3	Niveles de marchitez causadas por <i>P. capsici</i> , en plantas de chile según su tipo de inoculación y tratamiento.....	70
2.4	Altura de las plantas a los 22, 44 y 60 dds, de acuerdo al tipo de inoculación y antagonista.....	73
3.1	Microfotografía de una radícula de chile cubierta por micelio de <i>P. capsici</i> .....	87
3.2	Microfotografía de epidermis de la radícula de una plántula de chile..	88
3.3	Microfotografía de la zona aumentada de penetración de las hifas de <i>P. capsici</i> al tejido de la plántula.....	89
3.4	Orificios en el tejido de la radícula por donde penetran las hifas de <i>P. capsici</i> .....	89
3.5	Micelio recubriendo la epidermis de la radícula.....	90
3.6	Hifas de <i>T. harzianum</i> y <i>T. koningiopsis</i> .....	90
3.7	Atrofia celular en las plántulas inoculadas con <i>P. capsici</i> y <i>Trichoderma</i> .....	91
3.8	Micelios de <i>T. koningiopsis</i> y <i>P. capsici</i> , después de 8 h de incubación y de <i>T. harzianum</i> y <i>P. capsici</i> a las 4 h de inoculación....	92

## ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFA	Alcohol, formol y ácido acético
bp	Pares de bases
CBG	Centro de Biotecnología Genómica
CCB	Centro de Ciencias Básicas
dds	Días después de la siembra
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IPN	Instituto Politécnico Nacional
h	Horas
LBE	Laboratorio de Biología Experimental
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
ml	Mililitros
mm	Milímetros
rpm	Revoluciones por minuto
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TA	Temperatura Ambiente
T.k + T. h	<i>Trichoderma koningiopsis</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>
TM	Temperatura Media
V8-A	V8-Agar
µl	Microlitros
µm	Micras

## RESUMEN

La marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici* es un grave problema en México como en el resto del mundo debido a las pérdidas económicas y al uso inadecuado e indiscriminado de los fungicidas que han generado resistencia en el patógeno, contaminación ambiental y toxicidad. Ello ha motivado la búsqueda de métodos alternativos, efectivos y no perjudiciales para su manejo. El control biológico mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta no química para la protección de los cultivos, lo que ha provocado que se intensifiquen los esfuerzos por detectar microorganismos con potencial como agentes de control. Por ello, en éste trabajo de tesis se evaluó la capacidad de *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma harzianum* como agentes de control biológico de *Phytophthora capsici* en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.), así como las interacciones en el patosistema, siguiendo los siguientes objetivos: 1. Seleccionar dos especies del género *Trichoderma* con base a su antagonismo *in vitro*; 2. Evaluar la efectividad individual y combinada de las cepas seleccionadas; 3. Comparar la efectividad de diferentes métodos de inoculación de los antagonistas contra *P. capsici* en plantas de chile y 4. Analizar las interacciones entre antagonista, patógeno y hospedero con el uso de microscopia electrónica de barrido (MEB). El documento se divide en tres capítulos; en el primero se abordan las pruebas *in vitro* para la selección de dos especies de *Trichoderma*, para lo cual primero se aislaron e identificaron dos cepas de *P. capsici* a partir de plantas de chile ancho con marchitez en campo. Se hicieron pruebas con repeticiones de cultivos duales para evaluar el antagonismo de *T. harzianum* (Th-7), *T. koningiopsis* (HTE 808) y *T. asperellum* (NRRL 50191) contra *P. capsici* considerando el crecimiento de los antagonistas y del patógeno como controles. Se registró el crecimiento de ambas colonias cada 12 h hasta el contacto entre las mismas. También se realizaron conteos de esporangios de *P. capsici* en la zona de contacto entre micelios. Los tres antagonistas detuvieron el crecimiento del patógeno al entrar en contacto, pero solo en *T. asperellum* y *T. koningiopsis* se observó hiperparasitismo. *T. harzianum* mostró la mayor velocidad de crecimiento individual y confrontado con *P. capsici*, en tanto que *T. koningiopsis* mostró el mayor efecto inhibitorio en la esporulación del patógeno. Con base en lo anterior, *T. harzianum* y *T. koningiopsis* fueron las dos cepas seleccionadas para las

pruebas de antagonismo en planta. Los objetivos del capítulo 2 consistieron en evaluar la efectividad de dos especies de *Trichoderma* como controladores biológicos de *P. capsici* en plantas de Chile y comparar tres métodos de inoculación de los antagonistas (en semilla, en planta y en semilla+planta). Los dos antagonistas fueron aplicados de manera individual y combinada en semilla (antes de la siembra) y en planta de Chile tipo Húngaro (susceptible a *P. capsici*). Las plantas de Chile fueron posteriormente inoculadas con 5 ml de una suspensión ajustada a 2000 zoosporas ml<sup>-1</sup> de *P. capsici* (cepa RES). Como variables de respuesta asociadas a la protección por *Trichoderma* spp. se registró el tamaño de la lesión necrótica basal (mm) por planta y la severidad de marchitez por planta usando una escala de 0 (planta sana, sin marchitez) a 4 (planta muerta por marchitez). Para evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. sobre el vigor de la planta se registró la altura y grosor del tallo basal por planta antes de la inoculación con *P. capsici*. Los resultados del capítulo 2 mostraron que *T. koningiopsis* es la que más disminuye la marchitez por *P. capsici* cuando es inoculada en semilla, mientras que *T. harzianum* fue más eficiente cuando se inoculó en semilla y en planta. El tratamiento con los dos antagonistas mezclados no resultó eficiente. Tampoco se observó mejora en el vigor de las plantas tratadas con las dos especies de *Trichoderma* solas o combinadas. Finalmente, en el tercer capítulo el objetivo consistió en documentar las interacciones entre antagonista-patógeno y hospedero utilizando microscopía electrónica de barrido. Se obtuvieron microfotografías que muestran la interacción entre *Trichoderma* y *P. capsici*, y entre *P. capsici* y raíces de *C. annuum*. Se utilizaron plántulas de Chile que fueron inoculadas con los antagonistas y *P. capsici* por separado. Se incubaron y se fijó el tejido en AFA a las 0, 2, 4 y 8 h de incubación. Parte de las plántulas fueron inoculadas con *Trichoderma* por inmersión en una solución de zoosporas y después incubadas para ser fijadas a las 2, 4 y 8 h de incubación. Las muestras fueron procesadas y observadas en el MEB. Se observó una atrofia celular en las plantas por la presencia de *Trichoderma* y *P. capsici*. Es probable que *P. capsici* utilice las lenticelas como acceso a la planta y que *Trichoderma* utilice un arsenal enzimático para penetrar el tejido. El proceso de infección en la planta ocurre dentro de los 30 minutos después de la inoculación. Los resultados de la tesis permitieron derivar las siguientes conclusiones generales: Las cepas de *T. koningiopsis* (HTE 808) y *T. harzianum* (Th-7), tienen características deseables para ser empleados como controladores biológicos de *P. capsici*. Sin embargo, deberán ser parte de

un manejo integrado, ya que no confieren una protección del 100% contra el patógeno. Además, una mejor comprensión del funcionamiento de los mecanismos involucrados en el patosistema podría estimular el desarrollo de nuevas biotecnologías que nos acerquen al manejo de enfermedades y por ende a la mejora en la producción de diversos cultivos, sin que con ello se cause un daño al ecosistema.

**Palabras clave:** *Phytophthora capsici*, *Trichoderma*, control biológico, marchitez del chile



## ABSTRACT

Chili pepper wilt caused by *Phytophthora capsici* is a serious problem in Mexico, as well as in the rest of the world, due to the economic losses and the inadequate and indiscriminate use of fungicides that have generated resistance in the pathogen, environmental contamination, and toxicity. That has motivated the search for alternative methods that are effective and not harmful for it's managed. The biological control by means of antagonistic organisms represents a valuable non-chemical tool for the protection of the crops, which has provoked intensification in the efforts to detect microorganisms with potential as control agents. This is why the capacity of *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma harzianum* as agents of biological control of *Phytophthora capsici* in chili plants (*Capsicum annuum* L.), and the interactions in the pathosystem, were evaluated in this thesis, following these objectives: 1. Selection of the two strains of the genus *Trichoderma* based on their *in vitro* antagonism 2. Evaluate the effectivity of the selected strains, both individually as well as combined. 3. Compare the effectivity of different inoculation methods of the antagonists against *P. capsici* in chili plants, and 4. Analyze the interactions among the antagonist, pathogen and the host, with the use of the electronic microscope. In this manner, the document is divided into 3 chapters. In the first one, the *in vitro* studies for the selection of the two *Trichoderma* spp. strains are approached, for which two strains of *P. capsici* were isolated and identified from "chile ancho" plants with wilt in the field. Trials were made with repetitions of dual culture to evaluate the antagonism among *P. capsici* with strains of *T. harzianum* (Th-7), *T. koningiopsis* (HTE 808) and *T. asperellum* (NRRL 50191), and the individual growth of the antagonists and the pathogen as controls was considered. The growth of the colonies was registered every 12 hours until contact among them. Counts of *P. capsici* sporangium in the contact zone between mycelia were also performed. The three antagonists stopped the growth of the pathogen upon contact, but only in *T. asperellum* and *T. koningiopsis* was hyperparasitism observed. *T. harzianum* showed the most growth, alone and in confrontation with *P. capsici* and *T. koningiopsis* had the biggest inhibitory effect in the sporulation of the pathogen. For all the above reasons, *T. harzianum* and *T. koningiopsis* were the two selected strains for the essays of antagonism in plants. The objectives of the chapter 2 consisted on evaluating the effectivity of the two

strains of *Trichoderma* as biological controllers of *P. capsici* in chili plants and comparing three methods of inoculation of the antagonists ( in seed, in plant and in seed + plant). The two antagonists were applied individually and combined in seed (before sowing) and in plants of Hungarian-type chili (susceptible to *P. capsici*). The chili plants were later inoculated with 5 ml of a zoospore suspension adjusted to 2000 *P. capsici* zoospores per ml (RES strain). As the variables associated to *Trichoderma* spp., the size of the necrotic lesions (mm) and the severity of wilting per plant were registered using a scale from 0 (healthy plant, without wilt) to 4 (dead plant for wilt). To evaluate the effect of *Trichoderma* spp. in the vigor of the plant, the height and width were registered before being inoculated with *P. capsici*. The results of chapter 2 showed that *T. koningiopsis* is the one that most decreases wilt caused by *P. capsici* when it is inoculated in seed, while *T. harzianum* was the most effective when it was inoculated in seed and in plant. The treatments that included the two antagonists did not show efficiency. Neither an improvement on the vigor of the plants treated with the species of *Trichoderma* (alone or in combination) was shown. Lastly, in the third chapter the objective consisted in documenting the interactions among antagonist-pathogen and host using electronic microscopy. Photomicrographs were obtained that show the interaction between *Trichoderma* and *P. capsici* and between *P. capsici* and *C. annuum* roots. Chili seedlings inoculated separately with antagonists and *P. capsici* were used. They were incubated and the tissue in AFA was set at 0, 2, 4, and 8 hours of inoculation. Part of the seedlings was inoculated with *Trichoderma*, treated by immersion in a zoospore solution, and afterwards incubated to be set at 2, 4, and 8 hours of incubation. The samples were processed and observed in the electronic microscope. A cellular atrophy was observed in the plants by the presence of *Trichoderma* and *P. capsici*. It is probable that *P. capsici* uses the lenticels as access to the plant and that *Trichoderma* uses an enzymatic arsenal to penetrate the tissue. The infection process occurs during the first 30 min after the inoculation. The results of the thesis allowed the derivation of the following general conclusions: The strains of *T. koningiopsis* (HTE 808) and *T. harzianum* (Th-7), have desirable characteristics to be used as biological controls of *P. capsici*; nevertheless, they must be part of an integrated management, because they don't confer 100 % protection. Also, a better comprehension of the operation of the mechanisms involved in the pathosystem could stimulate the development of new biotechnologies that take us closer

to disease control, and therefore, to the improvement in the production of different crops, without this causing harm in the ecosystem.

**Key words:** *Phytophthora capsici*, *Trichoderma*, biological control, chili wilt



## INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en México. En la región norte-centro del país, la marchitez causada por *Phytophthora capsici*, es uno de los principales problemas fitopatológicos al que se enfrenta (Castro y col., 2012). Ésta es una enfermedad que además de las pérdidas directas por las mermas de producción, ocasiona también daños indirectos por el empleo desmesurado de fungicidas que resultan ineficientes por la presión selectiva que se ha ejercido sobre el fitopatógeno.

Con las condiciones ambientales favorables, durante la temporada de lluvias o durante el riego *P. capsici* produce una gran cantidad de zoosporas que son los propágulos más efectivos para causar una infección (Lamour y col., 2012; Nuez y col., 2003).

Debido a la resistencia que *P. capsici* ha mostrado a diversos fungicidas, (Silva-Rojas y col., 2009; Fernández-Pavía y col., 2004; Pérez-Moreno y col., 2003) se ha comenzado con la búsqueda de estrategias alternativas de control, como el uso de cultivares genéticamente resistentes y el control biológico. Entre los microorganismos más utilizados como agentes de control biológico se encuentran los hongos del género *Trichoderma* (Fernández-Herrera y col., 2007).

La habilidad de *Trichoderma* para reducir los daños causados por hongos fitopatógenos, está relacionada con su capacidad de competencia, micoparasitismo y antibiosis por la producción de enzimas y metabolitos secundarios (Michel-Aceves y col., 2005). Su capacidad *in vitro* para inhibir el desarrollo de *P. capsici* ya ha sido comprobada, así como para reducir la incidencia de la enfermedad de marchitez (Ezziyyani y col., 2004).

A pesar del extenso número de investigaciones que se han dedicado al estudio de los diversos mecanismos antagónicos que posee *Trichoderma*, son relativamente pocas las especies que se han evaluado, además que la mayoría de éstos estudios se han enfocado a una sola de las múltiples interacciones que intervienen entre antagonista, patógeno y planta. Por tal motivo el objetivo de éste trabajo es evaluar el potencial antagónico de dos nuevas cepas de *Trichoderma*, así como analizar las interacciones existentes en el patosistema.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El fitopatógeno *Phytophthora capsici* causa la enfermedad más devastadora en Chile conocida como “marchitez del Chile”. En México, se reportan pérdidas de entre 10 y 100% de la producción a causa de este fitopatógeno (Guigón-López y González-González., 2004). Velásquez-Valle y Amador-Ramírez (2007), señalan que para nuestro Estado se han registrado pérdidas por esta enfermedad de hasta el 90% de las plantas a nivel parcelario, lo que hace que sea la enfermedad más importante del cultivo en la zona.

Aunque se han hecho esfuerzos por desarrollar estrategias novedosas de manejo de este fitopatógeno, actualmente no existen medidas de control que puedan proteger totalmente al cultivo cuando las condiciones ambientales son favorables para su establecimiento y desarrollo. *P. capsici* puede infectar cualquier parte de la planta, en cualquier etapa de desarrollo (Foster y Hausbeck., 2010).

En el caso del control biológico para la marchitez del Chile, existen tratamientos con diversos microorganismos benéficos, que actúan como biofungicidas. Los hongos del género *Trichoderma* son los antagonistas más usados debido a su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación (Fernández-Larreaga Vega, 2001).

Varios mecanismos de acción antagónica de *Trichoderma* se han demostrado como es la antibiosis, lisis de células, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes y persistencia en el medio ambiente (Verma y col., 2007), lo que explica su potencial para el control de fitopatógenos del suelo, entre ellos *Phytophthora* spp. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo bajo condiciones de laboratorio, por tanto se crea la necesidad de llevar a cabo bioensayos que permitan corroborar la efectividad de protección a la planta y así poder sustentar su uso como parte un plan de manejo integrado.

## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola, tanto en cosecha como en postcosecha (Benítez y col., 2004). Uno de los métodos que más se utilizan para contrarrestar esto es el uso de agroquímicos, que representan un papel muy importante en la reducción de los daños económicos en los cultivos, pero la toxicidad elevada de algunos de ellos, su persistencia en el medio y su mal uso han llevado a un replanteamiento de las tácticas de control de enfermedades.

Los inconvenientes que presenta el control químico se han potenciado en los últimos años debidos al cambio en los sistemas de cultivo, como los monocultivos, explotaciones intensivas, etc. Esto, unido al deterioro medioambiental, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos, como lo es el control biológico.

Los hongos del género *Trichoderma* poseen buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de las especies del género *Phytophthora* (Ezziyyani y col., 2011). A pesar de los extensos registros en la literatura de casos de éxito es preciso determinar, *in vitro*, los requerimientos del sistema patógeno-antagonista y antagonista-antagonista para establecer los factores óptimos a fin de considerarlos para ensayos en invernaderos.

Así mismo, el entendimiento de las interacciones con la planta facilitará el diseño de las estrategias futuras de un control biológico eficaz del fitopatógeno *P. capsici* y posiblemente su transferencia a campos de cultivo.

Por todo lo anteriormente mencionado, el objeto de este trabajo es evaluar el uso de dos especies de *Trichoderma* (*T. harzianum* y *T. koningiopsis*) como agentes antagonistas de *P. capsici* para reducir la “marchitez del chile”, analizando los mecanismos de biocontrol.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la efectividad de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico contra *Phytophthora capsici* en Chile (*Capsicum annuum* L.) y analizar a nivel microscópico las interacciones *in situ* entre antagonista-patógeno y planta.

### Objetivos específicos

1. Identificar cepas de *P. capsici*, seleccionar especies antagónicas de *Trichoderma* y estandarizar protocolos para su manejo como patógenos y antagonistas de Chile (*Capsicum annuum* L.).
2. Evaluar la efectividad de dos cepas del género *Trichoderma* y su efecto individual y combinadas como controladores biológicos de *P. capsici* en plantas de Chile.
3. Comparar la efectividad de diferentes métodos de inoculación y frecuencia de aplicación de los antagonistas.
4. Analizar la interacción, a nivel de microscopía electrónica de barrido, entre antagonista- patógeno y plantas.

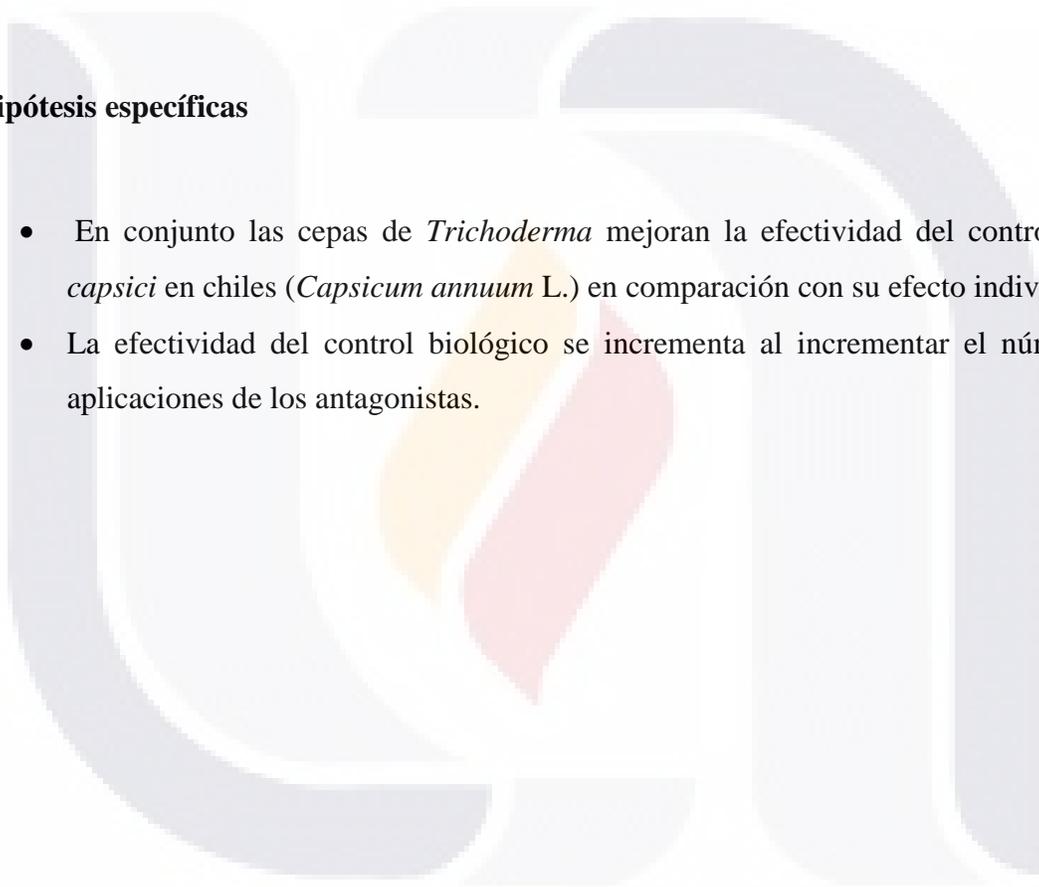
## HIPÓTESIS

### Hipótesis general

El tratamiento de semillas y plantas con *Trichoderma* disminuye la incidencia y severidad de la marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici*.

### Hipótesis específicas

- En conjunto las cepas de *Trichoderma* mejoran la efectividad del control de *P. capsici* en chiles (*Capsicum annuum* L.) en comparación con su efecto individual.
- La efectividad del control biológico se incrementa al incrementar el número de aplicaciones de los antagonistas.



## MARCO TEÓRICO

### **El género *Trichoderma***

Las especies de *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizósfera, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Estos hongos son oportunistas y simbioses de plantas que actúan como parásitos y antagonistas de muchos hongos fitopatógenos, protegiendo así a las plantas de diversas enfermedades. Se encuentran entre los agentes de control biológico más estudiados y comercializados como biopesticidas y biofertilizantes (Vinale y col., 2008).

El género *Trichoderma* actualmente se clasifica dentro del reino Fungi, en la división Ascomycota, clase Euscomycetes, orden Hypocreales y en la familia Hypocreaceae. Tiene aproximadamente diez especies consideradas como antagonistas, entre las que destacan *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. viride* (García y col., 2006).

Las especies de *Trichoderma* pueden ser identificadas por su morfología distintiva, rápido crecimiento y por la coloración verde o blanco brillante de los conidios. Los conidióforos son hialinos con ramificaciones pareadas que se forman de las hifas en ángulos de 90° y llegan a tener un aspecto piramidal y típicamente termina en una o pocas fiálides (Kubicek y Harman, 2002; Samuels, 1996).

