

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

“CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) CAUSADA POR *Phytophthora capsici* MEDIANTE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. DE SUELOS PRODUCTORES”

ALFONSO DANIEL VICTORIA ARELLANO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada “Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici* mediante cepas nativas de *Trichoderma* spp. de suelos productores” realizada por el alumno: Alfonso Daniel Victoria Arellano, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. REMIGIO A. GUZMÁN PLAZOLA

ASESORA



DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESOR



DR. OMAR ROMERO ARENAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero 2015.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos económicos otorgados para la realización de la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de Maestría en el programa de Fitosanidad-Fitopatología.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por los recursos otorgados para el proceso de titulación.

A mi consejero y director de tesis: Dr. Remigio A. Guzmán Plazola por contribuir formidablemente a mi formación profesional.

A los integrantes del consejo particular de esta investigación: Dr. Remigio A. Guzmán Plazola, Dra. Emma Zavaleta Mejía y Dr. Omar Romero Arenas, por su valiosa contribución, sabiduría, apoyo incondicional y el tiempo brindado para concluir satisfactoriamente la presente investigación.

Al Comité Académico de Fitopatología por el apoyo brindado para la realización y culminación de la investigación.

Al personal docente y administrativo que directa e indirectamente apoyaron mis estudios de postgrado.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi hermosa, amada e indulgente madre que siempre me ha apoyado de múltiples formas, me ha guiado e inculcado buenos valores y ha sido la motivadora de todos mis logros. Con todo el amor que un hijo puede dar, te refrendo mi cariño y te agradezco por ser la madre más linda del mundo; es un honor pertenecer a la gran familia que has formado. Te amo.

A dios, por ayudarme simbólicamente en todo momento, cuidar de mí y guiarme por el camino que ha permitido alcanzar mis sueños.

A mi abuelita, quien me cuidó, educó y asumió responsabilidades de mi infancia en ausencia de mi familia.

A toda mi familia, que incondicionalmente ha estado en buenos y malos momentos de mi vida, por ser un apoyo extra y por extenderme su fraternidad.

A mi novia, que me apoyado, aconsejado, comprendido y porque a pesar del corto tiempo he pasado los mejores momentos de mi vida. Te amo.

Al M.C. Tolín y la Sra. Lupita, por su apoyo memorable, hospitalidad e inclusión a su hogar y su hermosa familia.

A mis amigos y compañeros, por ser parte de mis emociones, distracciones y por brindarme su invaluable amistad.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. JUSTIFICACIÓN.....	16
III. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.1.1 Objetivos específicos.....	18
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. REVISIÓN DE LITERATURA	
5.1 Fundamentos del control biológico.....	20
5.2 Antecedentes del control biológico.....	21
5.3 Biología de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
5.4 Identificación.....	25
5.5 Clasificación.....	26
5.6 Mecanismos de acción.....	26
5.6.1 Antibiosis.....	27
5.6.2 Micoparasitismo.....	27
5.6.3 Degradación de la pared celular.....	27
5.7 <i>Phytophthora capsici</i>	28
5.7.1 Crecimiento miceliar.....	29
5.7.2 Reproducción.....	30
5.7.2.1 Reproducción asexual.....	30
5.7.2.2 Reproducción sexual.....	30
5.7.3 Hospedantes de <i>Phytophthora capsici</i>	31
5.8 Progreso de la enfermedad.....	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 Sitio de trabajo y zona de procedencia de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Phytophthora capsici</i>	33
6.2 Cepas estudiadas.....	34
6.3 Muestreo del suelo.....	34
6.4 Aislamiento e identificación morfológica de <i>P. capsici</i>	35
6.5 Aislamiento e identificación morfológica de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	35
6.6 Tasa de desarrollo y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp.	35
6.7 Antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora</i> <i>capsici</i>	36
6.8 Pruebas de patogenicidad.....	38
6.9 Influencia de filtrados de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el desarrollo de <i>Phytophthora capsici</i>	39

6.10 Fase de invernadero.....	40
6.10.1 Colecta y extracción de la semilla de <i>Capsicum annuum</i> L....	41
6.10.2 Fertirriego.....	41
6.10.3 Preparación de las plántulas de <i>Capsicum annuum</i> L.....	41
6.11 Etapa I. Vivero	
6.11.1 Preparación de las plántulas de <i>Capsicum annuum</i> L.....	42
6.11.2 Inoculación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	43
6.11.3 Poblaciones de <i>Trichoderma</i> spp. en el sustrato.....	43
6.11.4 Peso seco de raíz y parte aérea.....	44
6.12 Etapa II. Efecto de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en la marchitez causada por <i>Phytophthora capsici</i>	
6.12.1 Preparación del inóculo e inoculación con <i>Phytophthora capsici</i>	44
6.12.2 Diseño experimental y diseño de tratamientos.....	44
6.12.3 Variables evaluadas	
6.12.3.1 Severidad.....	45
6.12.3.2 Número acumulado de plantas muertas.....	45
6.12.3.3 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.....	46
6.12.3.4 Presencia de <i>Phytophthora capsici</i>	46
6.12.3.5 Presencia de <i>Trichoderma</i> spp.	47
6.12.3.6 Unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>Trichoderma</i> spp.	47
6.12.3.7 Peso seco de raíz y parte aérea.....	47
6.12.3.8 Área foliar de <i>Capsicum annuum</i>	48
6.12.4 Análisis estadístico.....	48
VII. RESULTADOS	
7.1 Aislamiento e identificación morfológica de <i>Phytophthora capsici</i>	49
7.2 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	49
7.3 Tasa de desarrollo.....	49
7.4 Esporulación.....	51
7.5 Antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Phytophthora capsici</i>	54
7.6 Patogenicidad de diferentes cepas de <i>Phytophthora capsici</i> en chile serrano cv. Tetela de Ocampo.	59
7.7 influencia de filtrados de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el desarrollo de <i>Phytophthora capsici</i>	61
7.8 Poblaciones de <i>Trichoderma</i> spp. en el sustrato de plantas en la fase de vivero.	64
7.9 Peso seco de raíz.....	68
7.10 Peso seco de parte aérea.....	70
7.11 Experimentos en suelo, con plantas inoculadas con <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Trichoderma</i> spp.	
7.11.1 Área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS).....	74

7.11.2 Número acumulado de plantas muertas.....	78
7.11.3 Presencia de <i>Phytophthora capsici</i> en las raíces.....	82
7.11.4 Presencia de <i>Trichoderma</i> spp. en las raíces.....	85
7.11.5 Unidades formadoras de colonias de <i>Trichoderma</i> spp.....	88
7.11.6 Peso seco de raíz y de parte aérea.....	90
7.11.6.1 Peso seco de raíz.....	90
7.11.6.2 Peso seco de la parte aérea.....	95
7.11.7 Relación raíz/parte aérea.....	100
7.12 Área foliar.....	104
VIII. DISCUSIÓN.....	106
XIX. CONCLUSIÓN.....	112
X. LITERATURA CITADA.....	113
XI. ANEXOS.....	123

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Clasificación de <i>Trichoderma</i> spp. según Alexopoulos <i>et al.</i> , 1996.....	26
Cuadro 2. Escala de evaluación del antagonismo ejercido por las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. Contra <i>Phytophthora capsici</i> (Bell <i>et al.</i> , 1982).....	37
Cuadro 3. Solución nutritiva utilizada para fertilizar el sustrato en los experimentos en invernadero, formulada con base en Steiner (1984).....	42
Cuadro 4. Día del primer contacto entre hifas y tipo de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>P. capsici</i> . en medio de cultivo de Extracto de Malta Agar (EMA) del bioensayo 1 y bioensayo 2	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Fig. 1 Mapa de la división política de la región norte del estado de Puebla. Los límites marcados con la línea blanca y relleno con morado ubican al municipio de Tetela de Ocampo	33
Fig. 2. Tasa de desarrollo de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en Extracto de Malta Agar, incubadas a 26 °C, bioensayo 1. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).....	50
Fig. 3 Tasa de desarrollo de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en Extracto de Malta Agar, incubadas a 26 °C, bioensayo 2. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).....	51
Fig. 4 Esporulación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp., estimada 96 h después de la siembra en Extracto de Malta Agar. (a) Bioensayo 1. (b) Bioensayo 2. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).....	53
Fig. 5. Relación entre el logaritmo natural del número de esporas de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y la tasa de desarrollo del micelio. ○=TMIX, Δ=T4(3), ▲= TJIM I, ●= A2S2P3, ◇= S3A4, □=TP1S1, ■=TJIM II, ◆=S3A3, ×= T5(2).....	54

Fig. 6. Confrontaciones antagónicas de cepas de *Trichoderma* spp. con cepas de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo Extracto de Malta Agar, a 10 días de la siembra de *Trichoderma* spp. (Bioensayo 2). Columna 1, cepas de *Trichoderma* spp contra PC-A columna 2, contra PC-C y columna 3 contra PC-C. (t)= testigo de *P. capsici* sin *Trichoderma* spp. 57

Fig. 7. Porcentaje de inhibición ejercido por cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora capsici* en medio de cultivo extracto de malta-agar a 10 días de la siembra del patógeno. a) y b) cepa PC-A; c) y d) cepa PC-B; e) y f) cepa PC-C de *P. capsici*. Las gráficas a), c) y e) corresponden al Bioensayo 1; b), d) y f) corresponden al Bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$). 60

Fig. 8. Pruebas de patogenicidad en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Puebla; a 12 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici* (PC-A) con diferentes niveles de zoosporas. 61

Fig. 9. Halo de inhibición de *Phytophthora capsici* (PC-A) ejercido por filtrados de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo de extracto de malta-agar. (a) y (b): Filtrados obtenidos en sustrato a base Trigo (a y b), maíz (b y c) y arroz (d y e). Las gráficas a, c y e) corresponden al Bioensayo 1; b, días y f corresponden al Bioensayo 2. Las líneas verticales en cada barra indican el error estándar. 65

Fig. 10. Halos de inhibición en colonia de *Phytophthora capsici* de 8 días de edad, ejercido por filtrado de *Trichoderma* spp. (Cepa T-5(2)). ML= medio líquido a base de trigo. Los discos de papel estéril fueron sumergidos en el filtrado sin diluir y se colocaron a la periferia de la colonia al sexto día de crecimiento del oomiceto (bioensayo 1). 66

Fig. 11. Peso seco de la raíz de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 1. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$). 71

Fig. 12. Peso seco de la raíz de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 2. a)= 15 días después de la primera

inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)..... 72

Fig. 13. Peso seco de la parte aérea de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 2. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)..... 76

Fig. 14. Peso seco de la parte aérea de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 2. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)..... 77

Fig. 15. Biomasa de la raíz y de la parte aérea de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo cultivadas en sustrato de Peat moss-perlita expandida (75/25 v:v), a los 15 días después de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y 50 días después de la siembra del chile..... 78

Fig. 16. Severidad de la marchitez (Moran *et al.*,2010) de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas 15, días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 1. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad..... 79

Fig. 17. Severidad de la marchitez (Moran *et al.*,2010) de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas, 15 días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 2. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad..... 80

Fig. 18. Área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS) de la marchitez de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., trasplantadas a suelo natural de la misma localidad e inoculadas con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici*, 15 días después del trasplante, en plantas pretratadas con, o sin, alguna cepa de *Trichoderma* spp. a) bioensayo 1. b) bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.5$). Las cepas de *Trichoderma* spp con una R al final indican que fueron reinoculadas (1×10^6 esporas) al tercer día después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp. en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v)..... 81

Fig. 19. Número acumulado de plantas muertas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas, 15 días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 1. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad..... 83

Fig. 20. Número acumulado de plantas muertas en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas, 15 días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 2. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad..... 84

Fig. 21. ABCPM= Área bajo la curva del número de plantas muertas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo inoculadas en vivero con diferentes cepas de

Trichoderma spp (4 x 10⁶ esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican una reinoculación en suelo (1 x 10⁶, esporas) tres días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6 x 10⁵ zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp., en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa a el promedio de 2 repeticiones (1 por cada bioensayo) a los 45 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 48 días después del trasplante. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).....

85

Fig. 22. Número de raíces de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue con presencia de *Trichoderma* spp a 18 días después del trasplante en suelo de la misma localidad. Cada barra es el promedio de cuatro repeticiones, cada una con diez segmentos de raíz (0.5 cm) por caja de Petri cultivados en Extracto de Malta Agar enriquecido con ácido láctico (1 mL/ L) e incubadas a 26 °C, a 6 días de la siembra. Las cepas con la letra “R” indican reinoculación con *Trichoderma* (1 x 10⁶ esporas, 3 días después del trasplante). En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6 x 10⁵ zoosporas de *Phytophthora capsici*. a) bioensayo 1, b) bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.5$). TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v).....

87

Fig. 23. Unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* spp. / g de suelo en plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo. A excepción de los tratamiento testigo todas las plantas fueron inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4 x 10⁶ esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican una reinoculación adicional en suelo (1 x 10⁶, esporas) tres días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6 x 10⁵ zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa a el promedio de 4 repeticiones a los 45 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 48 días después del trasplante. a)

bioensayo 1; b) bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)..... 89

Fig. 24. Peso seco de la raíz de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 1, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a) 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)..... 93

Fig. 25. Peso seco de la raíz de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 2, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a) 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)..... 94

Fig. 26. Peso seco de parte aérea de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 1, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a)= 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la

reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

98

Fig. 27. Peso seco de parte aérea de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 2, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a) 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

99

Fig. 28. Relación peso seco raíz / tallo en plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del experimento 1, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a) 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

102

Fig. 29. Relación peso seco raíz / tallo en plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 2, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a) 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp., en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).....

103

Fig. 30. Área foliar de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación 3 días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican una reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas) 3 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa a el promedio de 12 repeticiones a los 45 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 48 días después del trasplante. a) experimento 1; b) experimento 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).....

105

CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annuum*) CAUSADA
POR *Phytophthora capsici* MEDIANTE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. DE SUELOS
PRODUCTORES

Alfonso Daniel Victoria Arellano, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

RESUMEN

La principal enfermedad que ataca al cultivo de chile *Capsicum annuum* L. es la marchitez, causada por *Phytophthora capsici* L., a la cual se tribuyen pérdidas hasta de 100%. En Tetela de Ocampo se ha presentado de forma recurrente y para su control se ha optado por el uso de fungicidas, lo que conlleva a una menor rentabilidad y a estimular la resistencia del patógeno. Una alternativa para su control es la búsqueda de antagonistas nativos con alta capacidad de biocontrol. *Trichoderma* spp. ha sido el más utilizado con este fin; sin embargo un factor que puede limitar su capacidad contra el patógeno es la posible dificultad de establecerse en suelos diferentes en donde fue aislado. Con el objetivo de evaluar la efectividad de cepas nativas de *Trichoderma* spp. asociadas a la rizósfera del cultivo de chile y de suelos no cultivados; se evaluaron nueve cepas de dichos antagonistas contra de tres cepas *P. capsici* (nativas). En condiciones *in vitro* se evaluó la tasa de desarrollo (TD), esporulación, tipo de antagonismo y porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp. En vivero se evaluó el peso seco de raíz y parte aérea (PsR y PsA) y las unidades formadoras de colonias (UFC) del sustrato a través del tiempo. En invernadero se determinó la severidad, el área bajo la curva del progreso de la severidad (ABPS), N° de plantas muertas, PsR, PsA, UFC y área foliar. La mayor TD y esporulación se detectó en S3A3 y S3A4. Se detectó homogeneidad (*in vitro*) de todos los antagonistas en el control de *P. capsici*. En vivero, el mayor peso seco fue obtenido con S3A3, aunque el mayor número de UFC se observó con T4(3), T-5(2) y TP1S1. Cuando se inoculó *P. capsici* en invernadero, S3A3 y TP1S1 presentaron menor ABPS y por ende menor mortalidad y mayor área foliar. S3A3 promovió mayor peso seco, aunque el mayor número de UFC en suelo se obtuvo con T-5(2), T4(3) y TP1S1. Las cepas nativas S3A3 y TP1S1 promovieron mayor crecimiento y tienen mayor potencial de controlar la marchitez en suelos y plantas de chile de Tetela de Ocampo.

Palabras clave: Antagonistas nativos, severidad, control de marchitez.

BIOLOGICAL CONTROL WILT OF CHILE (*Capsicum annuum*) CAUSED BY *Phytophthora capsici* BY STRAINS NATIVE OF *Trichoderma* spp. SOIL PRODUCERS

Alfonso Daniel Victoria Arellano, M. C.