Las fiálides son hialinas, en forma de matraz, se adhieren a los conidióforos por la parte más amplia, pueden ser solitarias o dispuestas en racimos y producen los conidios en el extremo. Los conidios son unicelulares y tienen una longitud y anchura menor a los 5µm, pueden ser globosos, subglobosos, elipsoidales u oblongos, con una pigmentación usualmente verdosa (Samuel, 2006; Kubicek y Harman, 2002).

Las clamidoporas generalmente están presentes especialmente en el micelio sumergido, de manera intercalar o terminal; son globosas o elipsoidales y pueden ser incoloras o de tonos amarillo o verde pálido y en ocasiones con paredes gruesas, no mayores a 15 µm de diámetro (Kubicek y Harman, 2002).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica. La humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (Ezziyyani y col., 2005). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Argumedo- Delira y col., 2009).

### **Mecanismos de control**

Debido a su antagonismo contra un gran número de fitopatógenos del suelo, las especies de *Trichoderma* han sido extensamente estudiadas. Su actividad como agentes de control biológico se atribuye a la variedad de compuestos antimicrobianos que producen, además de su rápido crecimiento y fisiología (Verma y col., 2007). Los mecanismos por los que desplazan a los fitopatógenos son fundamentalmente de tres tipos: competición por el espacio y los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos y algunas especies ejercen el micoparasitismo (Ezziyyani y col., 2011; Reino y col., 2008).

### **Competición por nutrientes**

La competencia por carbono, nitrógeno, otros factores para el crecimiento y espacio ha sido considerada como uno de los mecanismos clásicos de control ejercido por *Trichoderma*. Tiene una gran capacidad para movilizar y tomar nutrientes del suelo, lo que lo hace más competitivo y eficiente que otros microorganismo presentes en la rizósfera (Benítez y col., 2004; Ozbay y Newman, 2004; Harman, 2000).

El uso eficiente de los nutrientes disponibles en el sustrato está basado en la habilidad para obtener ATP metabolizando diferentes azúcares, como la celulosa, glucanos y la quitina. Además, *Trichoderma* secreta moléculas de bajo peso molecular que son un quelante específico para los iones de hierro, esenciales para la viabilidad, llamadas sideróforos (Verma y col., 2007; Benítez y col., 2004).

## **Antibiosis y metabolitos secundarios**

El término de metabolitos secundarios incluye a un grupo heterogéneo de compuestos naturales químicamente diferentes, que están relacionados a diversas funciones de supervivencia como la competencia con otros organismos, simbiosis, absorción de nutrientes, etcétera, etc. (Demain y Fang, 2000).

La producción de metabolitos secundarios depende de la cepa de *Trichoderma* e incluye sustancias antifúngicas como los antibióticos, que son productos naturales capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Ejemplo de esto son la gliotoxina y la gliovirina, antibióticos que han demostrado ser un excelente inhibidor específico para los oomicetos (Vinale y col., 2008). También, son capaces de producir hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Argumedo- Delira y col., 2009). Así es como *T. harzianum* y otras especies del género pueden incrementar el crecimiento de las plantas e inducir respuesta y resistencia a patógenos (Verma y col., 2007).

## **Micoparasitismo**

El parasitismo de un hongo sobre otro es un proceso complejo que contempla diversos eventos: el reconocimiento, el ataque, la penetración y la muerte del patógeno. *Trichoderma* puede sentir la presencia de otro hongo, secretando una serie de enzimas degradadoras de la pared celular, mayormente quitinasas, glucanasas y proteasas (Vinale y col., 2008; Harman, 2006).

Al momento en que la pared celular del patógeno se degrada, se liberan moléculas que al ser detectadas por *Trichoderma* hacen que crezca en esa dirección. Una vez que entra en contacto se adhiere, enrolla alrededor del patógeno y forma unas estructuras similares a apresorios que permiten la penetración (Benítez y col., 2004; Howell, 2003). Adicionalmente, produce metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que causan vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Ezziyyani y col., 2011).

El arsenal antifúngico de *Trichoderma* incluye una gran variedad de enzimas líticas, muchas de las cuales juegan un papel importante en el control biológico. En el caso de oomicetos, cuya pared celular contiene  $\beta$ -1,3-glucano y celulosa, se sugiere la  $\beta$ -1,3-glucanasa como la enzima principal en la lisis de la pared celular durante la acción micoparasítica (De la Cruz y col., 1995).

### **Usos de *Trichoderma* como agente de control biológico**

Los hongos del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislados y cultivados, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Ezziyyani y col., 2004).

Numerosos estudios se han llevado a cabo que demuestran la efectividad de las diferentes especies de *Trichoderma* como agentes de control de hongos y oomicetos que causan diversas enfermedades (Cuadro 1.1). Dependiendo de la cepa, su uso en la agricultura puede proveer de diversos beneficios, como la colonización de la rizósfera, control de patógenos mediante diferentes mecanismos, mejora en la salud de las plantas y una estimulación en el crecimiento de las raíces (Harman y col., 2004).

Las enfermedades en las plantas juegan un papel importante en la destrucción y pérdida de recursos naturales, principalmente aquellas que son causadas por los fitopatógenos del suelo. El control biológico mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta no química para la protección de los cultivos.

Existe un gran número de productos comerciales y patentes de *Trichoderma* distribuidos en más de 100 países y se estima que ha creado un mercado a nivel mundial de más de un billón de dólares (Lorito y Woo, 2015). El primer producto registrado y utilizado en invernaderos y viñedos fue el aislado T39 de *T. harzianum* (Trichodex®) en Israel (Hajieghrari y col., 2008).

**Cuadro 1.1 Lista de casos de *Trichoderma* como agentes de control**

<b>AGENTE DE CONTROL</b>	<b>PATÓGENO</b>	<b>ENFERMEDAD CONTROLADA</b>
<i>T. harzianum</i> 1051, <i>T. harzianum</i> 39.1	<i>Crinipellis perniciosa</i>	“Escoba de bruja” en cocoa
<i>T. lignorum</i> , <i>T. virens</i> , <i>T. hamatum</i> <i>T.harzianum T. pseudokoningii</i> (Rifai)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Damping off en frijol
<i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i>	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Fusarium moniliforme</i>	Hongos asociados a semillas
<i>T. harzianum</i> BAFC 742	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> BAFC 2232	Hongos en plantas del frijol de la soya
<i>T. sp</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Pudrición de vegetales comunes
<i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> 25	<i>Serpula lacrymans</i>	Descomposición de la madera por hongos
<i>T. harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Enfermedades por fitopatógenos
<i>T. virens</i> cepa Q	<i>Rhizopus oryzae/ Phythium sp.</i>	Enfermedades del vástago de algodón
<i>T. viride</i> , aislado T60	<i>Coniphora puteana</i> , <i>Postia placenta</i> y <i>Serpula lacrymans</i>	Decoloración de pinos y abetos
<i>T. virens</i> , aislado GL3 y GL21, <i>T harzianum</i> T-203	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phythium ultimum</i> y <i>Meloidogyne incognita</i>	Damping off en pepino
<i>T. harzianum</i> , <i>T. aureovirde</i> , <i>T. koningii</i>	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Died) Drechs.	Mancha marrón y foliar del trigo
<i>T. viride</i> ,	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Mancha marrón de las judías
<i>T. aureoviride</i> , T122 <i>T. harzianum</i> T66 y T334 y <i>T. viride</i> T124 y T228	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Phythium sp.</i> y <i>Rhizoctonia</i> <i>sp.</i>	Enfermedades por fitopatógenos

**\*Cuadro 1.1 Lista de casos de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico (continuación)**

<b>AGENTE DE CONTROL</b>	<b>PATÓGENO</b>	<b>ENFERMEDAD CONTROLADA</b>
<i>T. viride</i> <i>T. pseudokoningii</i> , <i>T. koningii</i>	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Pudrición blanca en <i>Allium</i>
<i>T. virens</i>	<i>Verticillium dhaliae</i>	Marchitamiento del algodón
<i>T. harzianum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul y gris en manzana
<i>T. virens</i> y <i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Cancro en el tallo de la papa
<i>T. harzianum</i> y <i>T. koningii</i>	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Botrytis cinérea</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Enfermedades por fitopatógenos
<i>T. auroviride</i> <i>T. longibranchiatum</i> , <i>T. koningii</i>	<i>T. Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición de los girasoles
<i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i>	<i>Lasiodiplodia theobroma</i> , <i>Diplodia natalensis</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> Currie, <i>Penicillium sclerotienum</i> Yomamoto, <i>Aspergillus niger</i> var. <i>Tiegh</i> , <i>Aspergillus tomarii</i> Kita, <i>Rhizoctonia sp.</i>	Pudrición y marchitamiento del fruto del plátano, pudrición del tallo en mago, pudrición de batatas post-cosecha
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitamiento del tomate
<i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>P. erythroseptica</i>	Pudrición de las raíces de <i>Capsicum annum</i>
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Mucor piriformis</i>	Pudrición de fresas post-cosecha

\* Tomado y modificado de Verma y col., 2007.

## Control de fitopatógenos en la agricultura

A nivel mundial los fitopatógenos causan grandes daños en los cultivos que resultan en efectos perjudiciales de importancia ecológica y económica. De los diversos microorganismos que atacan a las plantas como pueden ser virus, bacterias, nematodos, fitoplasmas y viroides, los hongos y oomicetos son el grupo que más enfermedades ocasionan (Agrios, 2005; Rodríguez-Guzmán, 2001).

Dentro de los oomicetos se encuentra una amplia gama de fitopatógenos del suelo, entre ellos destacan algunas especies de los género de *Phytophthora*, *Phytium* y *Peronospora* que son de gran interés en México (Rodríguez-Guzmán, 2001). De hecho el nombre *Phytophthora* significa “destructor de plantas” y causa numerosas enfermedades en plantas como la pudrición de raíz del tomate, la marchitez de la pimienta, la pudrición de la raíz en aguacate, la marchitez del chile, entre muchas otras (Castro y col., 2012; Hansen y col., 2012).

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos más importantes en México ya que es un ingrediente fundamental en la dieta del mexicano. Uno de los factores que merman su producción es la enfermedad conocida como marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici*, que además de ocasionar pérdidas económicas también causa daños indirecto por el uso indiscriminado de fungicidas ineficaces (Fernández-Pavía y col., 2013; Velázquez y Medina, 2003).

El control de la marchitez se ha intentado mediante diversas alternativas culturales, genéticas, químicas y más recientemente empleando agentes biológicos. Aunque se han hecho esfuerzos por desarrollar estrategias novedosas de manejo de este fitopatógeno, actualmente no existen medidas de control que puedan proteger completamente a un cultivo susceptible cuando las condiciones ambientales son favorables (Castro y col., 2012; Guigón-López y González-González, 2004).

### ***Phytophthora capsici***

El fitopatógeno *Phytophthora capsici* es un oomiceto con un amplio rango de hospederos y se distribuye mundialmente causando pudriciones en la raíz, corona, hojas y frutos de diversos vegetales. Se encuentra dentro de la división Oomicota, clase Oomycetes, en el orden Peronosporales y la familia Pythiaceae (Blair y col., 2008).

Fue descrito por primera vez por Leonian en 1922 como el agente causal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Nuevo México y se consideró como hospedante específico. Ahora se sabe que ataca también cucurbitáceas como el pepino, la calabaza, el melón y la sandía, solanáceas como el jitomate y la berenjena y se ha encontrado en árboles de cacao y macadamia, así como en plantas de fresa (Castro y col., 2012; Lamour y col., 2012, Pérez-Moreno y col., 2003).

Es una especie heterotálica que forma estructuras sexuales cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se aparean. Los oogonios son esféricos con anteridios anfíginios, que al ser fertilizados producen oosporas apleróticas, marrones de pared gruesa. La germinación produce micelio cenocítico, el cual puede infectar directamente o diferenciarse en esporangios. Los esporangióforos se encuentran en un simpodio simple; los esporangios son papilados y varían en forma y tamaño, aunque comúnmente son ovoides o elipsoides, con bases redondeadas (Lamour y Hausbeck, 2001; Erwin y Ribeiro, 1996).

Los métodos de control no han resultado ser efectivos debido a la resistencia de las oosporas a la desecación, a las bajas temperaturas y a otras condiciones ambientales desfavorables, así como a su capacidad para sobrevivir en el suelo durante años aún en la ausencia de plantas hospederas (Kim y Kim, 2009).

El control químico es poco efectivo en los cultivos de chile. La resistencia o tolerancia de *P. capsici* a diversos fungicidas ha sido reportada tanto en el laboratorio como en condiciones de campo (Foster y Hausbeck, 2010; Café-Filho y Ristaino; 2008; Fernández- Pavía y col., 2004; Pérez-Moreno y col., 2003). Las estrategias alternativas

como el uso de controladores biológicos, pueden ser más redituables y amigables con el ambiente.

### **Control biológico de *P. capsici***

De entre los microorganismos antagonistas de mayor uso como agentes de control para *P. capsici*, destacan *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. y aislamientos no patogénicos de diversas especies de fitopatógenos (Howell, 2003). Recientemente, se han evaluado algunos ascomicetos (Ramos-Sandoval y col., 2010; Robles-Yerena y col., 2010) y hongos micorrízicos (Ozgonen y Erkilic, 2007; Espinosa-Victoria y col., 2004) como posibles controladores biológicos de éste fitopatógeno.

Ya se ha estudiado el potencial de *Trichoderma* y en confrontaciones duales ha mostrado las siguientes interacciones *in vitro*: una rápida colonización del medio, crecimiento sobre el micelio de *P. capsici*, un enrollamiento alrededor de las hifas del patógeno, vacualización y desintegración del micelio de *P. capsici* y una estimulación en la formación de esporangios (Ahmed y col., 1999, Harman, 2000; Ezziyyani y col., 2004). La intensidad de inhibición de *P. capsici in vitro* varía según el medio de cultivo, la temperatura y el pH (Ezziyyani y col., 2011).

Aun cuando éste comportamiento es el más citado, se han registrado casos donde existe un fuerte enrollamiento alrededor de las hifas de *P. capsici*, sin que exista penetración y viceversa. De igual modo se observa una inhibición del crecimiento del patógeno ejercido por *Trichoderma*, sin que haya penetración o enrollamiento (Bae y col., 2011).

En México se han evaluado cepas nativas de *Trichoderma* y los resultados obtenidos demuestran que tienen una actividad antagonista que les permite actuar sobre *P. capsici*; reduciendo el crecimiento *in vitro* del patógeno y sobrecreciéndolo hasta en un 100%, debido posiblemente a la producción de diversos metabolitos antibióticos (Osorio-Hernández y col., 2011; Guigón-López y González-González, 2004).

La habilidad de las diferentes cepas de *Trichoderma* para parasitar y sobrecrecer al patógeno es de suma importancia para futuras estrategias del manejo de la enfermedad. De tal modo que los estudios previos en laboratorio permitan implementar evaluaciones en planta que determinen si dichos mecanismos continúan operando. Así mismo, es importante conocer la actividad en la rizósfera para confirmar si realmente cuentan con aptitud para establecerse y prosperar en suelos cultivados.



# TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

## CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS Y ESPECIES DE *Phytophthora capsici* Y *Trichoderma*

### OBJETIVO DEL CAPÍTULO

- Identificar molecularmente aislados de campo de *P. capsici* y seleccionar dos de tres especies del género *Trichoderma*, así como estandarizar protocolos para su manejo en laboratorio e invernadero.

### INTRODUCCIÓN

En éste capítulo se aborda el proceso de identificación molecular de aislamientos de campo de *P. capsici* y la selección de especies de *Trichoderma* que fueron evaluadas *in vitro* como biocontroladores de *P. capsici* en Chile. Asimismo, se estandarizaron los protocolos para el manejo del patógeno y los antagonistas en laboratorio e invernadero.

En los sistemas naturales las comunidades microbianas tienden a vivir en relativa armonía y se equilibran entre sí, pero en sistemas como la agricultura, hay una modificación en este equilibrio natural que puede conducir a la proliferación de los fitopatógenos y eventualmente a pérdidas en la productividad (Avis y col., 2008). En estos casos, la integración de microorganismos beneficiosos en los sistemas de producción puede restablecer el equilibrio, propiciando el aumento de la sanidad vegetal y la productividad.

La detección de aislamientos de hongos con potencial como agentes de control biológico, se realiza generalmente *in vitro*, junto con pruebas que permitan establecer la identidad y la relación de las cepas recién encontradas (Avis y col., 2001). Esto se lleva a cabo utilizando la morfología, perfiles de asimilación de nutrientes y de actividad enzimática. Estos métodos frecuentemente son complementados con datos moleculares para permitir la clasificación de los hongos antagonistas en taxones existentes o nuevos (Samson 1995).

Lo anterior es importante ya que los aislamientos pueden estar estrechamente relacionados con otros hongos conocidos que pueden ser patógenos de plantas o animales (en particular seres humanos), o que ya están presentes en el ecosistema. Esto posteriormente podría influir en la aplicabilidad del antagonista para el propósito deseado.

Una vez establecida la identidad del hongo, a menudo es deseable comparar diferentes aislados, para evaluar la diversidad dentro de las especies. Esto ayudará en la selección de las cepas más eficientes y antagonistas para un control *in vivo*. Sin embargo, los aislamientos con el más alto nivel de control *in vitro* pueden no funcionar tan bien *in vivo* ya que las condiciones ambientales y la competencia con otros microorganismos son mucho más restrictivas. Es, por lo tanto, esencial seleccionar aislados fúngicos bajo un rango de condiciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Phytophthora capsici*

Para el proceso de selección de los antagonistas se trabajó con la cepa de *T. harzianum* (Th-7) de la colección del laboratorio de Microbiología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CCB-UAA). Las cepas de *T. koningiopsis* (HTE 808) y *T. asperellum* (NRRL 50191), fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Experimental (LBE) del Centro de Biotecnología Genómicas del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN), ubicado en el municipio de Reynosa, en el estado de Tamaulipas.

Las dos cepas de *P. capsici* (RDP1 y RES) fueron aisladas en Julio del 2013 mediante colectas de plantas de chile ancho que presentaban la sintomatología típica de la “marchitez del chile” (Velázquez-Valle y col., 2001) en una plantación comercial bajo condiciones de macrotunel en el municipio de Pabellón de Arteaga, en el estado de Aguascalientes. Las muestras de tejido radicular fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del CCB-UAA, siguiendo la técnica de Agrios (2005) para el aislamiento de *P. capsici* en medio V8-A. Se observaron las características de las colonias en medio V8-A y la morfología microscópica de propágulos. Para ello, se tomaron discos de 5 mm de las colonias activas, se colocaron en cajas de petri, se inundaron con agua destilada estéril y se incubaron por 48 h a 28°C, con la finalidad de inducir la formación de esporangios y la liberación de zoosporas. La especie de *Phytophthora* se identificó con las claves de Waterhouse (1963) y la de Erwin y Ribeiro (1996).

### **Identificación molecular *P. capsici***

Después de la caracterización morfológica de las dos cepas obtenidas de *P. capsici*, se realizaron aislados de punta de hifa para obtener cepas puras que fueron posteriormente identificadas molecularmente para corroborar la especie. La identificación molecular de las dos cepas de *P. capsici* se realizó en las instalaciones del LBE del CBG-IPN en Reynosa, Tamaulipas

Los aislamientos puros de *P. capsici* se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio V8, mismos que fueron inoculados con un disco de 5mm de medio V8-A con micelio activo de cada cepa. Se incubaron a 27°C, en agitación a 200 rpm por tres días. El cultivo se centrifugó para obtener biomasa del micelio de cada cepa.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de *P. capsici*, se realizó siguiendo el método Cloroformo Octanol (24:1) de Reader y Broda, (1985).

### **Identificación molecular**

Las dos cepas (RES y RDP1) fueron identificadas mediante PCR anidada, con la amplificación de la región 18s de *Phytophthora* con primers específicos (Silvar y col., 2005) “Forward” (5'- CTTTCCACGTGAACCGTWTC-3') y dos primers “Reverse” (5'- CAAAATGGATCGACCCTCG-3' y 5'-CCAAATGGATCGACCCTCG-3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, utilizando 1 µL del DNA genómico, 2.4 µl de Buffer 10X (concentración final a 1X), 0.75 µl de cloruro de magnesio de 50 mM, 1 µl de cada primer (5 µM), 0.2 µl de dNTPs 10 mM, 0.2 µl de Taq polimerasa 5U/µl y se completó el volumen a 50 µl con agua miliQ estéril.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos y una extensión final de 72°C durante 5 minutos.

Las secuencias de los productos de PCR se obtuvieron en un secuenciador automático (ABI Prism ®) utilizando la tecnología de Big Dye ®. Se preparó una muestra con un volumen total de 20 µl, añadiendo 4 µl de buffer big dye v3.1 (5x), 7 µl de agua Milli-Q estéril, 4 µl de indicador F o R 5mM, 4 µl de BigDye v3.1 ready mix y 4 µl de templado.

Las condiciones para la amplificación por PCR en termociclador fueron las siguientes: 96°C/1 min, 96°C/10 s, 59°C/5s (TM amplificación de primers), 60°C/4 min, 25 ciclos, posteriormente 62°C/1 min y se mantuvo a 4°C. La segunda reacción de secuenciación (PCR anidada) se realizó tomando 10 µl de la reacción de PCR y se añadieron 45 µl de solución SAM en cada tubo, luego se añadió 10 µl de la solución X-terminator homogenizada, se colocaron los tubos en agitación a 1400 rpm/30 min a TA. Se centrifugo a 12000rpm/2min, se separó el sobrenadante del tubo y se colocaron 10 µl en la placa del secuenciador.

Las cepas fueron secuenciadas en la Unidad de Secuenciación y Análisis Molecular del CBG-IPN. Las secuencias obtenidas se alinearon y se corrigieron con el programa CLC Sequence Viewer, Versión 7 y se compararon con secuencias registradas en el GenBank utilizando BLASTn.

### **Confrontaciones *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y *P. capsici***

Con el propósito de seleccionar las dos cepas de *Trichoderma* que tuvieran características deseables como controladores biológicos (rápido crecimiento, parasitismo e inhibición del patógeno) se llevaron a cabo diferentes confrontaciones *in vitro* usando de manera independiente, las tres especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. koningiopsis* y *T. harzianum*) y las dos cepas de *P. capsici* (RES y RDP1). Esta prueba se llevó a cabo durante 2014 en las instalaciones del LBE del CBG-IPN. Para ello se tomaron discos de 5 mm de diámetro de micelio activo de cada una de las cepas de *P. capsici* y *Trichoderma* y se colocaron en puntos equidistantes en cajas de petri con medio V8-A. Se incubaron a ~30°C por tres días.