Colegio de postgraduados, 2015.

ABSTRACT

The main disease affecting pepper crops *Capsicum annuum* L. is caused by *Phytophthora capsici* L., to which losses can be as high as 100%. In Tetela de Ocampo it has appeared recurrently and growers have chosen the use of fungicides for disease control. This option has turned the crop less profitable and may induce pathogen resistance. An alternative for disease control is the use of native antagonists with high biocontrol capacity. *Trichoderma* spp. has been the most widely used organism for this purpose; however, a factor that may limit its ability against the pathogen is the difficulty settling in soils different to where it was isolated. In order to evaluate the effectiveness of native strains of *Trichoderma* spp. against *P. capsici*, strains associated to the rhizosphere of pepper crops and non-native strains were evaluated (nine strains of *Trichoderma* spp. and three *P. capsici*). Under *in vitro* conditions the rate of development (TD), sporulation, type of antagonism and percent of inhibition of *Trichoderma* spp were assessed. In nursery, the dry weight of roots and aerial parts (PSR and PsA) and colony forming units (CFU) in substrate over time was evaluated. The area under the disease progress curve, number of dead plants, PSR, PsA, UFC and leaf area was determined in soil grown plants. Best TD and sporulation was detected in S3A3 and S3A4; however all antagonists behave similarly on *P. capsici*. In the nursery, the largest dry weight was obtained with S3A3, S3A4 and A2S2P3, although the greatest UFC was observed with T4 (3), T-5 (2) and TP1S1. In the greenhouse the S3A3 and TP1S1 native strains had lower ABPS and thus lower mortality and greater leaf area. S3A3 promoted greater dry weight, although the largest number of CFU in soil was obtained with T-5 (2), T4 (3) and TP1S1. Native strains TP1S1 and S3A3 promoted greater growth and have greater potential for wilt control in soils from Tetela de Ocampo than the rest of strains.

Keywords: Native antagonists, severity, wilt control.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es afectado por diversas enfermedades causadas por microorganismos que reducen el rendimiento y la calidad de sus frutos. Para su control se aplican diversas estrategias basadas principalmente en el uso de plaguicidas sintéticos. Entre los principales fitopatógenos habitantes del suelo que atacan al chile están los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Fusarium* spp. y el oomiceto *Phytophthora capsici* (Leonian) (González-Chavira *et al.*,2002; Vásquez-López *et al.*,2002; Velásquez-Valle *et al.*,2001). Esta última especie es considerada la causante de la marchitez del chile y la más devastadora; es capaz de infectar prácticamente cualquier parte subterránea o aérea de las plantas de chile (Ristaino y Johnston, 1999). En México puede ocasionar pérdidas entre el 10-100% (Avelar, 1989) e incluso causar grandes pérdidas a otras hortalizas cultivadas en el mundo (Hausbeck y Lamour, 2004; Lee *et al.*,2001; Tamietti y Valentino, 2001). Se ha tratado de controlar la marchitez mediante diversas alternativas culturales, genéticas, químicas y más recientemente, empleando agentes biológicos (Avelar, 1989; Goldberg, 1998; Sid *et al.*,2000). El control biológico mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta no química para la protección de los cultivos contra fitopatógenos (Ait-Lahsen *et al.*,2001). Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades debido a su ubicuidad y a su rápido crecimiento, porque no atacan a plantas superiores y a la facilidad con que pueden ser aisladas y cultivadas, en un gran número de sustratos (Papavizas *et al.*, 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: Competencia directa por el espacio o por los nutrientes (Elad & Baker 1985, Elad & Chet 1987, Chet & Ibar 1994, Belanger *et al.*, 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet *et al.*,1997, Sid Ahmed *et al.*,2000, Sid Ahmed *et al.*,2003) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia *et al.*,1999, Ezziyyani *et al.*,2003). Sin embargo este efecto se puede ver limitado, principalmente porque los microorganismos usados son específicos. Cuando las especies son introducidas la homeostasis natural del suelo limita el establecimiento del antagonista o limita su función antagónica (Gindrat, 1979; Raupach y Kloepper, 1998). Por otra parte, en la región de Tetela de Ocampo, Puebla, el oomiceto *Phytophthora capsici* recientemente ha causado alta incidencia de marchitez en todos los ciclos de cultivo, afectando el rendimiento y la calidad de la producción

de Chile serrano. Con base en estos antecedentes, en este proyecto se propone evaluar el potencial antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. de esa región en contra de *Phytophthora capsici* de manera *in vitro* e invernadero.

II. JUSTIFICACIÓN

La producción de Chile (*Capsicum annuum* L.) en México es seriamente afectada por diversos organismos que causan enfermedades y a la vez cuantiosas pérdidas de rendimiento y calidad de la producción (Guigón López y González González, 2001). Según Rico *et al.* (2004), el chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos con mayor tradición en Mesoamérica, ya que constituye un elemento básico en de la dieta de la población. De acuerdo a datos del sistema de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), para el 2011 el promedio nacional de rendimiento en superficies de riego y de temporal fue de 14 ton/ha, donde el cultivo de chile verde representó un valor de \$12,099,213. Sin embargo, de las 152,542 ha que se sembraron sólo 144,390 ha se pudieron cosechar. Esto se debe a diferentes causas, entre las cuales sin duda en gran parte se perdieron por el ataque de agentes fitopatógenos, entre ellos *Phytophthora capsici*, uno de los patógenos considerados más importantes, porque ocasiona pérdidas de rendimiento entre 60-100%, al causar la enfermedad conocida como marchitez de chile, junto con un complejo fúngico en el que recurrentemente se aislan *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. Como consecuencia, algunas de las regiones productoras importantes han disminuido la superficie de siembra o los campos de cultivos se han desplazado a nuevas áreas (Avelar y Marban, 1989). En la sierra norte del estado de Puebla, el municipio de Tetela de Ocampo actualmente es considerado por los compradores o intermediarios como una zona productora importante de producción de chile serrano a nivel estatal. El municipio se caracteriza por producir frutos de buena calidad en comparación con otras zonas. Pero de acuerdo a la opinión de los productores locales, uno de los principales problemas de sus cultivos es la marchitez del chile, ya que dicha enfermedad es devastadora y puede acabar completamente con el cultivo. Además, los agricultores señalan que en cada ciclo de cultivo se desplazan a nuevas áreas donde no se ha sembrado para mitigar el problema y en caso contrario se utilizan dosis de pesticidas más altas y cada vez con mayor frecuencia.

En general, el método más utilizado para contrarrestar las pérdidas de cultivos agrícolas por organismos o plagas causantes de enfermedades es el uso de pesticidas. Estas son sustancias químicas que producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, tales como la generación de organismos resistentes, persistencia ambiental de residuos tóxicos,

contaminación de suelos y recursos hídricos, lo cual altera el equilibrio ecológico (Asiego J, 2006).

Conociendo los efectos adversos que causan los agroquímicos, actualmente las tendencias se inclinan cada vez más a buscar la disminución tanto de costos en la producción como de la presencia de residuos de pesticidas en los productos agrícolas y en el medio ambiente, situando así al control biológico como una alternativa dentro del manejo de plagas. (Tanada y Kaya, 2001).

El uso de *Trichoderma* spp. para el control de enfermedades fungosas es actualmente una práctica generalizada en la agricultura. Su empleo se justifica por las relaciones antagonistas que establece con los hongos fitopatógenos que viven en el suelo, además de la influencia que ejerce sobre el crecimiento vegetativo de algunas plantas de importancia económica (Windham *et al.*, 1986, Andreú *et al.*, 1992). Cabe señalar que muchas veces estos métodos pueden fracasar debido a que se usan cepas de otras localidades; con esto se corre el riesgo de que no se adapten a las nuevas condiciones a que se someten. La clave para el éxito en casi todos los proyectos de control biológico es el descubrimiento de enemigos naturales que produzcan altos niveles de parasitismo o depredación en los lugares nativos de la plaga o enfermedad siendo una de las principales alternativas a la utilización de productos químicos (Ezziyani, 2005).

Con base en lo anterior es necesario desarrollar alternativas para esta zona, que además de que permitan mitigar el impacto ambiental, aseguren la producción en el cultivo de chile. Cabe señalar que no se tiene ningún estudio de esta índole en la región de Tetela de Ocampo; por tanto es pertinente generar conocimiento a partir de esta problemática; por tanto en esta investigación se evaluó el efecto antagónico que tienen diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. *in vitro* y en invernadero asociadas al cultivo de chile y cepas que no estén asociadas, para encontrar cepas altamente efectivas contra *P. capsici* mediante una estrategia inundativa.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de chile serrano de Tetela de Ocampo, Puebla.

3.1.1 Objetivos específicos

Evaluar *in vitro* la capacidad antagonista y mecanismos de control de *Phytophthora capsici* de cepas y especies de *Trichoderma* spp. y comparar la efectividad de cepas aisladas de la rizósfera de plantas de *Capsicum annuum*, cultivadas en Tetela de Ocampo, respecto a cepas nativas de suelos no cultivados con chile.

Evaluar en plantas de chile serrano, cultivadas en suelo de Tetela de Ocampo, la efectividad de cepas de *Trichoderma* spp seleccionadas por sus cualidades antagonistas en condiciones de laboratorio.

Analizar la capacidad de sobrevivencia y persistencia en el suelo de cepas de *Trichoderma* preseleccionadas por su efectividad en el control biológico de *Phytophthora capsici* en cultivos *in vitro*.

IV. HIPÓTESIS:

- La marchitez del chile serrano en suelos de Tetela de Ocampo, Puebla, puede ser eficientemente controlada mediante la aplicación inundativa de *Trichoderma* spp.
- Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de campos de cultivo de *Capsicum annuum* en Tetela de Ocampo, Puebla, tienen mayor efectividad en el control biológico de *Phytophthora capsici* que las cepas nativas de suelos no cultivados con esta especie de planta.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Fundamentos del control biológico

El control biológico es una práctica agrícola en la cual se aprovechan las características de un organismo en contra de otro que le servirá de alimento y las condiciones naturales de control. El control puede darse entre cepas (individuos de un mismo género y especie con algunas modificaciones genéticas) o entre especies (individuos de diferentes especies). Los organismos más comúnmente utilizados en esta práctica son hongos, bacterias, insectos, virus y parasitoides (Martínez, 2001).

Entre los microorganismos de naturaleza fúngica de más amplio uso contra especies de invertebrados plaga en la agricultura están los hifomicetos, donde sobresalen *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* (anteriormente *Verticillium lecanii*), *Pochonia chlamidosporia* (*V. chlamidosporium*), *Paecilomyces* spp. con *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*. Para el control de enfermedades fúngicas y nematodos se utiliza *Trichoderma* spp., donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii* (Claro, 2006).

Según Oyarzun (2004) citado por Falconí et al. (2007) en las últimas dos décadas se han realizado, a nivel mundial y local, esfuerzos para determinar la potencialidad de agentes de control biológico (ACB), recopilando información técnica sobre su ecología, biología e interacciones con los patógenos. Los factores que forman parte de un enfoque de control biológico son el hospedero, patógeno y el ambiente. La población de hospederos que se encuentra en el ambiente natural forma parte siempre de la estrategia control biológico ya que esta se encarga de mantener el balance natural del suelo, suprimiendo a los patógenos la mayoría de veces (Baker y Cook, 1982).

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, en conjunto con la capacidad de

multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Fernández 2001).

De acuerdo con Martínez (2001), es de suma importancia saber seleccionar al agente de biocontrol. Varios factores son de importancia al momento de hacer esta selección:

1. Habilidad para la búsqueda. Es primordial para un buen agente biológico, pues de ella depende el que sea o no capaz de encontrar la especie que espera controlar.
2. Elevado grado de reproducción para proliferar con mayor rapidez que la plaga.
3. Capacidad para operar efectivamente contra la plaga, es decir, sin interferencia con miembros de su misma especie.
4. Debe actuar con plenas capacidades bajo las condiciones ambientales a las cuales se libera. Baja sensibilidad a la competencia con otros enemigos de la plaga que puedan ser liberados o que se encuentren presentes naturalmente.

5.2 Antecedentes del control biológico

El control biológico consiste en el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo esta menos abundante y por tanto menos dañina a los cultivos. (Pérez Consuegra, 2004).

En México son escasas las investigaciones que se han realizado para el manejo biológico de fitopatógenos habitantes del suelo mediante el uso de microorganismos antagonistas. La mayoría se han realizado a nivel laboratorio y en menor número en campo (Fernández Herrera *et al.*, 2007). Sin embargo varios autores han realizado estudios tendientes a evaluar la capacidad antagonista *in vivo* de *Trichoderma* spp. sobre diferentes hongos. Matarese *et al.*, (2012) evaluaron la capacidad antagónica *in vitro* de diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. por su capacidad de antibiosis y micoparasitismo para el control de la fusariosis de la espiga del trigo causada por *Fusarium culmorum* y *graminearum*, y posteriormente lo evaluaron en tallos

de arroz y trigo donde demostraron que un aislamiento identificado como *Trichoderma gamsii* 6085 pudo afectar el crecimiento de ambos patógenos en los hospedantes. Por otra parte Ezziyyani *et al.*, 2004 reportaron que al inocular plantas de Chile (*Capsicum annum*) con *Trichoderma harzianum*, observaron 56% de disminución de la marchitez en condiciones de invernadero y 22% en campo, en comparación con las plantas no tratadas con *T. harzianum* e inoculadas con *P. capsici*. En este mismo estudio el antagonismo *in vitro* de *Phytophthora capsici* frente a *Trichoderma harzianum* en medio PDA enriquecido con Laminarina-glucosa (3:1, v/v), mostró que *T. harzianum* aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3-glucanasa (lisis enzimática), ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno (micoparasitismo), lo cual juega un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno. En un estudio que se realizó en cultivares de jitomate (Fernández Herrera *et al.*, 2007) evaluaron la influencia de cuatro productos biológicos comerciales en contra de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* y reportaron que cuando mezclaron los hongos de *P. capsici* y *F. oxysporum* ninguno de los productos ofreció protección; también obtuvieron los mismos resultados cuando se mezclaron los tres fitopatógenos, sin embargo un tratamiento con *Trichoderma harzianum* (T22) logró proteger en un 100% las plantas inoculadas con *Rhizoctonia solani*. Michel (2008) evaluó el efecto antagónico *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum*, agentes causales de la “escoba de bruja” del mango. Se aislaron 10 cepas del hongo antagonista, de las cuales se seleccionó e identificó a una a nivel de especie (*T. harzianum*), la cual presentó los mayores porcentajes de antagonismo contra ambos fitopatógenos; las cepas Thzn-2 y Thzcf-12 lograron detener el crecimiento de ambos hongos, sin embargo, no evaluaron su comportamiento en condiciones de campo. Osorio *et al* (2011) evaluaron los efectos antagónicos de 31 aislamientos de *Trichoderma* de diferentes regiones de México en medio de agar-patata-dextrosa (PDA). Estos investigadores observaron que 13 de 31 cepas de *Trichoderma* spp. mostraron un buen nivel de competencia y 24 de las mismas 31 inhibieron a *P. capsici* en un rango de 4.3 a 48.8%. Mediante PCR identificaron a 3 especies (*T. asperellum*, *T. hamatum* y *T. rossicum*). Se han probado consorcios de antagonistas contra ciertas enfermedades de plantas; por ejemplo Restrepo *et al.*, (2011) evaluaron un consorcio de producto comercial de micorrizas “Mikorhyze lote C7”; *Pseudomonas fluorescens*, viruta de pino y *Trichoderma harzianum* en contra de *Spongospora subterranea* y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de la enfermedad

con respecto al testigo. *P. fluorescens* y los tratamientos con *T. harzianum*, micorrizas y viruta, presentando una incidencia en raíces de papa de 32, 21 y 5, 3 y 1% respectivamente, por lo que estos tratamientos redujeron la incidencia y severidad de la sarna polvosa en las raíces y tubérculos. En escasos bioensayos se han probado combinaciones de antagonistas contra *Phytophthora capsici*, sin embargo, Bautista *et al.*, (2008) observaron que, en campo, al inocular los sustratos en almácigos con 0, 8, 16, 24 y 32 aislamientos y al someter a plántulas a un suelo donde naturalmente estaba presente *Phytophthora capsici*, los tratamientos en consorcios presentaron menor incidencia de marchitez, en comparación con el testigo. Su conclusión fue que el éxito de los complejos de antagonistas estuvo determinado por el empleo de los antagonistas en consorcios, y no necesariamente por la cantidad de aislamientos empleados. Ramos *et al.*, (2010) combinaron dos ascomicetos en condiciones *in vitro*, donde uno de ellos era *Xylaria poitei* y otro no fue identificado y concluyó que la actividad antagónica de ambos contra *P. capsici* se incrementa cuando crecen en forma combinada respecto a las confrontaciones duales. En cualquiera de los casos es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción entre los componentes microbianos. Las respuestas pueden ser diferentes, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000). La complejidad de las interacciones entre planta, suelo, microorganismos y ambiente son variadas. Una comprensión completa de todas las relaciones en cuestión es poco probable; sin embargo, los efectos benéficos de las interacciones biológicas que estimulan los rendimientos de los cultivos y mejoran la sanidad de las plantas pueden ser evaluados y quedar en evidencia algunas estrategias generales de la interacción (Sturz y Christie, 2003 citado por Cano *et al.*, 2011).