### **Registro del crecimiento micelial del antagonista y patógeno**

Como criterio de evaluación se midió el crecimiento en línea recta de las colonias, cada 12 h, con un vernier y se registró el crecimiento, en mm, hasta que los micelios del antagonista y patógeno entraron en contacto. Las pruebas se hicieron por cuadruplicado y se incluyeron como controles los tres antagonistas y dos cepas del fitopatógeno sin confrontar.

### **Análisis macroscópico y microscópico de la interacción entre colonias**

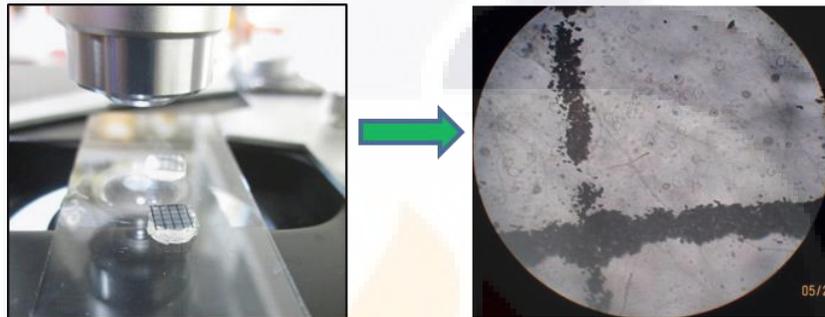
Se obtuvieron registros fotográficos de la interacción entre colonias del antagonista y fitopatógeno a nivel macroscópico (aparición y coloración de colonias) y microscópico (interacción entre micelios). Las observaciones macroscópicas incluyeron registros como tasas de crecimiento y aparición de las colonias confrontadas, competencia por espacio e hiperparasitismo.

Para el análisis microscópico se tomaron discos de 5 mm de diámetro de la zona de contacto entre micelios de las cajas de petri donde se llevaron a cabo las confrontaciones duales. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% con pH 7.4 durante 24 h para luego ser transportadas, preparadas, observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido JSM-35C® en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

### **Formación y cuantificación de esporangios de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma* spp.**

Cómo criterio adicional para la selección de cepas de *Trichoderma* con potencial antagónico, se hicieron pruebas para inducir la formación de esporangios y liberación de zoosporas del patógeno en presencia de los antagonistas. Para ello se tomaron cuatro discos de 5 mm de cada caja petri con cultivos duales. Los discos fueron obtenidos de la zona de contacto entre los micelios de *Trichoderma* y *P. capsici* y posteriormente colocados en cajas petri previamente etiquetadas que recibieron 10 ml de agua destilada

estéril antes de ser incubadas por 48hr a 30°C con la finalidad de estimular la formación de esporangios. El mismo procedimiento fue aplicado para inducir la esporulación del patógeno sin confrontar (cajas control). Para estimar el número de esporangios de *P. capsici* en presencia de los antagonistas se llevó a cabo un muestreo para cuantificar el número de éstos (lentos o vacíos) observados por disco, con el objetivo 10x, en un área de 2 mm x 2 mm, usando un microscopio óptico (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Laminilla de acetato cuadrículada sobre los discos con micelio. Campo visual del microscopio 10x, dividido por la cuadrícula milimétrica

### **Tratamiento estadístico de los datos**

Los datos de crecimiento micelial y número de esporangios fueron analizados estadísticamente con el programa STATISTICA 8.0. Se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias por Fisher y Tukey tomando como referencia los controles.

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación morfológica de *P. capsici*

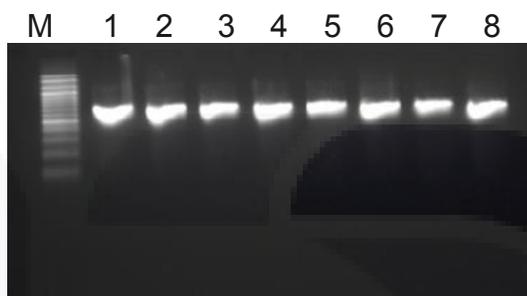
De las muestras de tejido de plantas de Chile enfermas, se obtuvieron colonias de *P. capsici* de apariencia blanquizca y poco densas, con formas estrelladas y radiales. Se observaron hifas hialinas, esporangios piriformes y ovoides, así como las estructuras sexuales, oogonios, anteridios y oosporas (Fig. 1.2). Éstas características morfológicas empatan con las descritas por Erwin y Ribeiro (1996) y por Fernández-Pavía y colaboradores (2004).



**Figura 1.2.** Morfología microscópica de las cepas obtenidas de *P. capsici*. **A.** Esporangios ovoides. **B.** Zoosporas en el interior de un esporangio maduro. **C.** Anteridios anfígenos (señalados) y oogonios esféricos.

## Identificación molecular de *P. capsici*

El ADN que se obtuvo con el método Cloroformo Octanol fue suficiente y se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Los primers específicos para la región 18 s de *Phytophthora* produjeron bandas de 595 pares de bases (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** Visualización de ADN genómico en gel de agarosa al 1%. M corresponde al marcador de peso molecular. Las bandas 1- 4 corresponden a las cepa RES. Las bandas 5-8 corresponden a RDP1.

Después de haber obtenido las secuencias se compararon con los datos de secuencias similares del GenBank utilizando BLASTn, lo que permitió confirmar la identificación a nivel de especie para RDP1 y RES como *P. capsici*, con un identidad del 96%, para ambas cepas (Fig. 1.4).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici strain KTMY-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KJ576799.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 98-198 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KF700091.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 09-29 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KF700090.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 96-18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KF700089.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 09-43 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KF700088.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate KA/CO-110 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and int</a>	1088	1088	95%	0.0	96%	<a href="#">KC771053.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici strain OCPC15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC677817.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC594937.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 06-01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC438377.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 01-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC438376.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 99-192 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC438375.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 98-185 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC438374.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 98-176 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC347534.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 98-155 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC347531.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 98-142 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC335553.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phytophthora capsici isolate 98-87 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,</a>	1088	1088	94%	0.0	96%	<a href="#">KC335552.1</a>

**Figura 1.4.** Imagen del programa BLASTn, que muestra un porcentaje de identidad de 96%, comparando las secuencias de RDP1 y RES con las existentes en el NCBI.

## **Pruebas de antagonismo**

Los resultados de las confrontaciones *in vitro* para la selección de las dos cepas de *Trichoderma* se analizaron mediante tres criterios: (1) la evaluación de la cinéticas de crecimiento de especies antagonistas y cepas del patógeno, (2) características macroscópicas y microscópicas de la interacción entre colonias y (3) cuantificación de esporangios producidos por el patógeno en presencia del antagonista.

### **Cinética del crecimiento de los antagonistas y del patógeno**

La última medición del crecimiento lineal de las colonias del patógeno y los antagonistas se realizó a las 60 h, ya que en el lapso de las siguientes 12 h los micelios entraron en contacto. De igual manera a las 60 h se hizo el último registro del crecimiento de los controles. Los resultados de crecimiento a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas después de la siembra se presentan en el cuadro 1.2 para las tres especies de *Trichoderma* y en el cuadro 1.3 para las dos cepas de *P. capsici*

### **Crecimiento de *Trichoderma* spp. en presencia de *P. capsici***

El antagonista con más rápido crecimiento fue *T. harzianum*, tanto en confrontación con *P. capsici* como por separado, mientras que *T. asperellum* y *T. koningiopsis*, tuvieron crecimientos similares entre ellas (Cuadro 1.2).

El crecimiento de *Trichoderma* fue afectado de manera no significativa por la presencia del patógeno a las 12, 24, 36 y 48 h. Sin embargo, a las 60 h, *T. asperellum* confrontada con RES creció 8% menos que sola. Por su parte, *T. harzianum* creció 19% menos en presencia de RES y 21% menos en presencia de RDP1, ambas en comparación con el control (Cuadro 1.2).

El análisis estadístico mostró que el crecimiento de *T. harzianum* durante todo el experimento fue significativamente mayor que *T. asperellum* y *T. koningiopsis* llegando a crecer hasta 10 mm más.

**Cuadro 1.2** Crecimiento medio (mm) de *Trichoderma* spp. confrontada con *P. capsici* cada 12 h

TRATAMIENTO	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
<i>T. koningiopsis</i> vs. RES	3.33 ns	11.68 ns	20.58 ns	32.48 ns	39.55 ns
<i>T. koningiopsis</i> vs. RDP1	2.98 ns	11.40 ns	21.35 ns	31.65 ns	39.53 ns
<i>T. koningiopsis</i> <sup>c</sup>	3.08	12.25	20.95	32.73	41.48
<i>T. asperellum</i> vs. RES	2.85 ns	10.75 ns	19.05 ns	30.43 ns	38.30*
<i>T. asperellum</i> vs. RDP1	2.78 ns	11.05 ns	19.50 ns	30.83 ns	39.83 ns
<i>T. asperellum</i> <sup>c</sup>	2.95	12.35	20.78	32.40	41.58
<i>T. harzianum</i> vs. RES	7.00 ns	17.55 ns	26.73 ns	40.55 ns	41.85**
<i>T. harzianum</i> vs. RDP1	6.75 ns	17.95 ns	27.33 ns	39.10 ns	40.53**
<i>T. harzianum</i> <sup>c</sup>	6.90	17.98	28.50	41.43	51.48

<sup>c</sup> Control (\*) Diferencia significativa (p<0.05) y (\*\*) altamente significativa (p<0.01) con relación al crecimiento del mismo antagonista sin confrontar (control) según la DMS.

### Crecimiento de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma* spp.

El crecimiento del patógeno no se vio afectado negativamente por los antagonistas en las primeras 48 h, incluso se detectó mayor crecimiento del patógeno en presencia del antagonista en comparación con el tratamiento control. Lo anterior sugiere que hubo cierta estimulación del patógeno en presencia del antagonista. Esta respuesta ya había sido detectada anteriormente con otros aislados regionales de *P. capsici* en presencia de diferentes cepas de *T. harzianum* por nuestro grupo de trabajo (información no publicada).

Las dos cepas del fitopatógeno se desarrollaron de manera similar en ausencia de *Trichoderma*. Sin embargo, la cepa RES fue menos sensible a los antagonistas que RDP1. De hecho, en presencia de *T. asperellum* la cepa RES a las 48 h creció 6% más que el control, aunque a las 60 h la misma cepa mostró 14% menos crecimiento en presencia de *T. harzianum* (Cuadro 1.3).

El crecimiento de RDP1 se vio estimulado las primeras 48 h por los antagonistas, principalmente por *T. koningiopsis* (Cuadro 1.3). A las 12 h la cepa RDP1 creció 27% más en presencia de *T. asperellum* que sola y a las 24 h creció 10 % más en presencia de *T. harzianum* en comparación al control. Entre las 12 y 48 h en presencia de *T. koningiopsis*, RDP1 creció de 25 a 6% más que el control. Sin embargo, a las 60 h la misma cepa (RDP1) creció 9% y 7 % menos en presencia de *T. harzianum* y *T. koningiopsis*, respectivamente (Cuadro 1.3).

Los efectos estimulantes o inhibitorios del crecimiento de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma* spp., señalados anteriormente, tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

**Cuadro 1.3. Crecimiento promedio (mm) de *P. capsici* (RES y RDP1) cada 12 h en presencia de *Trichoderma* spp.**

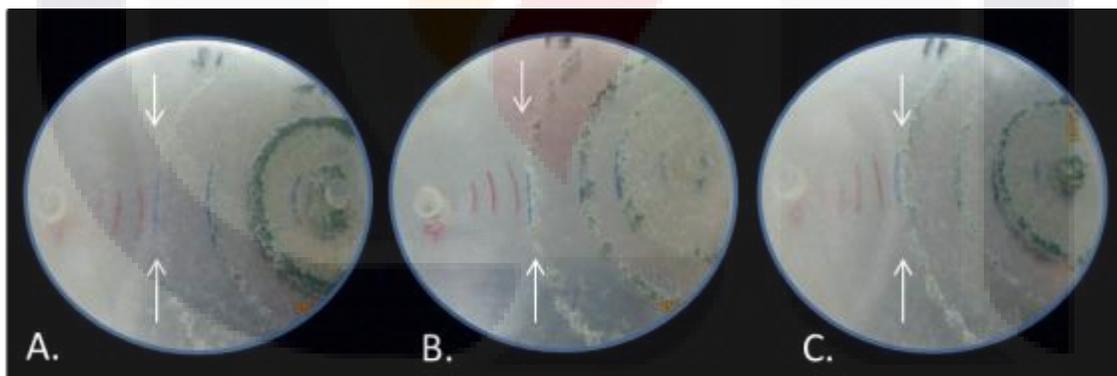
TRATAMIENTO	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
RES vs. <i>T. koningiopsis</i>	3.58 ns	8.65 ns	13.25 ns	19.00 ns	22.75 ns
RES vs. <i>T. asperellum</i>	3.63 ns	9.13 ns	13.33 ns	19.50*	22.65 ns
RES vs. <i>T. harzianum</i>	3.45 ns	8.43 ns	13.00 ns	18.18 ns	20.55**
RES <sup>C</sup>	3.20	9.20	13.53	18.35	23.85
RDP1 vs. <i>T. koningiopsis</i>	4.15*	9.85**	14.00*	19.63*	21.35*
RDP1 vs. <i>T. asperellum</i>	4.23*	8.95 ns	13.58 ns	19.23 ns	23.10 ns
RDP1 vs. <i>T. harzianum</i>	3.63 ns	9.53*	13.70 ns	18.90 ns	20.95**
RDP1 <sup>C</sup>	3.33	8.65	13.25	18.55	23.05

<sup>C</sup> Control (\*) Diferencia significativa (p<0.05) y (\*\*) altamente significativa (p<0.01) con relación al crecimiento del mismo patógeno sin confrontar (control) según la DMS.

## Análisis macroscópico de la interacción entre colonias y mecanismos de antagonismo

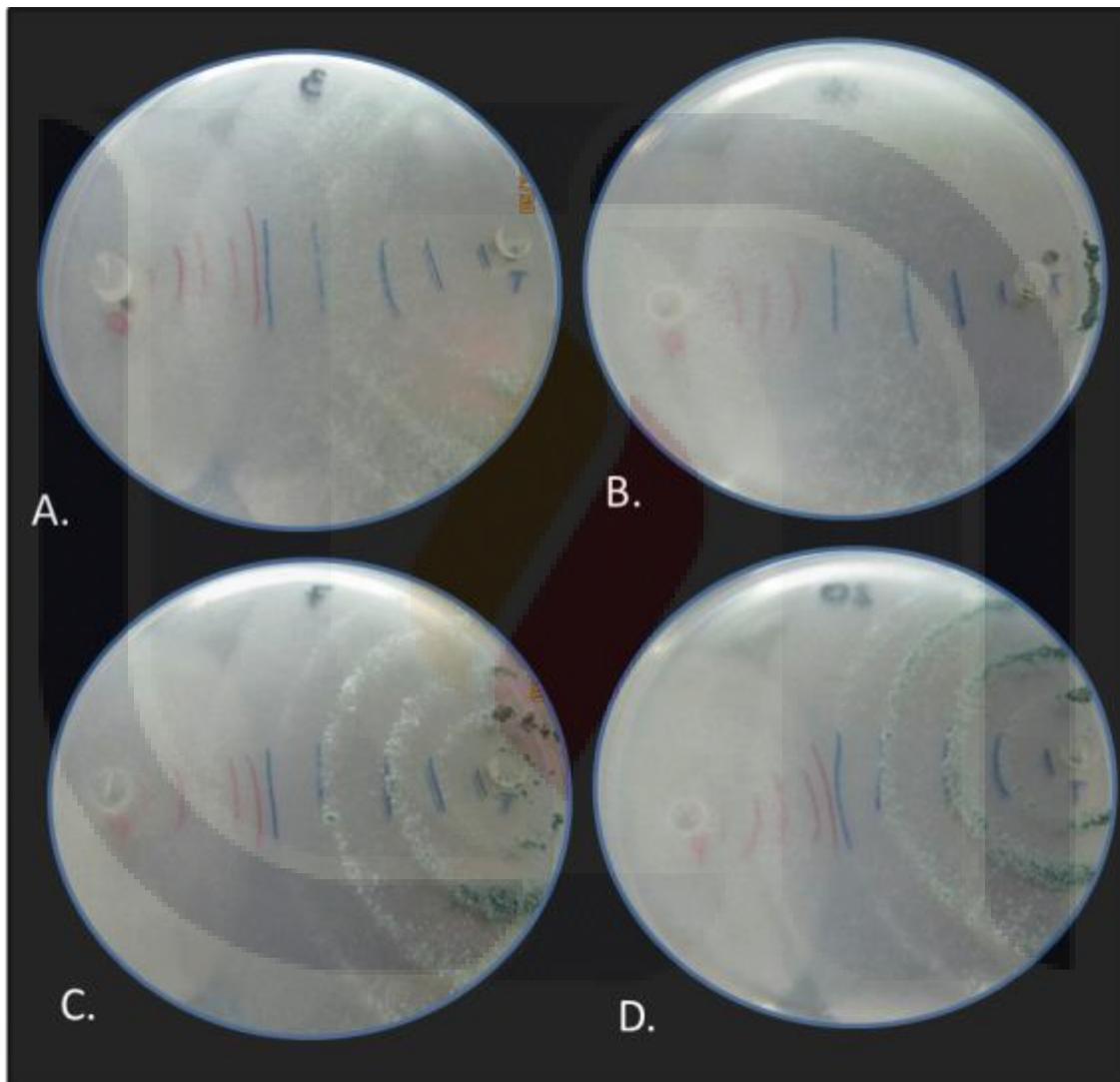
Se observaron diferentes mecanismos de acción y efectos que ejerce *Trichoderma* contra el fitopatógeno, entre ellos un rápido establecimiento en el medio, competencia por espacio e hiperparasitismo. A las 60 h *T. koningiopsis* y *T. harzianum* fueron capaces de detener el crecimiento de *P. capsici* y no permitir que se siguiera desarrollando.

El fenómeno de competencia por espacio fue visible en todos los ensayos. Al entrar los micelios en contacto, las colonias de *P. capsici* detuvieron su crecimiento. En los casos de confrontación con *T. harzianum*, en la zona de contacto se observó la formación de una barrera, es decir hubo un engrosamiento de los micelios de ambos microorganismos; el aspecto macroscópico de las hifas en ese punto fue más denso (Fig. 1.5). Los espacios libres de micelio en el medio, al momento del contacto, fueron ocupados por el antagonista, pero no se observó crecimiento de *Trichoderma* sobre la colonia del patógeno en ningún momento.



**Figura 1.5.** Cultivos duales de *T. harzianum* (derecha) y *P. capsici* (izquierda). **A y C** muestran confrontaciones de *T. harzianum* contra la cepa RES de *P. capsici*. **B.** confrontación de *T. harzianum* contra RDP1. Las flechas señalan zonas de contacto entre micelios donde se formó una barrera.

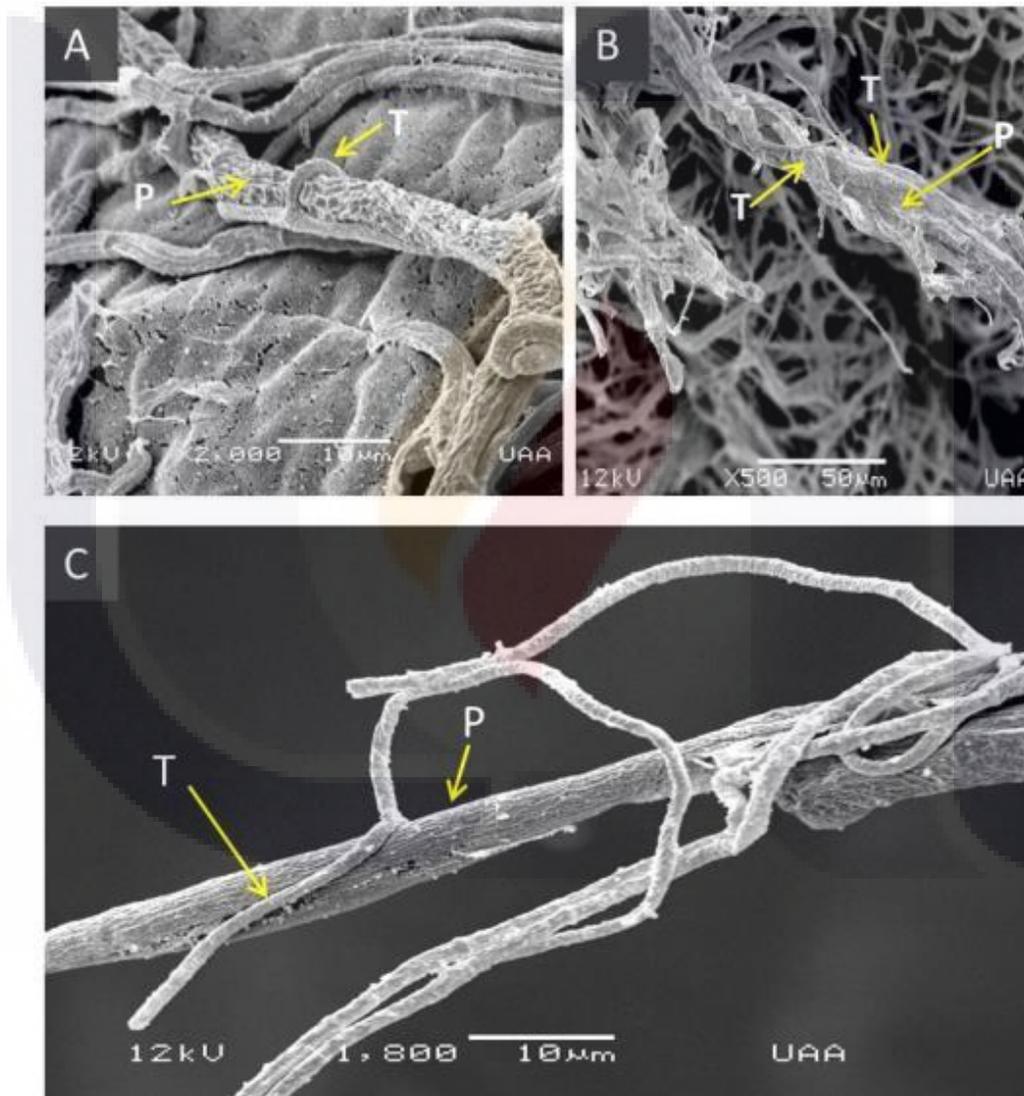
*T. asperellum* y *T. koningiopsis* además de detener el crecimiento de las dos cepas del fitopatógeno, fueron capaces de sobrecrecer las colonias de RDP1 y RES. La Figura 1.6 muestra claramente cierto grado de invasión o parasitismo de *T. asperellum* y *T. koningiopsis* sobre las dos cepas del fitopatógeno.