5.3 Biología de *Trichoderma* spp.

Es un habitante natural del suelo que se caracteriza por ser saprófito o parásito y por estas propiedades ejerce capacidad antagónica contra ciertos microorganismos (Camargo 2005). Es considerado un colonizador secundario, ya que se le ha aislado frecuentemente a partir de

materia orgánica en descomposición, de la superficie de raíces de varias plantas leñosas y parasitando estructuras de diferentes hongos patógenos, debido a la competencia por nutrientes y micoparasitismo (Camargo *et al.*, 2005).

Trichoderma se caracteriza por tener una distribución cosmopolita; es muy común en suelos, aunque también se encuentra en cuerpos de agua; crece muy bien en temperaturas que varían entre 20 °C y 28 °C. Puede obtener crecer en un rango de pH de 2.5 a 9.5, pero se desarrolla mejor a un pH neutro o ácido (5.5). Cuando se encuentra en sitios de buena luz esporula rápidamente y en la obscuridad pierde esta capacidad. Es capaz de utilizar un amplio espectro de fuentes de CO₂ y N y su resistencia a inhibidores microbianos le permiten colonizar casi todos los tipos de suelo, inclusive ácidos y ricos en materia orgánica (Benítez y González, 2003).

Trichoderma es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa, entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* spp. asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996 citado por Ágamez *et al.*, 2008).

Además se conoce que *Trichoderma* spp. presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que elicitán o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia) (Harman, 2004).

Por último se deben de considerar algunos principios básicos de vital importancia para el éxito del control biológico con ciertos hongos como *Trichoderma*. Estos incluyen el contar con propágulos efectivos (joven, hifa de activo crecimiento); disponer de una base de alimento y edad apropiada del inóculo, habilidad de los agentes de biocontrol para invadir y tener una base de alimento similar a la del patógeno; la cantidad del medio de cultivo, la concentración de

esporas apropiada y el tiempo de óptimo de aplicación (condiciones ambientales, durante y después de la aplicación) (Lewis *et al.*, 1990).

5.4 Identificación

Generalmente las especies del género *Trichoderma* presentan conidióforos complejos y altamente ramificados en forma piramidal o cónica, que dan origen a esterigmas, con extremos ahusados. A través del microscopio las fiálides se observan más estrechas en la base que en la parte superior, permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de éstas. (Barnett y Hunter, 1982).

En cuanto a la identificación microscópica se ha observado que muchas veces produce un alto número de pequeñas conidias verdes, lo que facilita a veces su identificación, pero generalmente no facilita la identificación de especies. Rifai (1969) dividió el género *Trichoderma* en nueve especies sobre la base de características morfológicas. Bisset (1992), incluyó algunas *Hypocreas* anamorfias en el género, resultando en el establecimiento de cinco nuevas secciones (Hermosa *et al.*, 2000). De acuerdo con las claves de Samuels *et al.*, (2013) las especies de *Trichoderma* spp. contienen conidióforos que son muy ramificados y por lo tanto difíciles de definir o medir ya que pueden presentarse copetudos, sueltos o compactos; a menudo se encuentran en anillos concéntricos separados o tener escasas hifas aéreas. Las principales ramas de los conidióforos producen otras ramas laterales que pueden ser de un tamaño similar. Existen ramas más largas y a menudo fiálides que se derivan directamente desde el eje principal. Las ramas pueden volver a ramificarse creando ramas secundarias de cerca de 90° con respecto al eje principal. El típico conidióforo de *Trichoderma*, con pares de ramas asume un aspecto piramidal. El conidióforo termina en uno o unos pocos fiálides. En algunas especies (por ejemplo: *T. polysporum*) las principales ramas se terminan por alargamientos largos, simples o ramificados, enganchado, recto o sinuoso, septadas, de paredes finas, estériles o terminales fértiles. El eje principal puede tener la misma anchura que la base de la fiálide o puede ser mucho más amplio. Las fiálides se agrandan típicamente en el medio, pero pueden ser cilíndricas o casi subglobosas y pueden crecer verticiladas, densamente agrupadas en el eje principal o pueden ser solitarias. Los conidios normalmente aparecen secos,

pero en algunas especies se puede mantener en gotas de líquido verde o amarillo claro (por ejemplo: *T. virens*, *T. flavofuscum*). Los conidios de la mayoría de las especies son elipsoidales, de 3-5 x 2-4 µm pero pueden ser globosos aunque son raros. Los conidios son normalmente lisos pero tuberculados y finamente verrucosos en algunas especies. La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas; son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova *et al.*, 1999). Las clamidosporas son típicamente subglobosas unicelulares y se pueden formar dentro de las células de hifas, en algunas especies son multicelulares (por ejemplo: *T. stromaticum*) (Samuels *et al.*, 2003).

5.5 Clasificación

Cuadro 1. Clasificación de *Trichoderma* spp. según Alexopoulos *et al.*, 1996:

División	Eumicota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Hyphales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>harzianum</i> , <i>viride</i> , <i>hamatun</i> , entre otras.

5.6 Mecanismos de acción

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno (Orietta *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2007). Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro se considera que es un organismo antagonista. Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y prelación, siendo los más importantes en el control

biológico de fitopatógenos el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia, que son comunes en las cepas de *Trichoderma* spp. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos del suelo y en la rizósfera; los antagonistas producen antibióticos, actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

5.6.1 Antibiosis

La antibiosis ocurre durante la interacción de los compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Además, las cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos antagonizados; entre estos metabolitos se encuentran el ácido harziánico, alameticinas, tricholinas, peptaiboles, antibióticos, 6-pentyl α pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido heptéldico (Howell *et al.*, 1998).

5.6.2 Micoparasitismo

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped. *Trichoderma* spp. puede ejercer control directo por el rango de hongos que parasita; es capaz de detectarlos y crecer sobre ellos (Benítez *et al.*, 2004). *Trichoderma* se ha reportado como hiperparásito de un gran número de hongos fitopatógenos al atacar directamente y producir la lisis de micelio y esclerocios de hongos (Corrêa *et al.*, 2007).

5.6.3 Degradación de la pared celular

Se ha observado que *Trichoderma* spp, produce celulasas, glucanasas y quitinasas que degradan *in vitro* la celulosa de las paredes celulares de microorganismos oomycetes y la quitina y β -1,3, glucanos de las paredes celulares de microorganismos deuteromicetes como *Gliocladium* spp (Elad *et al.*, 1982). Diversos estudios han demostrado que 1,3-glucanasas de *Trichoderma* spp. inhiben la germinación de esporas o el crecimiento de patógenos en cooperación sinérgica con quitinasas (Benítez *et al.*, 1998) y antibióticos (Harman *et al.*, 2004).

5.7 *Phytophthora capsici*.

El phylum Oomycota, perteneciente al reino Cromista, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas, órganos de reproducción sexual, con paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan de la presencia agua libre (Raven *et al.*, 1999).

Algunas de las características que diferencian el género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de β 1-3 glucano en vez de quitina, carencia de hipoxidación del esqualeno a esteroides y diferencias en las vías metabólicas, como resultado de un sistema genético único (Griffith y Shaw, 1998).

Phytophthora capsici fue descrito por primera vez por Leonian en 1922 como el principal agente asociado a la marchitez del chile *Capsicum annum* en zonas de Nuevo México, aunque se consideraba que era su hospedante específico. Esa idea se ha desmentido con el tiempo ya que actualmente existe evidencia de que causa enfermedades en un amplio rango de hospedantes tanto en regiones templadas como en tropicales. *Phytophthora capsici* se caracteriza por producir oogonios esféricos con anteridios anfíginos, que al momento de ser fertilizados producen oosporas pleróticas. Los esporangioforos por su parte se pueden encontrar en un simpodio simple en agua, los esporangios se presentan de forma papilada y son variables en cuanto a su tamaño y forma, aunque los más comunes son ovoides y elipsoides con bases redondeadas, pero existen algunas malformaciones como los pedicelos laterales y la producción de papilas múltiples, su tamaño varía entre los 57x32 μm . Comúnmente no presentan hifas hinchadas ni clamidosporas, pero si presentan largos pedicelos con esporangios caducos. (Gallegly y Hong, 2008).

5.7.1 Crecimiento miceliar

Las estructuras somáticas (talos) de *Phytophthora* spp. son llamadas micelio y están compuestas de filamentos hialinos (hifas) ramificados y cenocíticos (no septados), excepto cuando son viejos, aunque algunas veces se pueden observar septos en cultivos jóvenes. El citoplasma fluye libremente dentro del micelio. El diámetro del micelio (5-8 micras) es variable y depende de la naturaleza física y química del medio y de si el micelio está sobre la superficie aérea, sumergido o dentro de las células huéspedes. En ocasiones el micelio se esponja, se vuelve tuberculado y raras veces crece simétricamente (Erwin y Ribeiro 1996). *Phytophthora capsici* por lo regular crece en medios de cultivo como LBA (lime vean agar) puede desarrollar colonias que alcanzan hasta 8 cm en solo 5 días. Los patrones de crecimiento de colonias pueden variar de algodonosos, petaloides, rosáceos, a estrellados (Babadoost, 2005).

En el cultivo *in vitro* se pueden originar variaciones en el aspecto del micelio en algún sector de la colonia, las cuales pueden ser relevantes tanto macroscópica como microscópicamente en cuanto a la morfología, así como desde el punto de vista fisiológico y parasitario, debido a la posibilidad de producirse nuevas razas más virulentas (Boccas y Laville, 1976).

Cuando las especies del género *Phytophthora* son cultivadas *in vitro* el desarrollo del micelio se ve condicionado por varios factores tales como la composición del medio, la temperatura, los nutrientes, la tensión de oxígeno y de CO₂, el pH y en menor escala la luz (Erwin *et al.*, 1983; Tuset, 1983).

La temperatura ocupa un papel importante entre los factores que limitan el crecimiento vegetativo y constituye un parámetro relevante en la taxonomía. El rango de temperatura para el desarrollo del micelio va desde 1 a 37°C, con un óptimo entre 20 y 28°C para la mayoría de las especies, con valores específicos para cada una de ellas (Boccas y Laville 1976). Específicamente *Phytophthora capsici* puede crecer de 10 a 36 °C, con temperaturas óptimas de 24 a 33 °C. (Babadoost, 2005).

En el caso del pH el rango permisible para el cultivo *in vitro* varía entre 3.5 y 10, con un óptimo específico para la mayoría de las especies, generalmente entre 4.5 y 5.5. Generalmente, los

valores de pH que permiten el mejor desarrollo del micelio, también son favorables para la producción de esporangios, clamidosporas y oosporas.

5.7.2 Reproducción

Las especies del género *Phytophthora* presentan dos tipos de reproducción: asexual (con la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas) y sexual (mediante la formación de oosporas).

5.7.2.1 Reproducción asexual.

Las zoosporas se forman dentro del esporangio, para lo cual es necesaria la presencia de agua libre. La liberación de estas puede estimularse *in vitro* cuando se incuba un cultivo con esporangios durante pocos minutos a temperaturas entre 5 y 10 °C. La exposición a estas temperaturas durante 10 a 15 minutos provoca que las zoosporas sean liberadas, lo cual constituye la forma de germinación indirecta de estos hongos.

Las especies de este género presentan además una forma de germinación directa, en la cual el tubo germinativo se origina, principalmente, a partir de la papila del esporangio. Este a su vez puede dar lugar rápidamente al micelio o producir un nuevo esporangio, todo lo cual depende de las condiciones del medio de cultivo (Zentmyer y Mitchell, 1986).

Las zoosporas son las estructuras primarias que causan una nueva infección en las raíces. Estas esporas pueden nadar cortas distancias en suelo con elevada humedad; también pueden ser transportadas a grandes distancias en el agua de irrigación o por las lluvias. Además de esta forma de dispersión las especies de *Phytophthora* pueden dispersarse en la naturaleza por el aire o son transportadas por la actividad de los humanos y algunos invertebrados (Ristaino y Gumperts, 2000).

5.7.2.2 Reproducción sexual

Los órganos sexuales constituyen el elemento taxonómico más constante y por tanto son de gran valor en la clasificación de las especies. No todas las especies los producen o se muestran inconstantes en cuanto a su formación, por lo que en algunos casos se requieren medios de cultivo especiales. Incluso en la naturaleza existen casos, como por ejemplo *P. citrophthora*, donde no se ha observado la producción de estos órganos de reproducción (Tuset, 1977).

El oogonio se caracteriza por ser esférico o ligeramente ahusado, usualmente se encuentra en el ápice de una hifa, aunque también puede aparecer intercalado, separado del resto de la hifa por un grueso tabique. En cultivos jóvenes es hialino pero posteriormente, con el envejecimiento, se torna amarillo o ligeramente marrón. En la mayoría de las especies es suave y puede presentar ligeras protuberancias o verrugas en algunos casos. El anteridio por su parte es muy variable pero comúnmente es esférico u oval, aunque se pueden desarrollar en forma de cilindro o de clavo, contiene una pared externa delgada y es hialino. La posición con respecto al oogonio puede ser anfígino o parágino o incluso ambas (Ristaino y Gumperts, 2000). La oospora siempre se presenta de manera individual, ocupando relativamente toda la cavidad del oogonio (pleróticas). Es de forma esférica, lisa o moderadamente verrugosa y su coloración puede ser hialina o ligeramente amarillo oscuro. Las oosporas contienen espesores en la pared que van de 2 a 6 μm , y diámetros que van desde 22 hasta 35 micras (Babadoost 2005).

5.7.3 Hospedantes de *Phytophthora capsici*

De acuerdo con Leah L. *et al.*, (2012) *P. capsici* puede infectar una amplia gama de hospedantes en condiciones de laboratorio y condiciones de invernadero, incluidos los cultivos como calabacita (*Cucurbita pepo*) Coliflor (*Brassica oleracea*), melón (*Citrullus* sp.) alfalfa (*Medicago sativa*) cebolla (*Allium cepa*) haba (*Vicia faba*) jitomate (*Solanum lycopersicon*) chile (*Capsicum annuum*) cacao (*Theobroma cacao*) y variadas plantas ornamentales y plantas nativas que pertenecen a diversas familias de plantas como geraniaceae, lauraceae, liliaceae, orchidaceae y asteraceae entre otras, como consecuencia la enfermedad puede notarse en el campo cada año en cucurbitáceas, solanaceas y fabaceas. También menciona que los daños menores por *P. capsici* pueden ser pasados por alto o diagnosticarse erróneamente en

hospedantes no declarados. Las diferencias en la susceptibilidad del hospedante pueden ser debido a las diferencias en virulencia y patogenicidad de la población de los patógenos locales.

5.8 Progreso de la enfermedad

Según Bowers *et al.*, (1990), las lluvias han demostrado tener el mayor efecto de tipo ambiental, ya que afectan la incidencia y el progreso de la enfermedad. La precipitación o el agua corriente son necesarios para el desprendimiento y dispersión de esporangios (Granke *et al.*, 2009). Los productores y los investigadores han reconocido desde hace tiempo que la lluvia o riego excesivo propicia o agrava un brote de la enfermedad. El patrón de desarrollo de la enfermedad típicamente refleja el flujo de agua en el campo. Dado que el patógeno se propaga en el agua, la enfermedad se puede observar por filas dentro de un campo, siguiendo el flujo del agua y la esorrentía (Cafe *et al.*, 1995). Cuando las condiciones ambientales son muy favorables para el desarrollo de la enfermedad, ninguno de los fungicidas actualmente disponibles la pueden controlar completamente (Hausbeck y Lamour, 2004). Sin embargo según Leah *et al.*, (2012) en ausencia de la resistencia adecuada en el patógeno, los fungicidas juegan un importante papel en una estrategia de gestión integrada de *P. capsici*, ya que mientras el mefenoxam fue utilizado con éxito durante muchos años para controlar las enfermedades causadas por este patógeno, muchas poblaciones de *P. capsici* ahora son parcial o totalmente resistentes a este fungicida.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitio de trabajo y zona de procedencia de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Phytophthora capsici*.