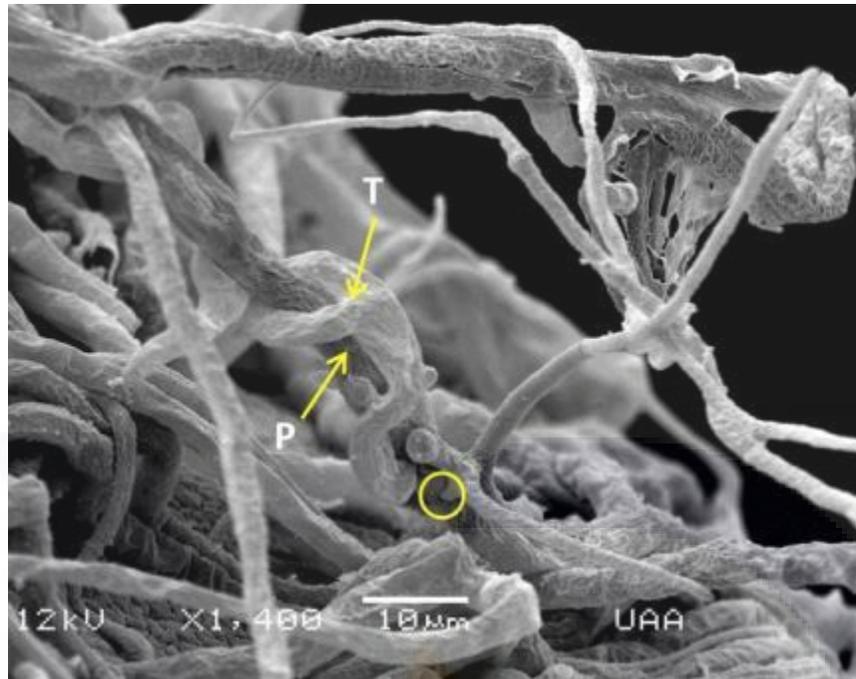
**Figura 1.6.** Cultivos duales de *Trichoderma* spp. (derecha) y *P. capsici* (izquierda). **A.** *T. koningiopsis* contra RES, **B.** *T. koningiopsis* contra RDP1, **C.** *T. asperellum* contra RES. **D.** *T. asperellum* contra RDP1. Las cuatro cajas muestran cierto grado de hiperparasitismo o invasión de *Trichoderma* sobre *P. capsici*

**Análisis microscópico de la interacción entre colonias y mecanismos de parasitismo**

Las observaciones microscópicas de la zona de interacción de los micelios mostró que las tres especies de *Trichoderma* se adhieren o enrollan alrededor de *P. capsici* (Fig. 1.7) como mecanismo de acción durante el fenómeno de hiperparasitismo. Se observó también cómo *T. koningiopsis* rodea y forma un anillo alrededor de una hifa de *P. capsici* a la que es capaz de penetrar (Fig. 1.8).



**Figura 1.7.** Microfotografía de la interacción entre los micelios de *Trichoderma* (T) y *P. capsici* (P) **A.** Hifa de *T. koningiopsis* formando un anillo alrededor de una hifa de *P. capsici*. **B.** Hifa de *P. capsici* enrollada por hifas de *T. harzianum*. **C.** Hifa de *T. koningiopsis* adherida a una hifa de *P. capsici*.

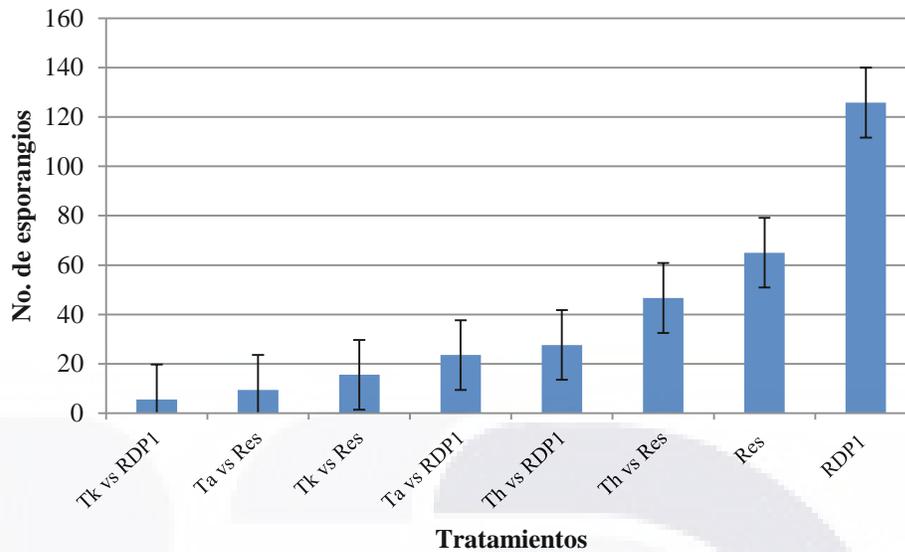


**Figura 1.8.** Hifa de *T. koningiopsis* (T) hiperparasitando a *P. capsici* (P). Se marca con un círculo la zona donde *T. koningiopsis* penetra la hifa de *P. capsici*.

### **Cuantificación de esporangios producidos por *P. capsici* en presencia del antagonista**

Cómo parte de los criterios evaluables para la selección de las dos cepas de *Trichoderma*, se analizó su efecto antagónico para impedir la formación de esporangios del patógeno. Los resultados de este análisis se resumen en la Figura 1.9 y Cuadro 1.4.

Las dos cepas de *P. capsici* en ausencia de un antagonista produjeron significativamente más esporangios que confrontados (Fig. 1.9 y Cuadro 1.4). En promedio, la cepa RES en ausencia de *Trichoderma* produjo 65 esporangios mientras que RDP1 sin *Trichoderma* produjo un promedio de 126 esporangios.



**Figura 1.9.** Promedio de esporangios producidos por las dos cepas de *P. capsici* (RDP1 y RES) en presencia y ausencia de los tres antagonistas. Tk: *T. koningiopsis*, Ta: *T. asperellum* y Th: *T. harzianum*.

Las pruebas estadísticas mostraron que la producción media de esporangios por *P. capsici* fue menor en los tratamientos confrontados que en los controles, sin embargo no todas las diferencias resultaron significativas (Cuadro 1.4).

La cepa RDP1 produjo significativamente menos esporangios confrontada con las tres especies de *Trichoderma* que sin confrontar (Cuadro 1.4). Lo anterior sugiere que RDP1 es más susceptible a los antagonistas que RES. La cepa RDP1 redujo 95 % la producción de esporangios en presencia de *T. koningiopsis*, 81 % con *T. asperellum* y 78% con *T. harzianum*.

Por su parte, la cepa RES aunque produjo entre 28 % y 85 % menos esporangios al ser confrontada con las tres especies de *Trichoderma*, dicha reducción solo fue significativa con *T. asperellum* (Cuadro 1.4), la cual disminuyó en 85% la producción de esporangios en RES.

**Cuadro 1.4.** Promedio de esporangios observados por campo y porcentaje de reducción en presencia y ausencia de cada antagonista en el medio.

TRATAMIENTO	# esporangios/campo	% de reducción de esporangios
<i>T. koningiopsis</i> vs RDP1	6 a	95 % *
<i>T. asperellum</i> vs RES	10 a	85 % *
<i>T. koningiopsis</i> vs RES	16 ab	75 % ns
<i>T. asperellum</i> vs RDP1	24 ab	81 % *
<i>T. harzianum</i> vs RDP1	28 ab	78 % *
<i>T. harzianum</i> vs RES	47 ab	28 % ns
RES	65 b	0 %
RDP1	126 c	0 %

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ )

(\*) % de reducción de esporangios significativamente diferentes del control sin confrontar

## DISCUSIÓN

### **Aislamiento e identificación morfológica y molecular de *P. capsici***

La obtención de los aislamientos de *P. capsici* prueba que este oomiceto sobrevive como micelio o esporangios en tejido de plantas enfermas. Las características morfológicas de las estructuras sexuales y asexuales de las cepas RES y RDP1 coincidieron con las reportadas en la bibliografía especializada y como ya se ha señalado en la mayoría de los aislados obtenidos en campos de cultivo en México (Erwin y Ribeiro, 1996; Fernández-Pavía y col., 2013). La observación de estructuras sexuales fue debido a que *P. capsici* es una especie heterotálica y la producción de oogonios y anteridios involucra la participación de ambos tipos de compatibilidad, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>; lo que genera oosporas, que son el propágulo principal de supervivencia del género (Castro y col., 2012), así como una variabilidad genética en las poblaciones, que puede llevar a la formación de nuevos aislados, más agresivos y resistentes. La presencia de una variabilidad genética en *P. capsici* y de cepas resistentes a diversos fungicidas en el centro de México, ya han sido reportadas (Pérez-Moreno y col., 2003).

La mayoría de las investigaciones han utilizado características morfológicas con propósitos de identificación de *P. capsici*, sin embargo, recientemente las técnicas de biología molecular han sido utilizadas para corroborar e identificar la especie de nuevos aislados.

Para identificar el agente causal de la marchitez en chile jalapeño en el estado de Chihuahua, los aislamientos se identificaron como *P. capsici* mediante morfología y secuenciación de 796 bp con una identidad del 98% (Silvia-Rojas y col., 2009). En el presente trabajo de tesis se obtuvo una identidad del 96% con una secuenciación de 595 bp, lo cual coincide con el número de pares de bases reportado por los investigadores que desarrollaron los primers específicos utilizados para la identificación (Silvar y col., 2005).

## **Pruebas de antagonismo y cinéticas de crecimiento de *Trichoderma* spp. y *P. capsici***

De las tres cepas de antagonistas con las que se trabajó, *T. harzianum* fue la que tuvo más rápido crecimiento en presencia y ausencia de *P. capsici*. Lo anterior coincide con estudios recientes donde se evaluó el crecimiento de diversas cepas de *Trichoderma* en diferentes medios de cultivo y se reportó a *T. harzianum* como la especie con mayor crecimiento y porcentaje de inhibición de fitopatógenos (Srivastava y col., 2014, Musfata y col., 2009).

El comportamiento de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma* ha demostrado que hay un efecto antagónico que impide su desarrollo, como ha sido ya comprobado en otros estudios (Ezziyanni y col., 2004; Guigón-López y González-González, 2004; Ahmed y col., 1999). Se observó que la inhibición del crecimiento de *P. capsici* es gradual, probablemente porque *Trichoderma* debe establecerse primero en el medio para después comenzar la producción de enzimas líticas (Ezziyanni y col., 2007).

El crecimiento de *P. capsici* mostró un bajo porcentaje de inhibición por *Trichoderma* spp. (9-7%); lo anterior probablemente ocurrió debido a que la zona de inhibición frente al patógeno aumenta a medida que transcurre el tiempo (Ezziyanni y col., 2011). Sin embargo, también se observó y registró cierta inhibición en el crecimiento de los antagonistas, incluso mayor a la mostrada por el fitopatógeno. Este fenómeno no ha sido reportado en la literatura y probablemente ayude a explicar el bajo o nulo efecto de control que ejercen algunas cepas de *Trichoderma* spp. sobre *P. capsici* y otros fitopatógenos.

El crecimiento del patógeno se detuvo y registró hasta las 60 horas (2.5 días), cuando su micelio entro en contacto con el micelio de *Trichoderma*. Resultados similares fueron reportados por Osorio-Hernández y colaboradores (2011), quienes mencionan que *Trichoderma* y *P. capsici* entraron en contacto en un lapso de 2 a 3 días.

Las observaciones macroscópicas y microscópicas mostraron diferentes mecanismos de antagonismo y control: *T. asperellum* y *T. koningiopsis* sobrecrecieron al patógeno, mientras que *T. harzianum* sólo frenó el crecimiento de *P. capsici*. Lo anterior se debe

probablemente a la producción de un factor tóxico producido por *T. harzianum* que detuvo el crecimiento de *P. capsici*, sin que necesariamente haya ocurrido un proceso de parasitismo (Howell, 2003).

Aun cuando *T. harzianum* no mostró el típico fenómeno de hiperparasitismo a nivel macroscópico, las observaciones microscópicas mostraron cierto enrollamiento de sus hifas alrededor de las hifas de *P. capsici*. Sin embargo, en el caso de *T. harzianum* no se observó penetración de hifas como en el caso de *T. koningiopsis*. El enrollamiento de las hifas es una respuesta común como parte del reconocimiento de *Trichoderma* hacia el patógeno (Infante y col., 2009), sin embargo, no siempre se lleva a cabo una penetración (Bae y col., 2011).

#### **Producción de esporangios de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma* spp.**

Uno de los mecanismos de antagonismo poco estudiados es la capacidad de producción de esporangios de *P. capsici* en presencia de diferentes especies y cepas de *Trichoderma*. En esta tesis se registraron reducciones del 85 % en RES en presencia de *T. asperellum* y hasta 95% en RDP1 con *T. koningiopsis*. Estos datos pueden ser muy valiosos como criterios para la selección de especies y cepas de *Trichoderma* más antagonicas. De los tres antagonistas, *T. harzianum* fue la que mostró el menor efecto sobre la producción de esporangios, sin embargo, *T. harzianum* redujo de manera significativa y en 78% la esporulación en RDP1. En general, los porcentajes de inhibición obtenidos en esta tesis fueron mayores a los reportados por Santander (2013) quien obtuvo entre 45 y 88% de inhibición. Ambos resultados muestran que existe gran variación en el efecto inhibitorio que pueden ejercer las especies y cepas de *Trichoderma* sobre la esporulación de *P. capsici*.

## CONCLUSIONES

- Las cepas del patógeno aisladas de campo y utilizadas en el estudio fueron identificadas morfológica y molecularmente como *P. capsici*. La banda secuenciada de 595 pb mostró 96 % de identidad con *P. capsici*.
- *T. harzianum* causó la mayor inhibición micelial de *P. capsici*. A las 60 horas *T. harzianum* redujo en 14 % y 9 % el crecimiento micelial de RES y RDP1, respectivamente.
- *T. koningiopsis* causa la mayor inhibición en esporulación de *P. capsici*.
- *T. koningiopsis* redujo en 95 % la producción de esporangios de RDP1, *T. asperellum* en 88 % y *T. harzianum* en 78 %.
- *T. asperellum* fue la que más redujo la esporulación de RES (85 %).
- El análisis con MEB mostró que las hifas de *Trichoderma* envuelven y penetran (parasitan) las hifas de *P. capsici*.
- *T. harzianum* y *T. koningiopsis* mostraron las características más deseables para ser evaluadas como controladores biológicos de *P. capsici* bajo diferentes métodos de aplicación en plantas de Chile (*C. annuum*).

## BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. 5a. Edición. Academic Press. New York, Estados Unidos. 952 p.

Ahmed, A. S., Pérez-Sánchez, C., Egea, C., y Candela, M. E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. Plant Pathology, 48, 58–65.

Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., y Peña-Cabriales, J. J. (2009). Revisión / Review El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 25(4), 257–269.

Avis, T. J., Hamelin, R. C., y Bélanger, R. R. (2001). Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies. Canadian Journal of Plant Pathology, 23, 8–12.

Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., y Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. Soil Biology and Biochemistry, 40(7), 1733–1740.

Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H.S., Strem, M. D., Park, S.C., Ryu, C.M., ... Bailey, B. A. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 24(3), 336–351.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7(4), 249–260.

Blair, J., Coffey M., Park, S., Geiser, D. y Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology. 45,266-277.

Café-Filho, A., y Ristaino, J. B. (2008). Fitness of Isolates of *Phytophthora capsici* Resistant to Mefenoxam from Squash and Pepper Fields in North Carolina. Plant Disease, 92(10), 1439–1443.

Castro, R. A, Fernández, P.S.P y Osuna, A.P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum- Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Fitopatología, 30,49-65.

De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T., Llobell, A., y Romero, L. C. (1995). A novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology, 177(23), 6937–6945.

Demain, A.L., Fang, A., (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 69, 1–39.

Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. Estados Unidos. 562p.

Espinosa-Victoria, D., González-Mendoza, D., Placencia-de la Parra, J. y García Espinosa, R. (2004). Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo. en el sistema radical de plántulas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intraradices*. *Terra Latinoamericana* 22, 317–326.

Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Ahmed, A. S., Requena, M. E y Candela, M.E (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35–45.

Ezziyyani, M., Requena, M. E., Pérez-Sánchez, C., y Candela, M. E. (2005). Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 27, 119–126.

Ezziyyani, M., Requena, M. E., Candela, M. E., y Egea-Gilabert, C. (2007). Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Phytopathology*, 155, 342–349.

Ezziyyani, M., Hamdache, A., Requena, A., Egea-Gilabert, C., y Candela, M. E. (2011). Mejora de la capacidad antifúngica *in vitro e in vivo* de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. *Anales de Biología*, 33, 67–77.

Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M., Ponce-González, F., y Manuel-Pinto, V. (2007). Manejo Biológico de *Phytophthora capsici* Leo, *Fusarium oxysporum* Schlechtend Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mili). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 35–42.

Fernández-Larrea Vega, O. (2001). Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)*, (62), 96–100.

Fernández-Pavía, S. P., Biles, C. L., Waugh, M., Onsurez-Waugh, K., Rodríguez-Alvarado, G., y Liddell, C. (2004). Characterization of Southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian Isolates from Pepper (*Capsicum annuum* L). *Revista Mexicana De Fitopatología*, 22(1), 82–89.

Fernández-Pavía, S. P., Díaz-Celaya, M., y Rodríguez-Alvarado, G. (2013). *Phytophthora* in Mexico. In *Phytophthora: A global Perspective* (pp. 215–221).

Foster, J.M y Hausbeck, M.K. (2010). Managing *Phytophthora* crown and root rot in bell pepper using fungicides and host resistance. *Plant Disease*, 94,697- 702.

García, R., Riera, R., Zambrano, C. y Gutiérrez, L. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10, 115–121.

Guigón-López, C., y González-González, P.A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 117–124.

Hajieghrari, B., Torabi-giglou, M., y Mohammadi, M. R. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 967–972.

Hansen, E. M., Reeser, P. W., y Sutton, W. (2012). *Phytophthora* beyond agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 359–78.

Harman, G. E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol. *Plant Disease*, 8, 377–393.

Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., y Chen, J. (2004). Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147–153.

Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, (February), 190–194.

Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1):4-9. 80.

Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.

Kim S y Kim Y. (2009). Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *Plant Pathology Journal* 25:113-120.

Kubicek, C.P y Harman G.E (2002). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Volumen 1. CRC Press. Estados Unidos. 300 p.

Lamour K. H y Hausbeck M. K. (2001). Investigating the Spatiotemporal Genetic Structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Phytopathology*, 91(10), 973-980.

Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., y Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329–337.

Leonian L.H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*. 12 (9) 401-408

Lorito, M., y Woo, S. L. (2015). Principles of Plant-Microbe Interactions. En Principles of Plant-Microbe Interactions (pp. 345–353).

Michél-Aceves, A., Reyes-De la Cruz, A., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., y Lezama-Gutiérrez, R. (2005). Potencial Antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend Fr. f. sp. *lycopersici* ( Sacc .) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* ( Sacc .) *in vitro* e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(3), 286–293.

Mustafa, A., Khan, M. A., Inam-ul-Haq, M., Pervez, M. A., y Umar, U.D. (2009). Usefulness of different culture media for *in vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against seed-borne fungi of economic importance. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 21(1), 83–88.

Nuez, F., Gil, R y Costa, J. (2003). El Cultivo de los Pimientos, Chiles y Ajíes. Ediciones Mundiprensa. España. 607p.

Osorio-Hernández, E., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., y Castillo-Reyes, F. (2011). *In vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research*, 6(19), 4594–4600.

Ozbay N, Newman S. (2004). Effect of *Trichoderma harzianum* strain to colonize tomato roots and improve transplant growth. *Plant Disease*, 81:492–6.

Ozgonen, H., y Erkilic, A., (2007). Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* L.) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protec.* 26, 1682–1688.

Pérez- Moreno, L., Durán, O.L, Ramírez, M.R, Sánchez, P.R y Olalde, P.V. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:19-25.

Ramos-Sandoval, R. U., Gutiérrez-Soto, J. G., Rodríguez-Guerra, R., Salcedo-Martínez, S. M., Hernández-Luna, C. E., Luna-Olvera, A., Jiménez-Bremont, J. F., Fraire-Velázquez, S. y Almeida, L.I.H. (2010). Antagonismo de dos Ascomicetos Contra *Phytophthora capsici* Leonian, Causante de la Marchitez del Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 75–86.

Reader R.U, Broda P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiol.* 1, 17-20.

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., y Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89–123.

Robles-Yerena, L., Rodríguez-Villarreal, R. A., Ortega-Amaro, M. A., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., Rodríguez-Guerra, R., y Jiménez-Bremont, J. F. (2010). Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 248–255.

Rodríguez-Guzmán, M.D.P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoología Mexicana* 1:53-78.

Santander P.G.I (2013). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. para el control de *Phytophthora capsici* Leoninan causante de la marchitez del pimentón (Tesis de postgrado). Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

Samson, R.A. (1995). Constraints associated with taxonomy of biocontrol fungi. *Canadian Journal of Botany* 73: S83-S88.

Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923–935.

Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96,195-206

Silva-Rojas, H. V., Fernández-Pavía, S. P., Góngora-Canul, C., Macías-López, B. C., y Ávila-Quezada, G. D. (2009). Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 134–147.

Silvar, C., Duncan, J.M., Cooke, D.E.L., Williams, N.A., Díaz, J y Merino, F. (2005). Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology*. 112,43-52.

Srivastava, M., Singh, A., y Shahid, M. (2014). *In vitro* growth performance of *Trichoderma* species and antagonistic activity against soil borne pathogens. *International Journal of Science and Research*, 3(7), 2012–2015.

Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M.M. y Luna-Ruiz, J. de J. (2001). Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19,175-181.

Velásquez-Valle, R., y Medina-Aguilar, M. M. (2003). La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte-centro de México. I. Estudios básicos. CEPAB. México.34p.

Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. y Valéro J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1-20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., y Lorito, M. (2008). *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. *Soil Biology y Biochemistry*, 40, 1–10.



## CAPÍTULO II. PRUEBAS DE ANTAGONISMO EN PLANTA

### OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

- Evaluar la efectividad individual y combinada, de dos especies de *Trichoderma* como controladores biológicos de *P. capsici* en plantas de Chile.
- Comparar la efectividad de diferentes métodos de inoculación de los antagonistas.

### HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO

- En conjunto las cepas de *Trichoderma* mejoran la efectividad del control de *P. capsici*, en comparación con su efecto individual.
- La efectividad del control biológico se incrementa, al incrementar el número de aplicaciones de los antagonistas.

### INTRODUCCIÓN

La selección previa de antagonistas mediante cultivos duales es útil, pero no garantiza la protección de plantas contra el fitopatógeno. En este capítulo se presenta la evaluación de los niveles de protección en plantas de Chile contra *P. capsici* conferidos por *T. harzianum* y *T. koningiopsis* de manera individual y combinada. Para esta prueba se eligió la cepa RES de *P. capsici* por haber mostrado la menor susceptibilidad contra las especies de *Trichoderma in vitro*.

#### La planta de Chile

La planta de Chile pertenece al género *Capsicum*, de la familia de las Solanaceae, donde se han reconocido 31 especies (Moscone y col., 2007). Comprende un conjunto de plantas semiarbustivas perennes, con una altura que varía dependiendo de la variedad, condiciones climáticas y fertilización. Tiene un sistema radical pivotante, ramas

dicotómicas y hojas simples de forma lanceolada u ovada (Ligarreto y col., 2004; Nuez y col., 2003).

El género *Capsicum* presenta diferentes colores de flor, que hace referencia a su especie. En el grupo de flores blancas hay dos subgrupos: el constituido por *C. baccatum* y el que agrupa a *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y en el grupo de flores púrpuras se encuentran las especie *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. pubescens* (Bosland y Votava, 2000).

Sus frutos son bayas que tienen gran variabilidad; se presentan formas elongadas, redondas, triangulares o acampanuladas y los colores del fruto en maduro van desde blanco, amarillo, naranja, morado, marrón hasta negro (Hurtado, 2010). Existen hallazgos arqueológicos en las cavernas de Tamaulipas y Tehuacán de bayas de *C. annuum* que datan del año 7000 A.C, por tanto se ha identificado a México como su centro de origen y domesticación (Aguilar-Méndez y col., 2009).

### **El chile en México**

Nuestro país cuenta con las especies domesticadas y cultivadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. frutescens*, y la silvestre *C. annuum* var. *glabriusculum*. Es posible encontrar poblaciones silvestres de *C. annuum* y *C. frutescens*, que presentan gran variabilidad morfológica y genética, así como las especies *C. ciliatum* que se encuentra en todo el país, con excepción del Noroeste y *C. lanceolatum*, que ha sido reportada únicamente en los estados de Chiapas y Veracruz (Castañón-Nájera y col., 2008).

### **Producción de chile en México**

El chile se produce en prácticamente todo el territorio nacional y es donde se cultiva la mayor variedad. Para el año 2014 se cultivaron 148,969 hectáreas, con un rendimiento de 19 ton/Ha, siendo los estados de Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas los de mayor producción (SIAP, 2015). El cultivo del chile en Aguascalientes es importante por la

superficie establecida, los empleos creados y la derrama económica generada, así como por ser un producto tradicional en la alimentación de la población.

### **Problemas fitosanitarios del chile en México**

Los agricultores enfrentan problemas de tipo fitosanitario en el cultivo, ya que se ve afectado por diversos patógenos en todas sus etapas fenológicas, destacan las enfermedades causadas por virus, hongos, oomicetos, bacterias e insectos.

En México, al igual que en el resto del mundo la enfermedad conocida como “marchitez del chile” la cual provoca una muerte prematura de la planta, es un problema grave para los productores de esta hortaliza. Fue reportada por primera vez por Leonian en 1922 en Nuevo México, señalando a *Phytophthora capsici* como agente causal (Castro y col; 2012). En México, fue reportada su presencia por primera vez en 1956, en plantíos del centro del país (Fernández-Pavía y col; 2013).

Actualmente se ha reportado su presencia en el norte-centro del país en los estados de Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos y Estado de México (Pérez-Moreno y col., 2003; Velásquez-Valle y col., 2001), al sur del estado de Chihuahua donde mostró una gran severidad contra el chile tipo jalapeño (Silva-Rojas y col., 2009) y al sur del país en el estado de Oaxaca incidiendo sobre cultivos de “chile de agua” (Vásquez-López y col., 2009). Con pérdidas en la producción de entre el 10 y 100% (Guigón-López y González-González., 2004).

### **Enfermedad de la marchitez del chile**

En chile, *P. capsici* puede infectar las raíces, flores, tallos, hojas y frutos provocando el tizón foliar, la pudrición de frutos, raíz y tallo, en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Foster y Hausbeck, 2010). Cuando las condiciones son las adecuadas éste

fitopatógono es altamente agresivo, causando severos daños en un periodo corto de tiempo (Fernández-Pavía y col., 2013).

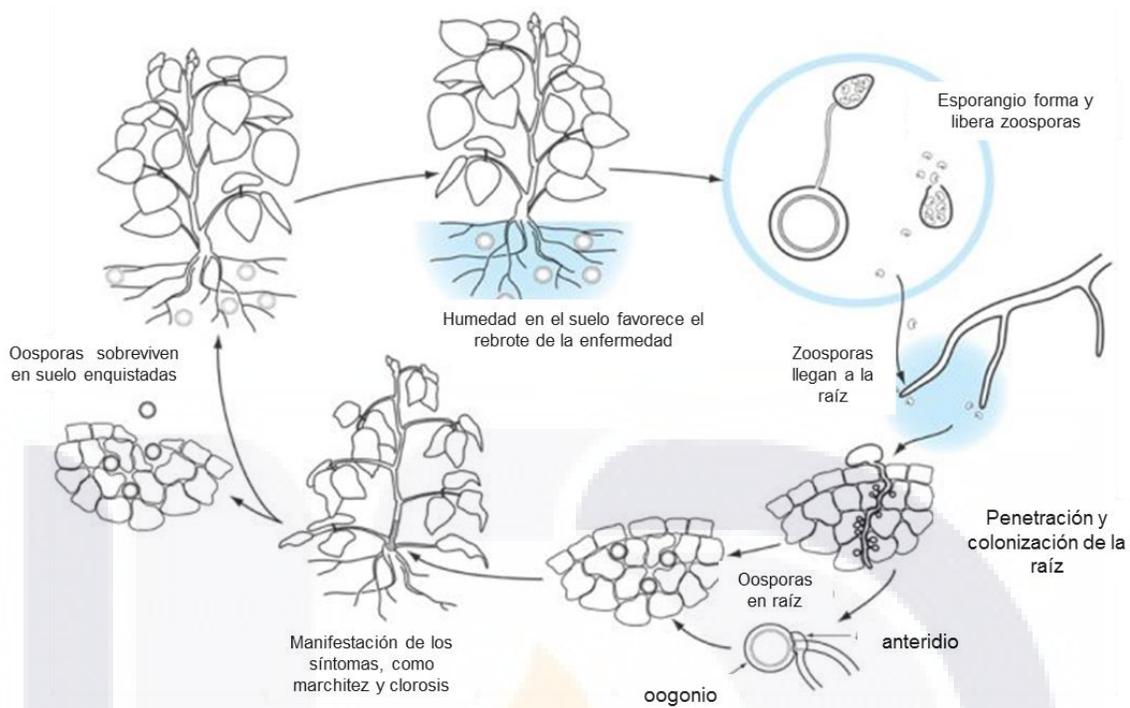
Se han identificado varios síntomas asociados a esta enfermedad, el más común es un daño en el cuello de la raíz, que comienza en los tejidos corticales y posteriormente a los vasculares donde se observa una banda necrosada ascendente sobre el tallo, una lesión circular en la base, que causa decaimiento y muerte de la planta (Santos, 2010). En etapas avanzadas, las lesiones se tornan de color café oscuro, ocurre la muerte de las ramas superiores y el secado total del tallo. En la fase de almácigo, las plántulas pueden morir al nacer o a los pocos días de haber germinado (Velázquez- Valle y col; 2001).

La enfermedad también se manifiesta en los frutos, como puntos acuosos concentrados en la unión del pedúnculo al fruto; estas lesiones se desarrollan rápidamente hasta que cubren totalmente al fruto, lo tornan flácido y arrugado y causan su desprendimiento. Los síntomas se intensifica con los riegos continuos o cuando hay exceso de humedad en el suelo, muy frecuente en los meses de Junio-Agosto (Rodríguez y col., 2007).

### **Ciclo de la enfermedad**

Las zoosporas son los propágulos más efectivos para causar infección ya que pueden nadar o ser arrastradas por la corriente de agua. Después de un determinado tiempo y de acuerdo con las condiciones del medio ambiente, se enquistan y absorben sus flagelos; inmediatamente después, emiten un tubo germinativo que penetra los tejidos de la planta por medio de apresorios (Nuez y col., 2003). El micelio producirá entonces nuevamente grandes cantidades de esporangios y zoosporas para dar inicio a otro ciclo (Fig. 2.1).

La lluvia y el mal drenaje favorece la infección, por lo que la enfermedad se presenta comúnmente después del trasplante, las infecciones en el cuello de la planta se debe a que las zoosporas del patógeno son llevadas por el agua e inician la infección por heridas o las lenticelas. Las lesiones en ramas y hojas se presentan por el inóculo diseminado por el salpique del agua de lluvia (Santos, 2010).



**Figura 2.1.** Ciclo de la marchitez del chile causado por *P. capsici* (Adaptado de Dorrance y col., 2007)

### Manejo de la Enfermedad

El control de la marchitez del chile es cultural, químico, biológico, genético e integral. INIFAP (2013) recomienda llevar a cabo una rotación de cultivos e iniciar con la preparación del terreno que incluya una nivelación adecuada, formación de surcos elevados y utilización de variedades resistentes e híbridos. Además la incorporación de materia orgánica para incrementar tanto el contenido de los microorganismos antagonicos de *P. capsici*, como la retención de humedad del suelo y la aplicación del biocida Metam Sodio.

Tradicionalmente la protección del cultivo de chile contra *P. capsici* se ha realizado mediante el control químico, sin embargo, éste fitopatógeno es genética y bioquímicamente distinto de los hongos que son susceptibles a la mayoría de los fungicidas. Desafortunadamente existen reportes que indican que *P. capsici* ha desarrollado resistencia a diversos fungicidas, como el mefenoxam (Foster y Hausbeck,

2010; Silva-Rojas y col., 2009 y Café-Filho y Ristaino, 2008), sulfato de cobre (Fernández-Pavía y col., 2004) azoxystrobin, metalaxyl y propamocarb (Pérez-Moreno y col., 2003). Lo que ha conducido a la búsqueda y establecimiento de nuevas alternativas para el manejo de la enfermedad.

### **Control Biológico**

El control biológico comenzó mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales. Definido como "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (Bale y col., 2007).

Actualmente se desarrollan agentes de control biológico como hongos, bacterias, virus e insectos que reducen la población de plagas y patógenos que afectan a los cultivos. Los hongos en particular han despertado el interés del mercado e instituciones de investigación por su papel en el control de insectos y enfermedades de origen bacteriano o fúngico, sin dañar el medio ambiente o salud humana (Howell, 2003).

### ***Trichoderma* como agente de control biológico de *P. capsici***

El potencial del género *Trichoderma* ha sido extensamente documentado, se sabe que emplea diversos mecanismos para proveer el control de enfermedades, incluyendo antibiosis, parasitismo, competencia por espacio y nutrientes y en algunos casos induce la resistencia de la planta (Bae y col., 2011). Un mismo aislado de *Trichoderma* suele emplear más de un mecanismo de acción para el control.

Dependiendo de la cepa, *Trichoderma* retrasa el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici*, reduciendo la incidencia de marchitez en la raíz e induce una fuerte defensa y resistencia en la planta, lo que muestra que su presencia es inofensiva para la planta (Ezziyani y col., 2007).

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas (Verma y col., 2007), de igual modo pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Argumedo- Delira y col., 2009). Así, *T. harzianum* y otras especies del género son capaces de incrementar el crecimiento de las plantas (Ezziyanni y col., 2004) e inducir respuesta y resistencia a patógenos (Verma y col., 2007).

Se ha demostrado que *T. harzianum* induce una resistencia sistémica en plantas de pimiento que crecen a partir de semillas tratadas con las esporas. El tratamiento de las semillas reduce el progreso de la necrosis causada por *P. capsici* en los tallos de las plantas tratadas. *T. harzianum* persiste en la semilla tratada y prolifera en las raíces, además de ejercer una protección sobre la parte aérea aumentando las concentraciones de fitoalexinas y capsidiol (Ahmed y col., 2000).

En México se han reportado dos cepas nativas de *Trichoderma harzianum*, TC74 y TS01, que redujeron la velocidad de incremento y la severidad del marchitamiento de plantas de chile causado por *P. capsici* y se observó que promovieron un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas (Guigón-López y González-González; 2004). Aun con la importancia que tiene la producción de chile en nuestro país, pocos son los estudios que se han hecho con pruebas *in vivo* que den sustento al uso de controladores biológicos en los campos de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de tratamientos

Se realizó un experimento factorial para evaluar la efectividad de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* como controladores biológicos de *P. capsici* en una variedad de chile tipo Húngaro susceptible a *P. capsici*. El trabajo se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero en las instalaciones del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes entre Febrero y Diciembre de 2014. La aplicación de *Trichoderma* se llevó a cabo en semilla, en planta y en ambas etapas. Los dos antagonistas fueron aplicados de manera individual y combinada (mezclando las dos especies de *Trichoderma*), generando tres niveles para este factor. Al combinar los dos factores anteriores (3 etapas de aplicación x 3 fuentes del antagonista) se generaron 9 tratamientos combinados, más un tratamiento control sin *Trichoderma* para un total de 10 tratamientos (Cuadro 2.1). Para evaluar los niveles de protección por *Trichoderma*, los 10 tratamientos fueron inoculados con *P. capsici* a los 15 días de haber aplicado el tratamiento de *Trichoderma* en la etapa de planta.

**Cuadro 2.1** Tratamientos incluidos en el experimento

No. Tratamiento	Antagonista	Tipo de Inoculación
1	<i>T. koningiopsis</i>	semilla
2	<i>T. koningiopsis</i>	planta
3	<i>T. koningiopsis</i>	sem + planta <sup>1</sup>
4	<i>T. harzianum</i>	semilla
5	<i>T. harzianum</i>	planta
6	<i>T. harzianum</i>	sem + planta
7	T. k + T. h <sup>2</sup>	semilla
8	T. k + T. h	semilla
9	T. k + T. h	planta
10	Control	Sin <i>Trichoderma</i>

1. Doble inoculación 2. Combinación de esporas de *T. koningiopsis* y *T. harzianum*

### **Preparación de inóculo de los antagonistas**

En cajas de petri con medio V8-A donde *T. koningiopsis* o *T. harzianum* habían esporulado, se añadieron 10 ml de agua destilada estéril y se agitó con una varilla de vidrio. La suspensión se filtró a través de cuatro capas de gasa colocadas en un embudo de plástico para remover el micelio y se recuperó en tubos de ensayo estériles y se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^6$  esporas por ml.

### **Preparación del inóculo de *P. capsici***

Se colocaron en diferentes cajas de petri varios discos de 1 cm de diámetro con micelio del patógeno. Luego se añadieron 10 ml de agua destilada por caja y se incubaron sin luz por 2-3 días a  $\sim 27^\circ\text{C}$  para inducir la formación de esporangios.

La liberación de zoosporas se indujo colocando las cajas de petri con esporangios en un refrigerador a  $5^\circ\text{C}$  por 30-60 minutos y luego a temperatura ambiente. La suspensión de zoosporas fue separada de los discos y partículas de agar mediante filtrado en gasa colocada sobre un embudo. La suspensión para inocular fue ajustada a una concentración de 2000 zoosporas /ml.

### **Producción e inoculación de planta**

La planta fue producida en 20 charolas de 60 cavidades previamente preparadas con peat moss estéril, de acuerdo a la distribución de tratamientos y charolas del Cuadro 2.2.

**Cuadro 2.2** Distribución de charolas y tratamientos para la producción de planta

No. Charola	Antagonista	Tipo de inoculación con <i>Trichoderma</i>	No. Charola	Antagonista	Tipo de Inoculación con <i>Trichoderma</i>
1	<i>T. koningiopsis</i>	Semilla	11	<i>T. harzianum</i>	Semilla + planta
2	<i>T. koningiopsis</i>	Semilla	12	<i>T. harzianum</i>	Semilla + planta
3	<i>T. koningiopsis</i>	Planta	13	T.k + T.h <sup>2</sup>	Semilla
4	<i>T. koningiopsis</i>	Planta	14	T.k + T.h	Semilla
5	<i>T. koningiopsis</i>	semilla + planta <sup>1</sup>	15	T.k + T.h	Planta
6	<i>T. koningiopsis</i>	semilla + planta	16	T.k + T.h	Planta
7	<i>T. harzianum</i>	Semilla	17	T.k + T.h	semilla + planta
8	<i>T. harzianum</i>	Semilla	18	T.k + T.h	semilla + planta
9	<i>T. harzianum</i>	Planta	19	Control	sin <i>Trichoderma</i>
10	<i>T. harzianum</i>	Planta	20	Control	sin <i>Trichoderma</i>

(1) Doble inoculación (2) Combinación de esporas de *T. koningiopsis* y *T. harzianum*. Solo las charolas con número no fueron inoculadas con *P. capsici*. El resto fueron controles sin *P. capsici*.

### **Inoculación en semilla con *Trichoderma***

Se trabajó con semillas de chile tipo Húngaro, que se lavaron en condiciones de asepsia con hipoclorito de sodio al 2% por tres minutos, después con agua destilada por un minuto, dos veces. Las semillas se inocularon con la suspensión de esporas de los antagonistas y su mezcla y se incubaron por 1h a 28°C en una cámara bioclimática. Las semillas destinadas para plantas testigo o programadas para inoculación en etapa de planta fueron tratadas solamente con agua estéril.

### **Inoculación en planta con *Trichoderma***

Para esta etapa se utilizaron plantas con 5-6 hojas verdaderas las cuales recibieron 5 ml de la suspensión de esporas en la base del tallo según el tratamiento asignado (Cuadro 2.2). Las plantas designadas como testigo recibieron 5 ml de agua destilada estéril.

### **Inoculación de plantas con *P. capsici***

Quince días después de la inoculación en planta con *Trichoderma*, las charolas con números nones fueron inoculadas con 5 ml de la suspensión de zoosporas de *P. capsici*, mientras que las charolas con números pares solo fueron tratadas con agua destilada (Cuadro 2.2). Las charolas se inundaron y cubrieron con plástico para propiciar el medio adecuado para la infección. El plástico se retiró a las 24 h junto con el exceso de humedad.

### **Variables de respuesta al tratamiento**

Se registró la severidad por marchitez a los 25 días después de la inoculación con *P. capsici* siguiendo la siguiente escala de severidad: 0= planta sana, 1= pérdida de turgencia, 2= pérdida de turgencia y color 3= hojas marchitas con tallo verde, 4=planta muerta por marchitez. También se registró la longitud en centímetros de la lesión necrótica en la base del tallo.

Adicionalmente y para evaluar si los antagonistas tuvieron algún efecto en el vigor de las plantas, se registró el grosor del tallo y altura de planta a los 22 días después de la siembra (inoculación en semilla), al momento de la inoculación con *Trichoderma* en planta y antes de la inoculación con el patógeno. Lo anterior corresponde a los 22, 44 y 60 días después de la siembra (dds).

### **Análisis estadístico de los datos**

Todos los datos obtenidos fueron organizados en una base de datos en Excel y analizados estadísticamente con el programa STATISTICA 8.0. Se realizaron análisis de varianza por variable y pruebas de Tukey ( $p < 0.05$ ) para comparar las medias de cada tratamiento y el control.

## RESULTADOS

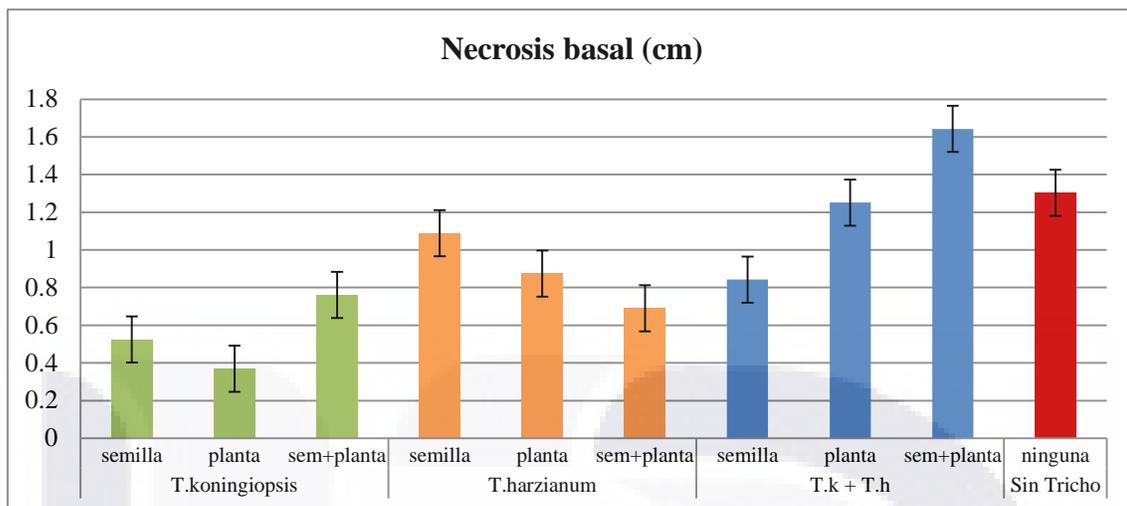
### Necrosis

Los resultados para la variable necrosis se resumen en el Cuadro 2.3. Como síntomas de la enfermedad causadas por *P. capsici*, se observaron lesiones necróticas que variaron desde 0.4 hasta 1.6 cm, valor obtenido con el tratamiento de doble inoculación con esporas de *T. koningiopsis* y *T. harzianum* (Cuadro 2.3). Las plantas que fueron tratadas con *T. koningiopsis* en general mostraron las lesiones de menor tamaño y junto con *T. harzianum* inoculada en semilla+planta fueron los únicos tratamientos significativamente con menor lesión que el control (Fig. 2.2)

**Cuadro 2.3** Necrosis basal por *P. capsici* en plantas de chile tratadas con diferentes antagonistas y tipos de inoculación

Antagonista	Tipo de Inoculación	Necrosis basal promedio (cm)
<i>T. koningiopsis</i>	semilla	0.5 <sup>**</sup>
	planta	0.4 <sup>**</sup>
	sem+planta	0.8
<i>T. harzianum</i>	semilla	1.1
	planta	0.9
	sem+planta	0.7 <sup>*</sup>
T.k + T.h	semilla	0.8
	planta	1.3
	sem+planta	1.6
Control sin <i>Trichoderma</i>	-----	1.3

(<sup>\*\*</sup>) diferencia altamente significativa (p<0.01) y (<sup>\*</sup>) significativa (p<0.05) con respecto al control



**Figura 2.2** Longitud de las lesiones necróticas (en cm) causadas por *P. capsici* en plantas de Chile tratadas con diferentes antagonistas y tipos de inoculación.

De acuerdo al análisis estadístico (Cuadro 2.4, 2.5 y 2.6) comparando los tipos de inoculaciones y antagonistas, *T. koningiopsis* es más eficiente inoculado en planta, mientras que en el caso de *T. harzianum* se obtuvieron mejores resultados al ser inoculado en semilla y en planta (doble inoculación), pero estadísticamente no se muestran diferencias. Por otro lado, la inoculación de ambos antagonistas es más eficiente siendo inoculados en semilla, mientras que con una doble inoculación se presentaron lesiones necróticas mayores, incluso a las del control, pero estadísticamente no hay una diferencia.

**Cuadro 2.4** Necrosis basal por *P. capsici* en plantas tratadas con *T. koningiopsis* y diferentes tipos de inoculación

Antagonista	Tipo de Inoculación	Necrosis basal media (cm)
<i>T. koningiopsis</i>	Semilla	0.5ab
	Planta	0.4a
	sem+planta	0.8b

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ )

**Cuadro 2.5** Necrosis basal por *P. capsici* en plantas tratadas con *T. harzianum* y diferentes tipos de inoculación

Antagonista	Tipo de Inoculación	Necrosis basal (cm)
<i>T. harzianum</i>	semilla	1.1a
	planta	0.9a
	sem+planta	0.7a

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ )

**Cuadro 2.6** Necrosis basal por *P. capsici* en plantas tratadas con *T. koningiopsis* + *T. harzianum* y diferentes tipos de inoculación

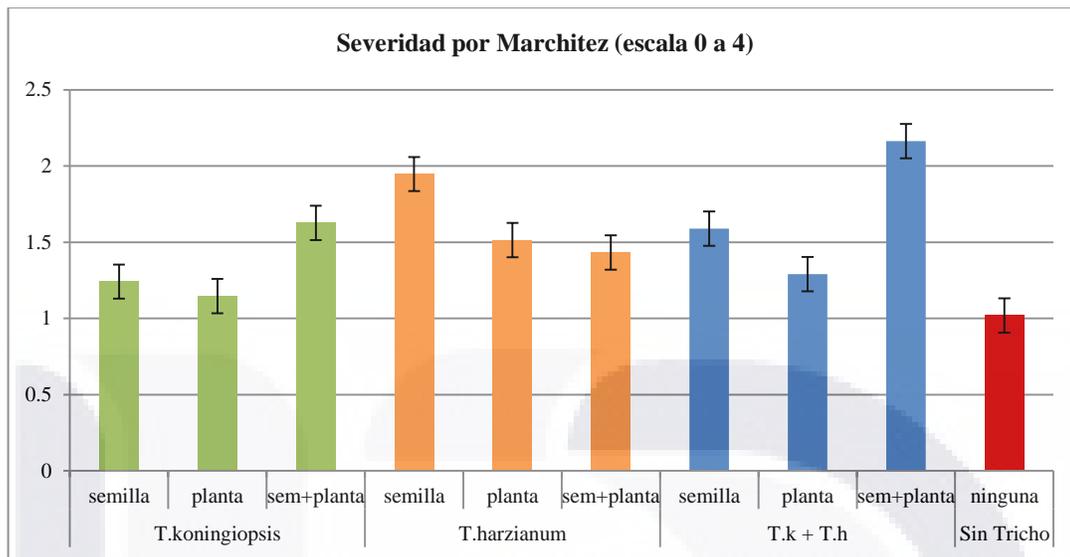
Antagonista	Tipo de Inoculación	Necrosis basal (cm)
T. k + T. h	semilla	0.8a
	planta	1.3a
	sem+planta	1.6a

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ )

### Marchitez

No se observó una relación entre la necrosis y el grado de marchitez ya que las plantas testigos fueron las que mostraron el menor nivel de marchitez y los niveles más altos se presentaron en las plantas tratadas con ambos antagonistas, con doble inoculación y en las inoculadas en semilla con *T. harzianum* (Fig. 2.3), sin embargo, de acuerdo a la escala utilizada, sólo corresponde a una pérdida de color y turgencia.

En el cuadro 2.7 se muestra que estadísticamente en la mayoría de los casos no hubo diferencia significativa en el grado de severidad presente en las plantas tratadas y el control. En los casos donde las plantas fueron tratadas con *T. koningiopsis* en semilla+planta y con *T. harzianum* la diferencia en severidad con respecto al control sí fue significativa. Lo anterior indica que ningún de los tratamientos con *Trichoderma* que se evaluaron tiene efectividad en la disminución de severidad de la marchitez.



**Figura 2.3.** Severidad media de la marchitez por *P. capsici* en plantas de chile inoculadas con diferentes antagonistas y tipos de inoculación. Escala de severidad: 0=planta sana y 4=planta muerta por marchitez

**Cuadro 2.7** Severidad de la marchitez por *P. capsici* en plantas tratadas con diferentes antagonistas y tipos de inoculación

Antagonista	Tipo de Inoculación	severidad media
<i>T. koningiopsis</i>	semilla	1.242ns
	planta	1.147ns
	sem+planta	1.627*
<i>T. harzianum</i>	semilla	1.947*
	planta	1.514ns
	sem+planta	1.432ns
T. k + T. H	semilla	1.589ns
	planta	1.290ns
	sem+planta	2.163ns
Control sin <i>Trichoderma</i>	-----	1.020

(\*) Diferencias significativas (DMS,  $p < 0.05$ ) con respecto al control sin *Trichoderma*

### **Efecto de los antagonistas en el vigor de la planta**

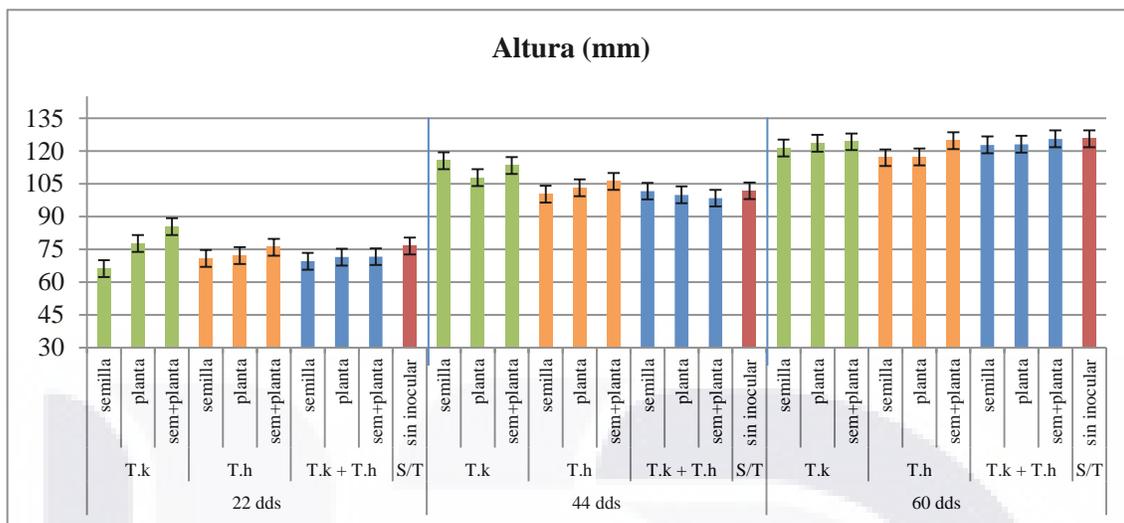
Los resultados para grosor del tallo y altura de planta se presentan en el Cuadro 2.8 y Figura 2.4. Se analizó la variación de la altura y grosor de las plantas a los 22, 44 y 60 dds, según el tratamiento que recibieron con cada antagonista y tipo de inoculación. Las variaciones en grosor fueron menores a un milímetro en todos los casos (Cuadro 2.8), sin embargo, hubo una disminución significativa a los 22 dds, en las plantas que fueron tratadas con *T. koningiopsis* en semilla y un aumento altamente significativo en el grosor de todas las plantas que fueron inoculadas con *T. harzianum* a los 44 dds, al igual que las plantas que fueron inoculadas en planta con T. k + T. h, mostraron un aumento significativo en su grosor.

En cuanto al parámetro de altura a los 22 dds, hubo una inhibición en el crecimiento de las plantas que fueron tratadas en semilla independientemente del antagonista, la inoculación directa en planta de los antagonistas por separado, no mostró diferencias significativas comparando con el control. Mientras que las plantas que fueron inoculadas con ambos antagonistas inhibieron el crecimiento de la planta en todos los casos. A los 44 dds, se registró un aumento altamente significativo en la altura de plantas que fueron inoculadas con *T. koningiopsis* y a los 60 dds, hubo una disminución significativa en las plantas que fueron tratadas con *T. harzianum* (Cuadro 2.8).

**Cuadro 2.8** Promedios del grosor y altura de plantas tratadas con diferentes antagonistas y tipos de inoculación. (Se muestran los valores medios registrados en plantas a los 22, 44 y 60 dds, antes de la inoculación con *P. capsici*)

dds	Antagonista	Tipo de inoculación	Grosor (mm)	Altura (mm)
22	<i>T. koningiopsis</i>	semilla	2.3*	66.1**
		planta	2.5ns	77.6ns
		sem+planta	2.6ns	85.4**
	<i>T. harzianum</i>	semilla	2.5ns	70.8*
		planta	2.5ns	72.2ns
		sem+planta	2.6ns	75.9ns
	T. k + T. H	semilla	2.3ns	69.5**
		planta	2.5ns	71.4*
		sem+planta	2.6ns	71.6*
	Control sin <i>Trichoderma</i>	sin inocular	2.5	76.5
44	<i>T. koningiopsis</i>	semilla	2.8ns	115.5**
		planta	2.8ns	107.8*
		sem+planta	2.8ns	113.3**
	<i>T. harzianum</i>	semilla	3.3**	100.2ns
		planta	3.3**	103.1ns
		sem+planta	3.5**	106.1ns
	T. k + T. H	semilla	2.8ns	101.6ns
		planta	3.0*	99.9ns
		sem+planta	2.8ns	98.4ns
	Control sin <i>Trichoderma</i>	sin inocular	2.8	101.8
60	<i>T. koningiopsis</i>	semilla	3.6ns	121.4ns
		planta	3.5ns	123.5ns
		sem+planta	3.6ns	124.2ns
	<i>T. harzianum</i>	semilla	3.4ns	116.9**
		planta	3.5ns	117.3**
		sem+planta	3.5ns	124.7ns
	T. k + T. H	semilla	3.5ns	122.8ns
		planta	3.5ns	123.1ns
		sem+planta	3.5ns	125.6ns
	Control sin <i>Trichoderma</i>	sin inocular	3.5	125.6

(\*) Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) y (\*\*) altamente significativa ( $p < 0.01$ ) con relación al control sin *Trichoderma* dentro de los mismos dds, según la DMS



**Figura 2.4** Altura de las plantas a los 22,44 y 60 dds, según el tipo de inoculación y antagonista. (Datos registrados antes de la inoculación con *P. capsici*)

## DISCUSION

El síntoma inicial más evidente de la marchitez del chile causada por *P. capsici* es una ligera pérdida de turgencia o marchitez y en algunas ocasiones como manifestaciones de la pudrición de la raíz se observan lesiones necróticas en la base del tallo (Velásquez y Medina; 2003). No se registraron en el experimento plantas asintomáticas inoculadas con *P. capsici*, lo cual indica que todas fueron infectadas por el patógeno en mayor o menor medida, independientemente del tratamiento.

En los casos donde se ha estudiado el efecto de *Trichoderma* inoculado directamente en sustrato, se han obtenido resultados similares a los nuestros, es decir, un retraso en el desarrollo de los síntomas (Bae y col., 2011; Ezziyanni y col., 2011; Guigón-López y González-González; 2004; Ahmed y col., 1999). El tipo de inoculación reportado por estos autores implica la incorporación de micelio activo del antagonista al sustrato, lo que difiere de la metodología empleada en ésta tesis. Es probable que al incorporar esporas al suelo, éstas tarden más en germinar porque deben pasar por un proceso de adaptación al medio.

Con la inoculación en semilla se obtuvieron mejores resultados con *T. koningiopsis* que con *T. harzianum*, contario a lo reportado en otro trabajos donde se obtuvieron mejores resultados inoculando *T. harzianum* en semilla comparado con la inoculación en planta (Ahmed y col., 2000). Se ha observado que el tratamiento de semillas de pimiento con una suspensión de esporas de *T. harzianum*, afecta negativamente el crecimiento de las radículas de las semillas de pimiento (Ezziyanni y col., 2004); sin embargo, para nuestro experimento, prácticamente todas las semillas tratadas con cualquiera de las suspensiones de los antagonistas germinaron aparentemente normal.

Por otro lado, se ha reportado que dos cepas antagónicas ejercen un mejor control al aplicarse por separado ya que al inocularse en forma conjunta se observa mayor velocidad de incremento y mayor severidad del marchitamiento (Guigón-López y González-González; 2004). Esto indica una posible competencia entre ambas cepas y la pérdida en la protección de las plantas. En trabajos sobre compatibilidad *in vitro* de aislados de *Trichoderma*, se registraron casos de total incompatibilidad y efecto

inhibitorio (Ruano y Herrera; 2009; LeLay y col., 2007), lo que podría dar explicación a los resultados desfavorables observados al momento de inocular *T. koningiopsis* y *T. harzianum* de manera conjunta.

La suposición de que la solución para el control biológico de fitopatógenos puede ser el uso de la combinación de antagonistas, especialmente si muestran modelos de acción complementarios, ya ha sido probada con diversas combinaciones, pero donde se ha involucrado especies de hongos y bacterias (Ezziyanni y col., 2007).

Las plantas testigo sin *Trichoderma* mostraron menor pérdida de color y turgencia lo cual sugiere que algunas plantas muestran cierta tolerancia al patógeno y pueden durar hasta 60 días después de la inoculación para mostrar síntomas (Anaya-López y col., 2011).

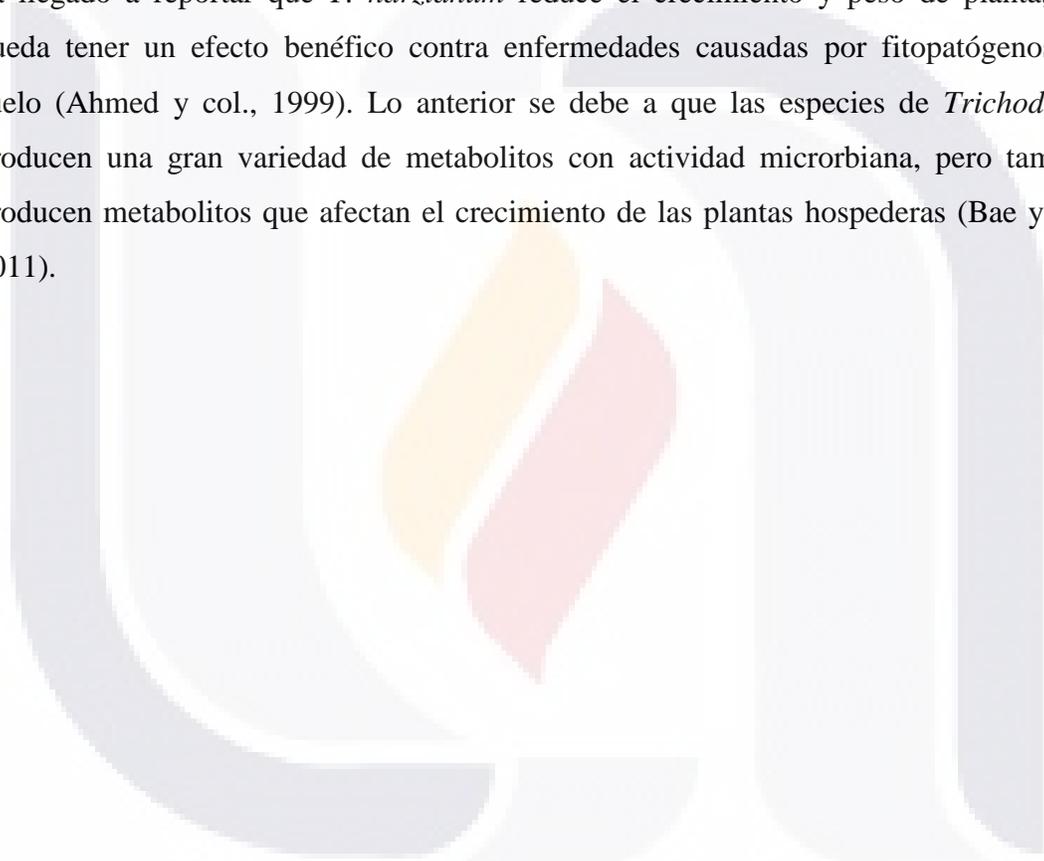
Cabe mencionar que con los resultados obtenidos no se observó una clara protección contra el patógeno. Tampoco se observó una clara relación entre el método de inoculación o frecuencia de aplicación, con la disminución de síntomas de marchitez y necrosis. En la literatura se reporta que no hay relación estadística significativa entre la dosis de esporas aplicadas de *Trichoderma* y la longitud de la lesión con necrosis (Ahmed y col., 1999). Es importante destacar que en trabajos similares al nuestro, se reportan diferentes dosis de inoculante, tanto para los antagonistas como para el patógeno (Segarra y col., 2013; Ezziyanni y col., 2011; Guigón-López y González-González; 2004), sin embargo, no hay reportes sobre frecuencias de aplicación del antagonista.

Además de evaluar la capacidad antagónica que tiene *T. koningiopsis* y *T. harzianum* para inhibir el desarrollo de la marchitez por *P. capsici*, se evaluó su capacidad para aumentar el vigor, reflejado en un aumento en el crecimiento y grosor de la planta.

Las medidas de grosor no resultaron contundentes, ya que se registró una mínima variación., lo que contrasta con los resultados reportados para jitomate tratado en semilla y plántula con esporas de *Trichoderma*, observándose un incremento significativo en el diámetro basal de las plantas (Azarmi y col., 2011).

Con relación a la altura de planta, se observó que la inoculación con *T. koningiopsis* aumento la talla de las plantas a los 44 dds. En general a los 60 dds, no se detectaron diferencias significativas en la altura de plantas inoculadas y no inoculadas con algún tipo de antagonista, a pesar de la capacidad que tienen las especies de *Trichoderma* para incrementar el crecimiento y desarrollo de diversos cultivos (Benítez y col., 2004).

En la literatura se hace hincapié que “algunas” cepas de *Trichoderma* incrementan el crecimiento de la planta y la producción de los cultivos (Vinale y col., 2008). Incluso se ha llegado a reportar que *T. harzianum* reduce el crecimiento y peso de planta, aun pueda tener un efecto benéfico contra enfermedades causadas por fitopatógenos del suelo (Ahmed y col., 1999). Lo anterior se debe a que las especies de *Trichoderma* producen una gran variedad de metabolitos con actividad microrbiana, pero también producen metabolitos que afectan el crecimiento de las plantas hospederas (Bae y col., 2011).



## CONCLUSIONES

Con base a los resultados del estudio, se derivaron las siguientes conclusiones para este capítulo:

- En conjunto las cepas de *Trichoderma* no mejoran la efectividad del control de *P. capsici*, en comparación con su efecto individual.
- La efectividad del control biológico no se incrementa, al incrementar el número de aplicaciones de los antagonistas.
- *T. koningiopsis* inoculado en semilla o planta, reduce significativamente el tamaño de las lesiones de necrosis causadas por *P. capsici*, lo mismo ocurre con una doble inoculación de *T. harzianum* (semilla + planta).
- *T. koningiopsis* y *T. harzianum* protegen mejor contra *P. capsici* cuando son inoculadas por separado que combinadas.
- La incorporación de *T. harzianum* o *T. koningiopsis*, ya sea por inoculación en semilla, o directamente en planta no confiere una protección total contra *P. capsici*.
- Ninguno de los tratamientos evaluados mejoró de manera significativa el vigor de las plantas. De hecho, se registró cierta inhibición en el desarrollo de las plantas tratadas con *T. harzianum*.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Meléndez, A., Morrel, P. L., Roose, M. L., y Seung-Chul, K. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; SOLANACEAE) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190–1202.

Ahmed, A. S., Pérez-Sánchez, C., Egea, C., y Candela, M. E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, 48, 58–65.

Ahmed, A. S., Sánchez, C. P., y Candela, M. E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 817–824.

Anaya-López, J., González-Chavira, M., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., Rodríguez-Martínez, R., Guevara-González, R... Torres-Pacheco, I. (2011). Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(3), 373–383.

Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., y Peña-Cabriales, J. J. (2009). Revisión / Review El Género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 257–269.

Azarmi, R., Hajieghrari, B., y Giglou, A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5850–5855.

Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H.S., Strem, M. D., Park, S.C., Ryu, C.M., ... Bailey, B. A. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI, 24(3), 336–351.

Bale, J., Van Lenteren, J. y Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 363, 761–776.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260.

Bosland, P. W., y Votava, E.J., (2000). Peppers: Vegetables and Spice *Capsicum*. *Crop Production Science in Horticulture*. CAB International Publishing. Inglaterra. 204p.

Café-Filho, A., y Ristaino, J. B. (2008). Fitness of Isolates of *Phytophthora capsici* Resistant to Mefenoxam from Squash and Pepper Fields in North Carolina. *Plant Disease*, 92(10), 1439–1443.

Castañón-Nájera, G., Mendoza-Elos, M., Latournerie-Moreno, L., Vargas-López, A. y Cárdenas-Morales, H. (2008). Colección y caracterización de Chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Phyton*, 77, 189–202.

Castro, R. A, Fernández, P.S.P y Osuna, A.P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum*- *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30,49-65.

Dorrance, A.E., D. Mills, A.E. Robertson, M.A. Draper, L. Giesler, y A. Tenuta. (2007). *Phytophthora* root and stem rot of soybean. The Plant Health Instructor. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/PhytophthoraSoyjae.aspx>

Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Ahmed, A. S., Requena, M. E y Candela, M.E (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimienta (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35–45.