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios e invernaderos del Programa de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo. Las cepas de *Trichoderma* spp. y *Phytophthora capsici* fueron aisladas de campos de cultivo de chile serrano del municipio de Tetela de Ocampo, Puebla. Este municipio se localiza en la parte Norte del Estado (Fig. 1); se ubica entre las coordenadas 19° 43' 00" y 19° 57' 06", de latitud norte y 97° 38' 42" y 97° 54' 06" de longitud oeste. Colinda al norte con los municipios de Cuautempan y Tepetzintla, al Sur con Ixtacamaxtitlán, al Oeste con Xochiapulco y Zautla, y al Poniente con Aquixtla, Zacatlán e Ixtacamaxtitlán.

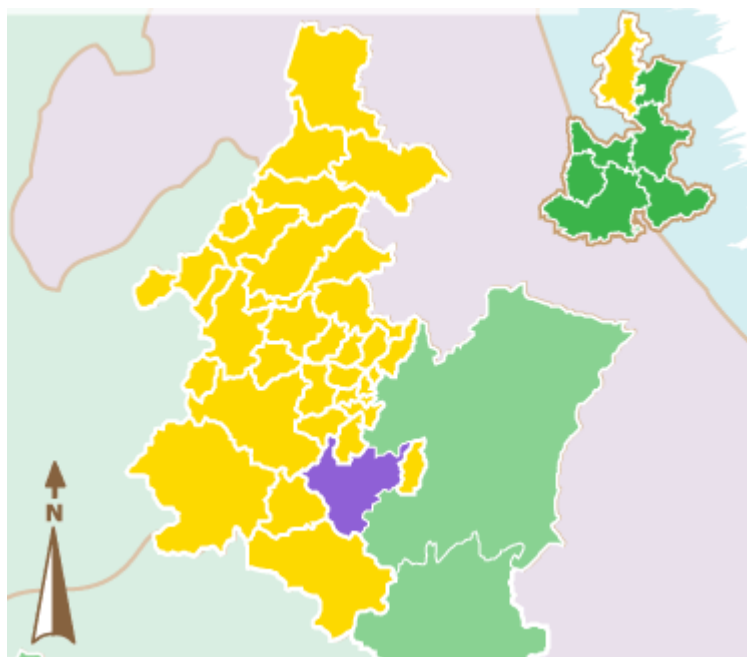


Figura 1. Mapa de la división política de la región norte del estado de Puebla. Los límites marcados con la línea blanca y rellena con morado ubican al municipio de Tetela de Ocampo.

6.2 Cepas estudiadas

Se utilizaron como referencia las cepas de *Trichoderma* spp. TS1P1, T5-(2), T4-(3), TMIX, TJIM I y TJIM II. Las primeras tres fueron aisladas de suelos erosionados de la comunidad de Tonalapa (TSIP1) y de la comunidad de La Cañada (T5-(2) y T4-(3)), ambas pertenecientes a Tetela de Ocampo, Puebla. Las otras tres cepas proceden del estado de Morelos y fueron colectadas de rizósfera de maíz (TMIX) y jitomate (TJIM I y TJIM II). Adicionalmente, se realizaron aislamientos de suelo rizosférico de plantas de chile serrano procedentes del área de estudio. Todas las cepas se preservaron en agar-papa-dextrosa PDA (MERCK™).

6.3 Muestreo del suelo

Durante el periodo de verano del 2013 se realizó un muestreo al azar de suelos en campos de cultivo de chile serrano del área de estudio. En cada terreno se seleccionaron cinco plantas de chile *Capsicum annuum* L con síntomas típicos de marchitez, de las que se colectó la raíz y 2 kg de suelo rizosférico. Adicionalmente, del mismo campo de cultivo se colectó una cantidad suficiente de suelo como para tener unidades experimentales de 1 kg en los experimentos de evaluación de la efectividad de *Trichoderma* spp. en condiciones de invernadero, mismos que se describen en secciones subsecuentes.

Se aislaron tres cepas de *Trichoderma* spp. asociadas a la rizósfera del cultivo de chile y tres cepas más para el caso del oomiceto *Phytophthora capsici*, que fue realizado a partir de raíces infectadas de plantas que mostraron los síntomas típicos de marchitez.

6.4 Aislamiento e identificación morfológica de *P. capsici*

Se utilizaron las raíces que mostraban decoloración vascular o lesiones en el cuello y corteza. Se lavaron con agua corriente y se seccionaron en porciones de aproximadamente 0.5 cm; se colocaron en una bolsa hecha con gasa estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, con agitación constante. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Subsecuentemente, los segmentos de raíz se colocaron en medio de cultivo PARPH, semiselectivo para *Phytophthora* spp. (Kannwischer y Mitchell 1978). Cada

24 h se revisaron las cajas de Petri para detectar el crecimiento de colonias, las cuales se purificaron en nuevas cajas con PDA (14 mL de ácido tartárico al 10% (p/v) Solache *et al.*, (2010). Posteriormente se introdujeron secciones en forma de cubo con el micelio contaminado en otra caja de Petri con medio V8 y se incubó a 25 °C por 24 a 48 h.

Una vez lograda la purificación de las cepas se transfirieron los pseudohongos a medio de cultivo V8 para inducir la formación de estructuras morfológicas y confirmar su identidad taxonómica mediante la clave de Waterhouse (1963).

6.5 Aislamiento e identificación morfológica de cepas de *Trichoderma* spp.

Se utilizó el método de dilución en placa. Para tal efecto se pesó 1 g de suelo rizosférico y se colocó en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril, el cual se agitó durante 15 s mediante un vórtex (GENIE™). Se tomó una alícuota de 1 mL con una pipeta (KIMAX®) para depositarla en otro tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada esterilizada y se repitió este procedimiento hasta llegar a la dilución 10⁻³. De cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL para dispersarla uniformemente sobre la superficie de una caja Petri con medio de cultivo PDA con 500 mg l⁻¹ de cloranfenicol. Este procedimiento se realizó en una cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas. Las cajas sembradas se incubaron a 28 ± 2°C durante 5–7 días. Las colonias de *Trichoderma* spp. se identificaron por la formación de cojines verdes de conidios y se verificó su identidad mediante las claves de Barnett y Hunter (1972). Cada aislamiento fue purificado mediante la transferencia de puntas de hifa a nuevas cajas de Petri. Las cepas axénicas se mantuvieron a temperatura ambiente en tubos inclinados con PDA y aceite de parafina (HYCEL®) y subsecuentemente se etiquetaron para su conservación, hasta que fueron utilizadas.

6.6 Tasa de desarrollo y esporulación de *Trichoderma* spp.

Con un sacabocados de cobre se cortaron discos de 5 mm de diámetro de medio de cultivo Extracto de Malta-Agar (Difco®) con micelio de las cepas indicadas en la sección 6.2 y se colocaron en nuevas cajas Petri de 90 mm de diámetro con el mismo medio. El micelio utilizado para esta evaluación tenía 6 días de edad. Cada cepa fue sembrada por separado en ocho cajas diferentes e incubada a 26 °C con un fotoperiodo de 12 horas. Cuando una de las cepas llenó

completamente todas las cajas donde fue sembrada se estimó la tasa de desarrollo de todos los cultivos con base la fórmula usada por Romero *et al.*, 2013.

$$TD = C \text{ Final} - C \text{ Inicial} / D$$

Dónde:

TD = Tasa de desarrollo (mm/d)

C Final = Diámetro en mm alcanzado en el tiempo final

C Inicial = Diámetro del disco inicial en mm

D = número de días que tardó la primera cepa en llenar la caja de Petri.