Ezziyyani, M., Requena, M. E., Candela, M. E., y Egea-Gilabert, C. (2007). Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Phytopathology*, 155, 342–349.

Ezziyyani, M., Hamdache, A., Requena, A., Egea-Gilabert, C., y Candela, M. E. (2011). Mejora de la capacidad antifúngica *in vitro e in vivo* de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. *Anales de Biología*, 33, 67–77.

Fernández-Pavía, S. P., Biles, C. L., Waugh, M., Onsurez-Waugh, K., Rodríguez-Alvarado, G., y Liddell, C. (2004). Characterization of Southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian Isolates from Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana De Fitopatología*, 22(1), 82–89.

Fernández-Pavía, S. P., Díaz-Celaya, M., y Rodríguez-Alvarado, G. (2013). *Phytophthora* in Mexico. In *Phytophthora: A global Perspective* (pp. 215–221).

Foster, J.M y Hausbeck, M.K. (2010). Managing *Phytophthora* crown and root rot in bell pepper using fungicides and host resistance. *Plant Disease*, 94,697- 702.

Guigón-López, C., y González-González, P.A. (2004). Selección de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 117–124

Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1):4-9. 80.

Hurtado, T. I. 2010. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en germoplasma de *Capsicum* spp. Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Maestría, Palmira, Colombia, 99 p.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (2013). Manejo Integrado de Enfermedades en el cultivo de chile. México. (<http://www.inifap.gob.mx>, consultado el 29 de Abril de 2013)

LeLay, Y., Ruano-Rosa, D., y López-Herrera, C. (2007). Estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate. In VI World Avocado Congress (p. s/n).

Ligarreto, G.A; Espinosa-Bayer N. y Méndez, M.A. (2004). Recursos genéticos y Cultivo de ají y pimentón (*Capsicum* sp.). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. 87p.

Nuez, F; Gil, R y Costa, J. (2003) El Cultivo de los Pimientos, Chiles y Ajés. Ediciones Mundiprensa. España. 607p.

Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabile, M., Cecchini, N.M., Sánchez García, Y., Jarret, R., Daviña, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E. y Ehrendorfer, F. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum* - solanaceae): a cytogenetic perspective. Acta Horticulturae, 745,137-170

Pérez-Moreno, L., Durán, O.L, Ramírez, M.R, Sánchez, P.R y Olalde, P.V. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 21:19-25.

Rodríguez, J., Peña Olvera, B. V, Muñoz, A. G., Martínez Corona, B., Manzo, F., y Salazar Liendo, L. (2007). Rescate *in situ* del chile “poblano” en Puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 30, 25–32.

Ruano, R.D. y López, H. C. J. (2009). Evaluation of *Trichoderma* spp . as biocontrol agents against avocado white root rot. Biological Control, 51(1), 66–71.

Santos, J.P. (2010). Estrategia para el control de *Phytophthora capsici* Leo. y *Fusarium solani* Mart. en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría. Texcoco, Edo. de México.

Segarra, G., Avilés, M., Casanova, E., Borrero, C., y Trillas, I. (2013). Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. Phytopathologia Mediterranea, 52(1), 77–83.

Silva-Rojas, H. V., Fernández-Pavía, S. P., Góngora-Canul, C., Macías-López, B. C., y Ávila-Quezada, G. D. (2009). Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología, 27(2), 134–147.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Vásquez-López, A., Tlapal-Bolaños, B., Yañez-Morales, M. de J., Pérez-Pacheco, R., y Quintos-Escalantes-M. (2009). Etiología de la marchitez del “chile de agua” (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 127–134.

Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M.M. y Luna-Ruiz, J. de J. (2001). Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19:175-181.

Velásquez-Valle, R., y Medina-Aguilar, M. M. (2003). La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte-centro de México. I. Estudios básicos. CEPAB. México.34p.

Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. y Valéro J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.*, 37, 1-20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., y Lorito, M. (2008). *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. *Soil Biology y Biochemistry*, 40, 1–10.

# TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

## **CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN PATÓGENO-ANTAGONISTA-PLANTA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

### **OBJETIVO DEL CAPÍTULO**

- Analizar la interacción a nivel de microscopía electrónica entre antagonista-patógeno y planta.

### **HIPÓTESIS**

- Dado su contenido descriptivo, no se propuso una hipótesis específica para este capítulo.

## **INTRODUCCIÓN**

La investigación fitopatológica se ha centrado en el antagonismo de hongos por dos razones muy diferentes. Por un lado se han presentado pruebas de que la comprensión de los mecanismos exactos de cómo trabajan los antagonistas, es un requisito esencial para la evolución futura y selección de los mejores agentes de control biológico de acuerdo a un comportamiento predictivo.

Por otro lado, la interacción entre un antagonista y un fitopatógeno no es un proceso simple mediado por una sola molécula activa biológicamente, sino que incluye un amplio intercambio de señales moleculares que, a su vez, inducen una respuesta compleja que conduce a una serie de eventos que trabajan de forma sincrónica.

El estudio de la interacción que involucra a los tres factores: el agente de control biológico, la planta y el hongo fitopatógeno ha recibido menos atención en comparación con las interacciones simples que implican a sólo dos de los factores. Existen obvias dificultades para estudiar un sistema tan complejo aún *in vitro*, aunque de ésta manera se simularían mejor las interacciones que ocurren en el suelo de los agroecosistemas.

Existen pocos registros sobre la citología y los eventos moleculares implicados en la interacción entre el antagonista, el fitopatógeno y la planta. Aunque se han observado marcadas diferencias en cuanto a la susceptibilidad del huésped (Benhamou y col.,1999).

Vinale y colaboradores (2008) sugieren un análisis *in situ* de los compuestos implicados cuando las plantas están expuestas simultáneamente a diferentes microorganismos beneficiosos y patógenos, lo que pudiera ser realizado empleando técnicas moleculares y de microscopia avanzada.

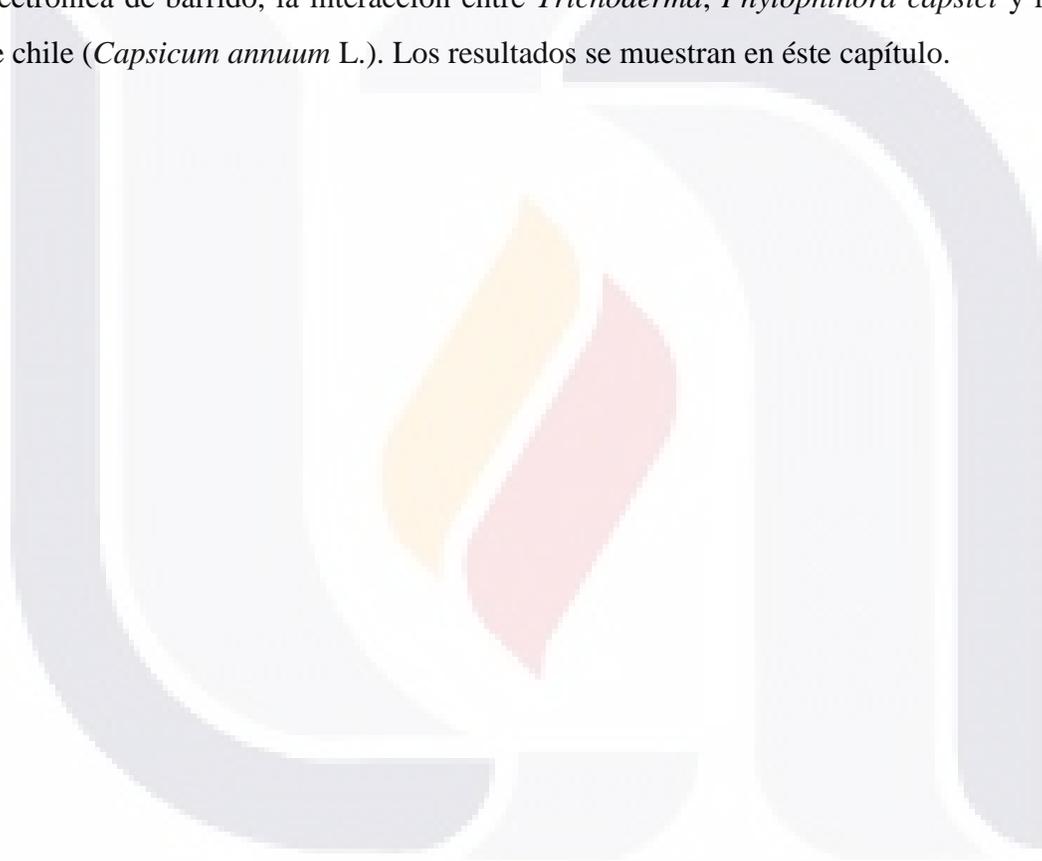
En la actualidad, a pesar de la comprensión adquirida acerca de la acción antagónica y la promoción del crecimiento que confiere *Trichoderma* y la creciente cantidad de investigación dedicada a la actividad antimicrobiana *in vitro*, el conocimiento de los mecanismos exactos responsables de la reducción observada en la incidencia de las enfermedades, aún está incompleta (Yedidia y col., 1999).

De acuerdo con Punja y Utkhede (2003) *Trichoderma* es el hongo micoparasítico más ampliamente estudiado, a pesar que su mecanismo de acción es difícil de demostrar *in situ* debido a las dificultades técnicas en la toma de observaciones microscópicas. Afortunadamente, en la actualidad se tienen imágenes fluorescentes y técnicas de tinción diferencial (Verma y col., 2007). Más aún, las técnicas que involucran anticuerpos, como la prueba de ELISA para la detección de *Trichoderma* en compostas, pueden ayudar al entendimiento del proceso de micoparasitismo de éste tipo de microorganismos (Thornton y col., 2002).

Aun así, la mayoría de los estudios se han centrado en las interacciones microbianas y poco en la posible participación de la planta hospedera, aunque la evidencia del aumento en la respuesta del crecimiento de las plantas con la penetración de *T. harzianum* en el sistema radical ya está reportado (Yedidia y col., 1999). Sin embargo, la posibilidad de que *Trichoderma* interactúe con los tejidos de la raíz e induzca resistencia en la planta rara vez se ha planteado.

Debido a que la mayoría de los trabajos anteriores se han basado principalmente en observaciones al microscopio de luz, muy poca información se ha generado para responder dos cuestionamientos fundamentales: (1) ¿en qué medida los antagonistas en realidad atacan al fitopatógeno y se establecen dentro de la célula de la planta huésped? y (2) ¿cuál es el proceso de colonización y penetración?.

En un intento por responder estas preguntas, se analizó, mediante el uso de microscopia electrónica de barrido, la interacción entre *Trichoderma*, *Phytophthora capsici* y raíces de chile (*Capsicum annuum* L.). Los resultados se muestran en éste capítulo.



## MATERIALES Y MÉTODO

Con la finalidad de observar el fenómeno de colonización de raíces por el antagonista y de manera separada por el patógeno. Así mismo, para observar las interacciones entre antagonista y patógeno se germinaron semillas de chile tipo Húngaro en cajas con medio V8-A, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio y enjuagadas con agua destilada antes de ser incubadas a 30°C por 15 días.

Un juego de 16 plántulas fue sumergido por 30 minutos en una suspensión de  $5 \times 10^6$  esporas/ml de *T. harzianum*. Otro juego de 16 plantas fue sumergida en otra suspensión de *T. koningiopsis* de igual concentración y un tercer juego de 8 plántulas también fue sumergido en una suspensión de *P. capsici* concentrada a  $5 \times 10^3$  zoosporas/ml también por 30 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de humedad con toallas de papel estéril, luego se colocaron en cajas de petri con medio MS y se incubaron a 30°C.

Antes de la incubación, se tomaron dos plántulas que fueron inoculadas con *T. harzianum*, *T. koningiopsis* y *P. capsici* y se fijaron en una solución AFA que consta de 90 partes de alcohol al 50%, 5 partes de ácido acético glacial y 5 partes de formalina o formol diluido. El proceso de fijación con AFA se aplicó en plantas inoculadas que fueron obtenidas de cada juego a las dos, cuatro y ocho horas de incubación.

Las plántulas restantes que fueron tratadas con la suspensión de esporas de *T. koningiopsis* y *T. harzianum* después de ocho horas de incubación, fueron sumergidas en una nueva suspensión de zoosporas ( $5 \times 10^3$ /ml) por 30 minutos y posteriormente se fijaron en medio AFA a las 2, 4 y 8 h después de la inoculación con la suspensión de zoosporas.

### **Análisis con microscopía electrónica de las interacciones en raíz**

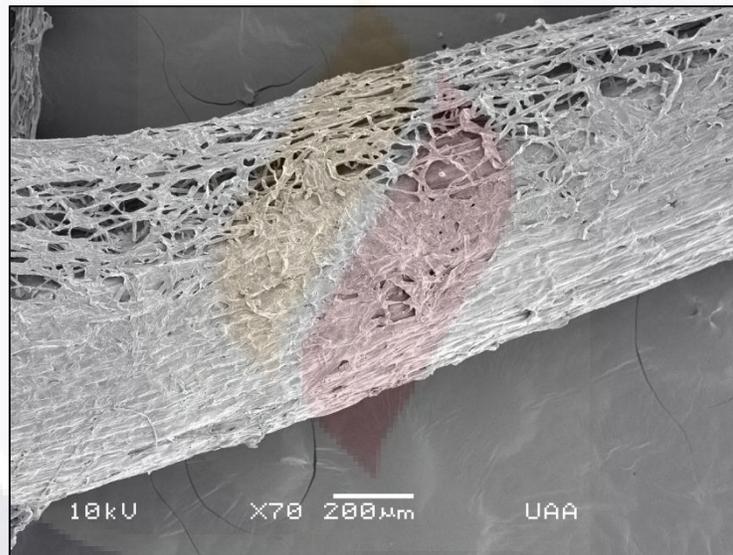
Todas las muestras fijadas en medio AFA se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos por un minuto. Después, cada muestra se deshidrató en una serie de soluciones graduales de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%); las últimas tres soluciones se trataron dos veces por 15 min en cada solución. Todas las muestras se secaron a punto crítico con CO en una secadora Sandri-2780A®, luego se colocaron sobre un portamuestras usando una cinta doble adhesiva de cobre o carbón y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora JFC-1100®.

Todas las muestras fueron tratadas, observadas y fotografiadas en el laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, con un microscopio electrónico de barrido JSM-35C®.

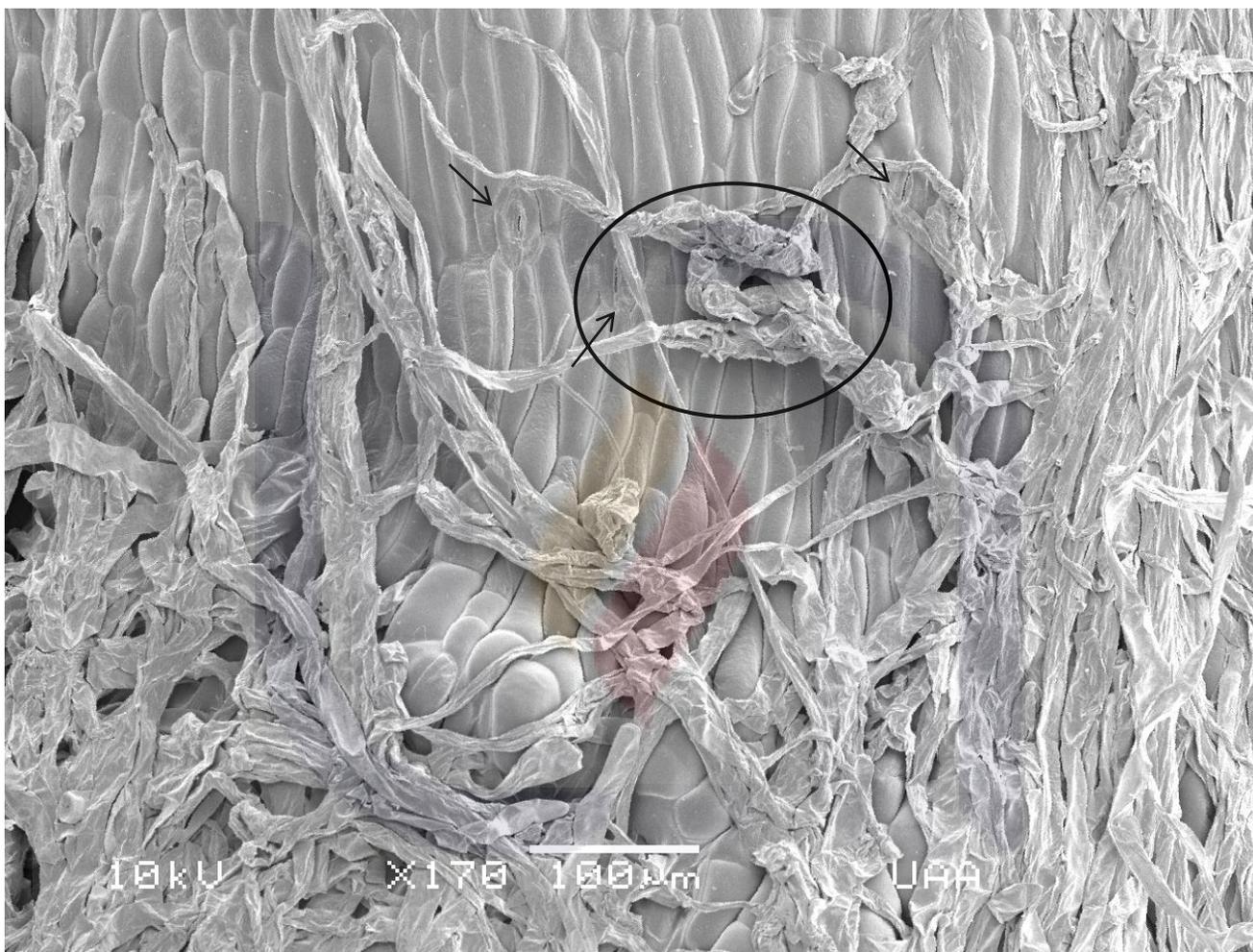
## RESULTADOS

### Interacción entre *P. capsici* y planta

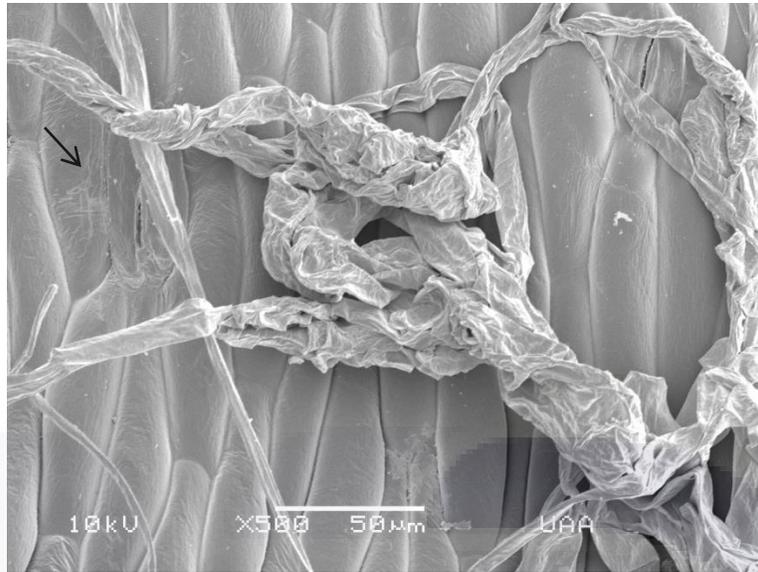
Con tan sólo 30 minutos que estuvieron sumergidas las plántulas y raíces en la suspensión de zoosporas, éstas germinaron y desarrollaron micelio abundante sobre la radícula de la plántula (Fig. 3.1). Se observó la penetración de hifas de *P. capsici* al tejido de la plántula. Cercano a la zona de penetración se encuentran tres lenticelas (Fig. 3.2), que podrían servir de entrada a la planta, sin embargo, la penetración a través de las lenticelas no logra apreciarse en las microfotografías (Fig. 3.3).



**Figura 3.1.** Microfotografía de una radícula de chile cubierta por micelio de *P. capsici*. La planta fue sumergida durante 30 minutos en una suspensión de  $5 \times 10^3$  zoosporas /ml.

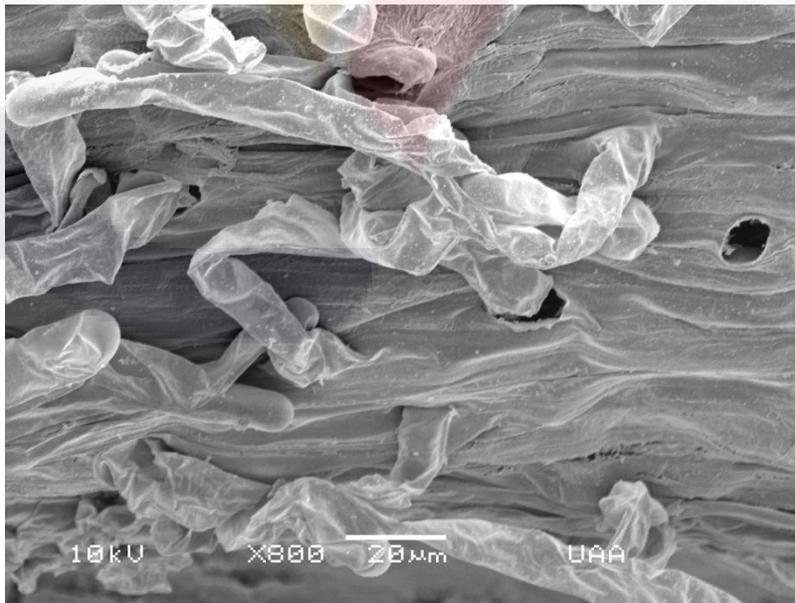


**Figura 3.2** Microfotografía de epidermis de la radícula de una plántula de chile. Las flechas señalan tres lenticelas y el círculo muestra la zona de penetración de las hifas de *P. capsici*.



**Figura 3.3** Microfotografía de la zona aumentada de penetración de las hifas de *P. capsici* al tejido de la plántula. La flecha señala una lenticela.

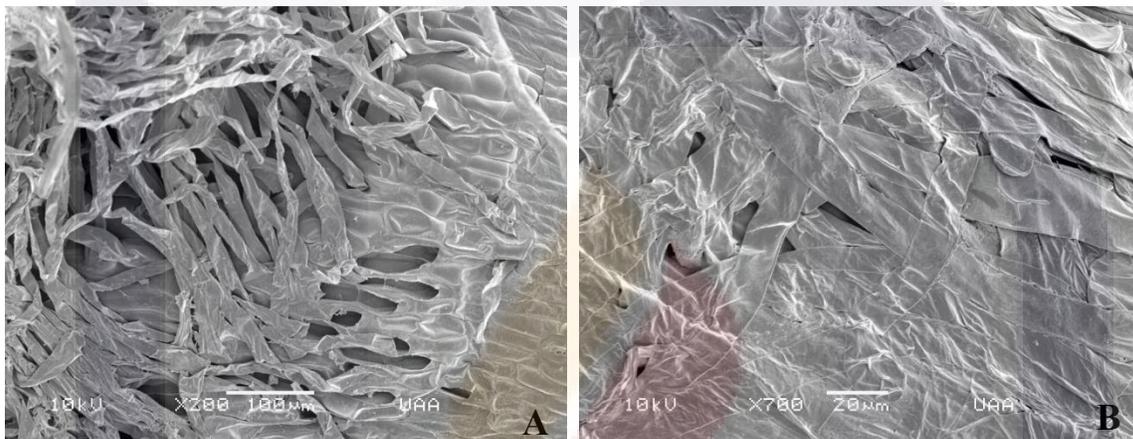
En las plántulas que fueron expuestas por dos horas a la solución de zoosporas se observaron diversos “orificios” por los cuales las hifas de *P. capsici* penetraron el tejido (Fig. 3.4), sin embargo, no se localizaron lenticelas cercanas como en el caso anterior.



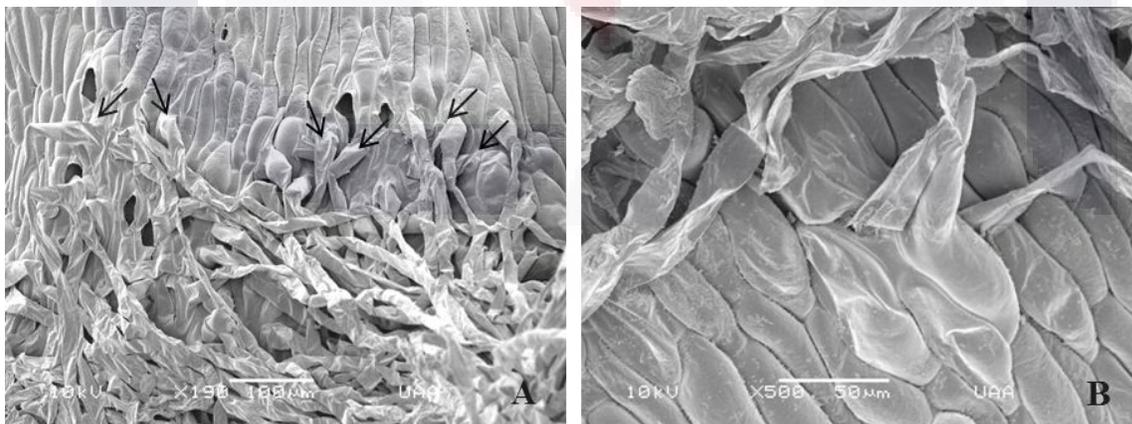
**Figura 3.4.** Orificios en el tejido de la radícula por donde penetran las hifas de *P. capsici*.

### Interacción *Trichoderma*- planta

El comportamiento de *T. koningiopsis* y *T. harzianum* fue similar al de *P. capsici*. A los 30 minutos de exposición a la solución de esporas, las dos especies de *Trichoderma* cubrieron con micelio la radícula de las plántulas (Fig. 3.5). La apreciación a un aumento de 430x, es como sí las hifas de *T. koningiopsis* y *T. harzianum* salieran de las células de la epidermis de la radícula (Fig. 3.6). Esta observación se realizó con las plántulas que tuvieron un tiempo de incubación de 8 h.

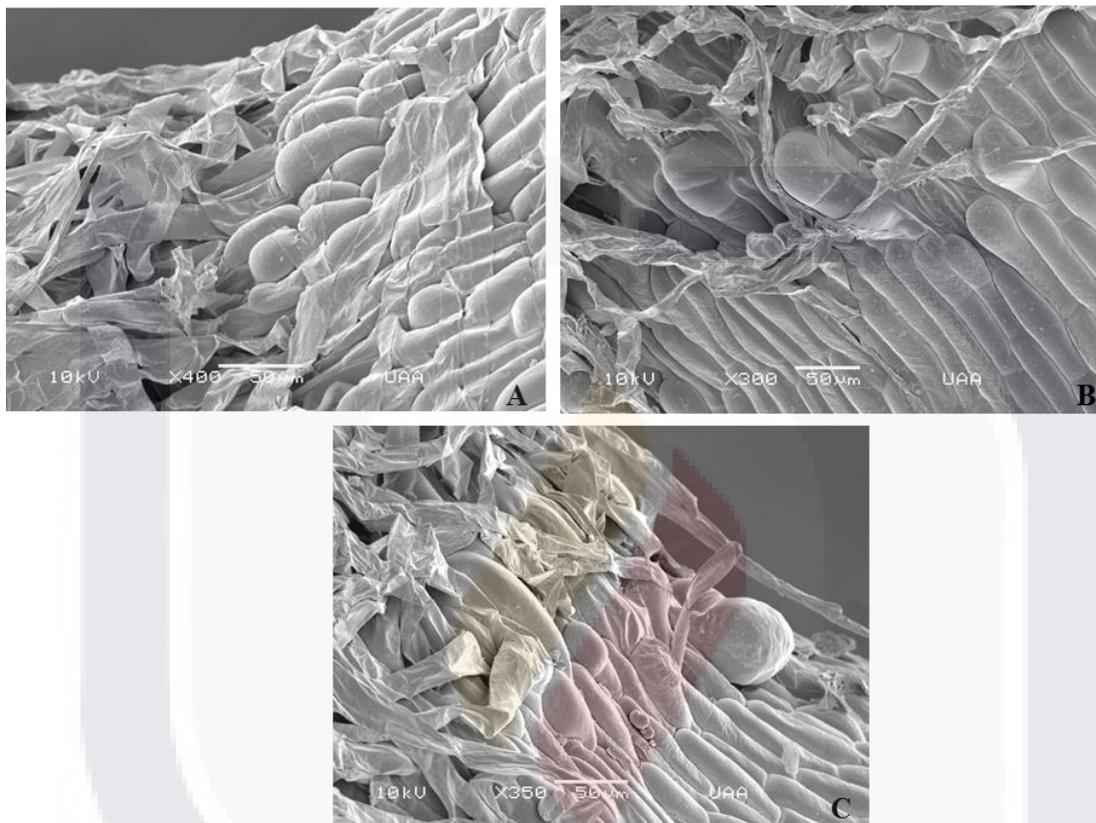


**Figura 3.5.** Micelio recubriendo la epidermis de la radícula. **A.** Micelio de *T. koningiopsis*. **B.** Micelio de *T. harzianum*. El aspecto aplastado es debido al tratamiento de las muestras para su observación al MEB.



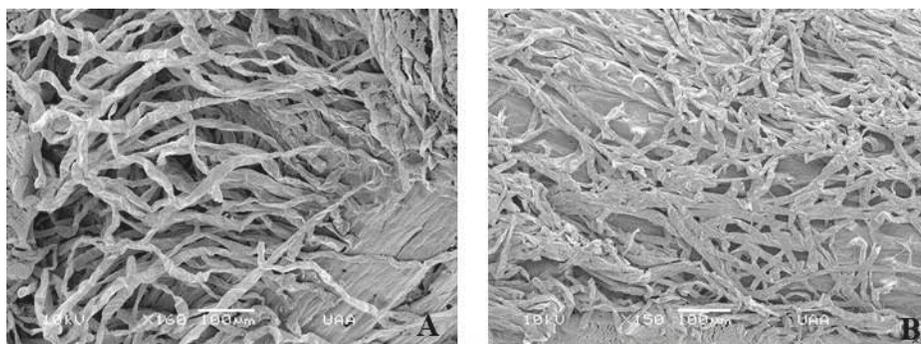
**Figura 3.6** **A.** Hifas de *T. harzianum*. Los huecos se deben al manejo de la muestra para la observación en el MEB. **B.** Hifas de *T. koningiopsis* saliendo aparentemente de células epidérmicas de la radícula.

Una característica a resaltar tanto en las plántulas inoculadas con *P. capsici* como con cualquiera de los antagonistas, es atrofia celular y cierto hinchamiento de las células, especialmente en la zona límite del crecimiento de los micelios (Fig. 3.7).

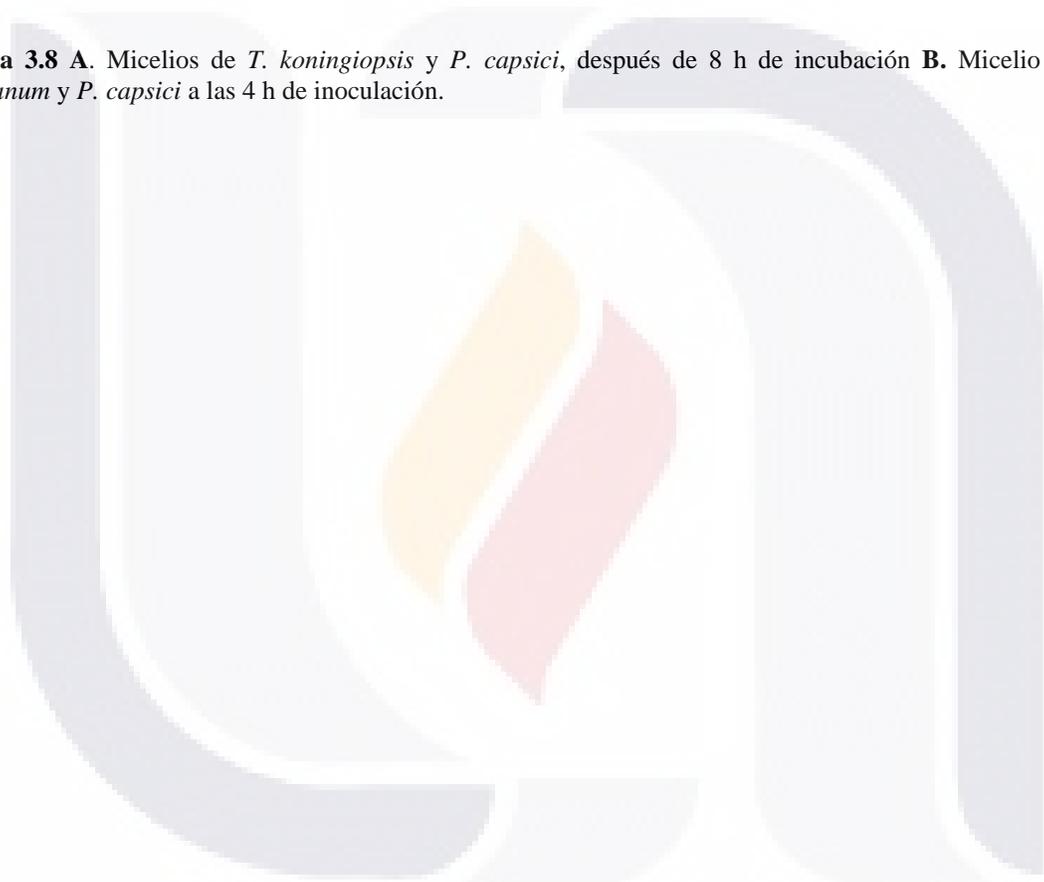


**Figura 3.7.** Atrofia celular en las plántulas inoculadas con *P. capsici* y *Trichoderma*. **A.** *P. capsici* a las 8 h de inoculación, **B.** *T. koningiopsis* a las 2 h de inoculación., **C.** *T. harzianum* a las 8 h de inoculación.

Las plántulas tratadas a las 8 h con los antagonistas y posteriormente sumergidas en la solución de zoosporas muestran el micelio del antagonista y del patógeno (Fig. 3.8). No se encontró algún tipo de interacción, como la penetración de hifas o enrollamiento.



**Figura 3.8** A. Micelios de *T. koningiopsis* y *P. capsici*, después de 8 h de incubación B. Micelio de *T. harzianum* y *P. capsici* a las 4 h de inoculación.



## DISCUSION

Debido a la complejidad en la relación que existe entre *Trichoderma*-planta-patógeno, existe poca información al respecto, sin embargo, se han logrado estudios sobre aspectos morfológicos y moleculares usando métodos como la proteómica o el sistema de genes reporteros (Vinale y col., 2008), pero los resultados obtenidos aún carecen de explicaciones amplias sobre los fenómenos que se desarrollan.

El uso de la microscopia de barrido en este trabajo permitió la observación a grandes aumentos de las interacciones y posibles modos de penetración a la raíz, tanto de antagonistas como del patógeno. El ciclo de la marchitez del chile causada por *P. capsici* ha sido ya bien documentada. Nuez y colaboradores, (2003) mencionan que después de un determinado tiempo, las zoosporas se enquistan y absorben sus flagelos e inmediatamente después emiten un tubo germinativo que penetra los tejidos de la planta por medio de apresorios.

A pesar de lo mencionado por la literatura, en ninguna de las muestras analizadas se observó alguna estructura similar a un apresorio, el cual se define como una estructura celular especializada que tienen algunos hongos fitopatógenos para penetrar las células de sus hospedantes y que consiste en un ensanchamiento en el ápice de la hifa (Deising y col., 2000). Aunque en la literatura se menciona que no es esencial la presencia de apresorios para el proceso de infección de una planta por parte de un hongo fitopatógeno (Deising; 2009).

Además en la literatura, se menciona que las infecciones en el cuello de la planta se deben a que las zoosporas del patógeno son llevadas por el agua e inician la infección por heridas o lenticelas (Santos, 2010). Por lo tanto, es probable que la cercanía de las lenticelas a la zona de penetración de *P. capsici* no fuese fortuita y sea uno de los accesos principales que tiene el fitopatógeno para entrar a la planta.

Por su parte, las interacciones de *Trichoderma* con la planta, específicamente el proceso de penetración en la raíz se ha estudiado en plantas de pepino y se observó que se restringe principalmente a la epidermis y a la parte más externa del cortex (Yedidia y col., 1999).

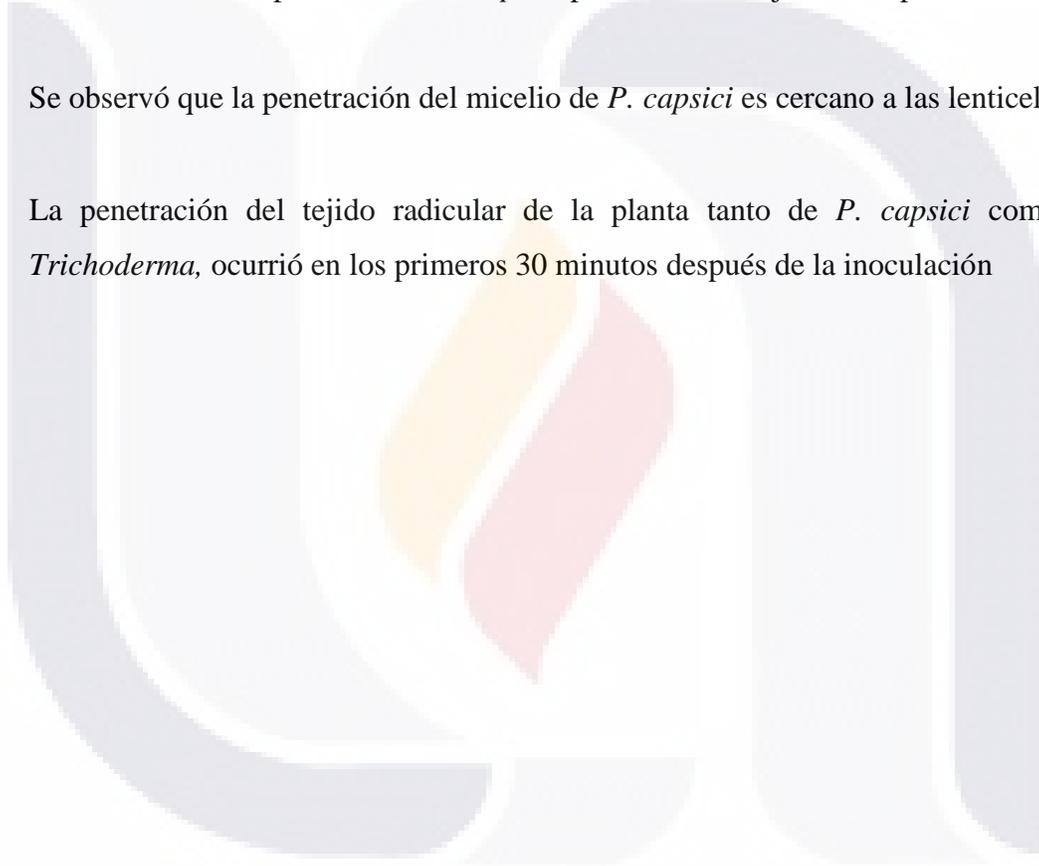
Además se menciona que después de las 48 h de inoculación hay una total colonización de la raíz, lo que de acuerdo a los resultados obtenidos en éste trabajo resultaría algo inverosímil ya que en tan sólo 30 min se observó una rápida colonización de la radícula de la plántula.

En el trabajo antes menciona se reporta que como respuesta a la penetración del antagonista a las células epidérmicas y corticales, las plantas tienden a tener un hinchamiento o forman protuberancia, lo que coincide totalmente con lo observado en el MEB, lo que podría ser interpretado como una respuesta o activación de un mecanismo de defensa de la planta frente al ataque de cualquier agente externo, ya que se observó tanto en la penetración de las hifas de los antagonistas como de *P. capsici*.

La interacción entre *Pythium oligandrum* y varios oomicetes y hongos fitopatógenos fue observada con microscopia convencional y electrónica, con el fin de evaluar la contribución del micoparasitismo y antibiosis en el proceso de antagonismo. Al respecto se registró en la zona de contacto entre todos los fitopatógenos y el oomicete, una alteración estructural de las células al momento de ocurrido el contacto (Benhamou y col., 1999). Debido al abundante micelio encontrado en las muestras, no se logró hacer una observación similar, sin embargo, la alteración celular fue algo persistente.

## CONCLUSIONES

- Se observó una modificación en el tejido radicular de la planta al entrar en contacto directo con *Trichoderma* y con *P. capsici*. Lo anterior se aprecia mediante cierto hinchamiento de las células epidérmicas.
- No se observaron apresorios de *P. capsici* penetrando el tejido de la planta.
- Se observó que la penetración del micelio de *P. capsici* es cercano a las lenticelas.
- La penetración del tejido radicular de la planta tanto de *P. capsici* como de *Trichoderma*, ocurrió en los primeros 30 minutos después de la inoculación



## BIBLIOGRAFÍA

Benhamou, N., Rey, P., Picard, K., y Tirilly, Y. (1999). Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction Between the Mycoparasite *Pythium oligandrum* and Soilborne Plant Pathogens. *Phytopathology*, 89(6), 506–517.

C.R. Thornton, D. Pitt, G.E. Wakley, N.J. Tablot. (2002). Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested com- posts, *Microbiology*. 148, 1263–1279.

Deising, H. B., Werner, S., y Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and infection*, 2(13), 1631-1641.

Deising, H. B. (2009). *Plant Relationships Volume 5 of The Mycota*. Springer Science y Business Media. Alemania. 398 p.

Nuez, F; Gil, R y Costa, J. (2003). *El Cultivo de los Pimientos, Chiles y Ajíes*. Ediciones Mundiprensa. España. 607p.

Punja , Z.K y Utkhede , R.S., (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*. 21 , 400–407.

Santos, J.P. (2010). Estrategia para el control de *Phytophthora capsici* Leo. y *Fusarium solani* Mart. en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría. Texcoco, Edo. de México.

Thornton, C.R., Pitt, D., Wakley, G.E. y Tablot, N.J. (2002). Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested com- posts. *Microbiology* .148, 1263–1279

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., y Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1–20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., y Lorito, M. (2008). *Trichoderma* – plant – pathogen interactions, *Soil Biology y Biochemistry*, 40, 1–10.

Yedidia, I., Benhamou, N., y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L. ) By the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1061–70.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Las cepas del patógeno aisladas de campo y utilizadas en el estudio fueron identificadas morfológica y molecularmente como *P. capsici*. La banda secuenciada de 595 pb mostró 96 % de identidad con *P. capsici*.
- *T. harzianum* causa la mayor inhibición micelial de *P. capsici*. A las 60 horas *T. harzianum* redujo en 14 % y 9 % el crecimiento micelial de RES y RDP1, respectivamente.
- *T. koningiopsis* causa la mayor inhibición en esporulación de *P. capsici*.
- *T. koningiopsis* redujo en 95 % la producción de esporangios de RDP1, *T. asperellum* en 88 % y *T. harzianum* en 78 %.
- *T. asperellum* fue la que más redujo la esporulación de RES (85 %).
- El análisis con MEB mostró que las hifas de *Trichoderma* envuelven y penetran (parasitan) las hifas de *P. capsici*.
- *T. harzianum* y *T. koningiopsis* mostraron las características más deseables para ser evaluadas como controladores biológicos de *P. capsici* bajo diferentes métodos de aplicación en plantas de chile (*C. annuum*)
- En conjunto las cepas de *Trichoderma* no mejoran la efectividad del control de *P. capsici*, en comparación con su efecto individual.
- La efectividad del control biológico no se incrementa, al incrementar el número de aplicaciones de los antagonistas.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- *T. koningiopsis* inoculado en semilla o planta, reduce significativamente el tamaño de las lesiones de necrosis causadas por *P. capsici*, lo mismo ocurre con una doble inoculación de *T. harzianum* (semilla + planta).
  - *T. koningiopsis* y *T. harzianum* protegen mejor contra *P. capsici* cuando son inoculadas por separado que combinadas.
  - La incorporación de *T. harzianum* o *T. koningiopsis*, ya sea por inoculación en semilla, o directamente en planta no confiere una protección total contra *P. capsici*.
  - Ninguno de los tratamientos evaluados mejoró de manera significativa el vigor de las plantas. De hecho, se registró cierta inhibición en el desarrollo de las plantas tratadas con *T. harzianum*.
  - Se observó una modificación en el tejido radicular de la planta al entrar en contacto directo con *Trichoderma* y con *P. capsici*. Lo anterior se aprecia mediante cierto hinchamiento de las células epidérmicas.
  - No se observaron apresorios de *P. capsici* penetrando el tejido de la planta.
  - Se observó que la penetración del micelio de *P. capsici* es cercano a las lenticelas.
  - La penetración del tejido radicular de la planta tanto de *P. capsici* como de *Trichoderma*, ocurrió en los primeros 30 minutos después de la inoculación.