Se estimó la esporulación alcanzada en cada caja al término del experimento. Para tal efecto se agregaron 20 mL de agua destilada estéril a cada caja y se colectaron las esporas en un vaso de precipitado (KIMAX®) mediante una espátula de vidrio estéril. Se agregó una gota de jabón líquido como surfactante para la facilitar la dispersión de las esporas. Se colocaron 10 µL de esta suspensión en cada una de las dos secciones de un hematocitómetro (MARIENFELD™). El conteo de esporas se realizó en el cuadrante central de cada una de ellas; dentro de estas sólo se evaluaron los cuatro subcuadrantes de las esquinas y el central (A,B,C,D y E) y se sumó el total de esporas. El resultado obtenido en ambas secciones fue promediado. Este valor se multiplicó por un factor de 5000 para estimar el total de esporas por mililitro.

En un segundo bioensayo se realizó el mismo procedimiento pero se utilizaron cuatro cajas Petri de 140 mm de diámetro por cepa. Se estimó nuevamente la tasa de desarrollo de las nueve cepas y la esporulación alcanzada al término del bioensayo.

6.7 Antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora capsici*

En un primer bioensayo se evaluó el antagonismo de todas las cepas de *Trichoderma* spp. indicadas en la sección 6.2, contra tres cepas de *P. capsici* (PC-A, PC-B y PC-C) que resultaron patogénicas en las pruebas descritas en la sección 6.8. La evaluación estuvo basada en el procedimiento de Cherif y Benhamou (1990). Se colocó por separado, para cada cepa, un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *P. capsici* de 8 días edad en un extremo de cajas Petri con

Extracto de Malta-Agar. Se dejó desarrollar el oomiceto durante 3 días, debido a su crecimiento lento en este medio de cultivo. Al término de este período se colocó en el extremo opuesto de cada caja otro disco de 5 mm con micelio de una de las cepas de *Trichoderma* spp. en evaluación. Posteriormente las cajas de Petri se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25°C y 40% de humedad relativa, con un fotoperíodo de 12 h. Se evaluó un total de 27 combinaciones (9 cepas de *Trichoderma* spp. contra tres cepas de *P. capsici*). En calidad de testigos se prepararon cajas de Petri con cada cepa de *Trichoderma* spp. o de *P. capsici* creciendo por separado. Cada unidad experimental constó de una caja Petri. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones.

Se inspeccionaron las cajas Petri cada 24 h para determinar el número de días al primer contacto entre las hifas de los dos hongos. Se determinó el tipo de antagonismo de acuerdo a la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) al décimo día, la cual se describe en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Escala de evaluación del antagonismo ejercido por las cepas de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora capsici* (Bell *et al.*, 1982).

Clase	Descripción
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio.
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio.
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro.
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio.

Se estimó el diámetro del crecimiento micelial de las cepas de *P. capsici* en el día diez después de haber sido sembradas las tres cepas y posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con base en la fórmula de Vincent (1947):

$$I = (C - T / C) * 100$$

Dónde:

I = porcentaje de inhibición

C = Crecimiento (mm) de *P. capsici* sin *Trichoderma* spp.

T = Crecimiento (mm) de *P. capsici* con *Trichoderma* spp.

En un segundo bioensayo se usaron las mismas cepas, el mismo diseño experimental y condiciones ambientales que el anterior.

6.8 Pruebas de patogenicidad.

Esta técnica se basó parcialmente en la metodología de Ristaino (1990). Se aislaron tres cepas de *Phytophthora capsici* (PC-A, PC-B y PC-C). Cada cepa fue sembrada en 10 placas de 90 mm de medio de cultivo V8 y expuesta a luz artificial a 60 cm de altura durante 6 días. Posteriormente, con un sacabocados de cobre estéril se extrajeron discos de 5 mm de cada placa y se colocaron en nuevas cajas con el mismo medio de cultivo; subsecuentemente se agregaron con 10 mL de agua destilada estéril a todas las placas para inducir la formación de esporangios y se incubaron a 28 °C durante 4 días. Al término de este período, las placas se colocaron en un cuarto frío (6 °C) durante 20 min y después se colocaron en una incubadora a 28 °C durante 1 h para inducir la liberación de zoosporas. La suspensión contenida en cada placa, correspondiente a cada cepa, se colectó en un vaso de precipitados estéril. El número de zoosporas obtenida se cuantificó con un hematocitómetro mediante diluciones seriadas y se ajustó a 5×10^4 (Gómez *et al.*, 2008), 1×10^5 (Redondo *et al.*, 1989), 3×10^5 y 6×10^5 (Trujillo *et al.*, 2005) zoosporas/mL Cada nivel de zoosporas se inoculó en plantas sanas de chile serrano cv Criollo de Tetela de Ocampo, sembradas en vasos de unicel de 250 mL, con suelo del área de estudio. Se evaluaron tres cepas de *P. capsici* inoculadas independientemente con los cuatro niveles de zoosporas antes mencionadas. En calidad de testigos se utilizaron plantas no inoculadas, crecidas en sustrato estéril y en suelo de Tetela de Ocampo. La inoculación se realizó con pipetas estériles. Se aplicó 1 mL de suspensión de zoosporas/planta de 75 días de edad. Al momento de la inoculación cada planta tenía en promedio nueve hojas y 12 cm de altura. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. El experimento tuvo un diseño completamente al azar. Las plantas se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 26 °C con 12 h luz. Los síntomas de marchitez se evaluaron con la escala de Morán *et al.* (2010)

que utiliza categorías nominales arbitrarias (0,3,5,7 y 9) del aspecto general de la planta donde: 0= hojas y tallos turgentes, 3= hojas inferiores con pérdida de turgencia solamente, 5= hojas medias e inferiores marchitas y la punta del tallo con inclinación ligera, 7= hojas marchitas y punta del tallo colgante y 9= planta muerta. Con esta misma descripción se elaboró una escala visual con plantas de chile para facilitar la asignación de las categorías de los tratamientos en evaluación.

6.9 Influencia de filtrados de cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de *Phytophthora capsici*

Este experimento se basó parcialmente en la técnica descrita por Reyes *et al.* (2007). Se elaboraron medios de cultivo líquidos, con diferentes granos. Para tal efecto se molieron por separado granos de maíz (Criollo de Tetela de Ocampo), trigo y arroz (Morelos®) mediante un molino de operación manual. Cada molido se tamizó mediante una rejilla metálica de 60 mallas (250 μm). Se prepararon suspensiones con 0.8 g de grano molido en 40 mL de agua destilada y se esterilizaron a 120 °C y 15 lb/pulg² durante 20 min. Posteriormente se inocularon las nueve cepas de *Trichoderma* spp. en los tres medios líquidos, en condiciones asépticas. Se utilizaron discos de 5 mm con micelio proveniente de cultivos de 6 días en Extracto de Malta-Agar. Los matraces se incubaron durante 10 días a 26 °C, con períodos de agitación (160 rpm) de 2 h diarias. Al término de este período se filtró en condiciones axénicas el contenido de cada matraz mediante un embudo Buchner al que le colocó papel miliporo de 0.2 μm , un papel filtro marca Whatman No. 2 y una gaza estéril. El embudo fue sobrepuesto en un matraz kitasato (PYREX®) conectado a una bomba de vacío (FELI WELCH® Mod. 1410). Se comprobó la ausencia de crecimiento microbiano en cada filtrado mediante siembras en placas con PDA con la ayuda de una aza microbiológica. A partir de los filtrados se realizaron dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) para tener un total de tres concentraciones procedentes de cada una de las combinaciones de cepas (9) y sustratos de crecimiento (3).

Se prepararon cajas Petri con Extracto de Malta Agar donde se sembró la cepa PCA de *P. capsici*, que mostró la mayor virulencia de acuerdo con las pruebas de patogenicidad. Cuatro días después de la siembra cada caja se marcó en cuatro secciones en su parte posterior. En cada sección se colocaron discos de papel filtro (Whatman No. 2) de 5 mm de diámetro, que

habían sido previamente sumergidos en una de las diluciones antes mencionadas. Los discos fueron colocados en forma tangencial a la colonia en cada subsección. Mediante este procedimiento se evaluaron 90 tratamientos generados a partir de la combinación de 9 cepas (más un control), tres sustratos de crecimiento y tres concentraciones de filtrado (original y diluciones 10^{-1} y 10^{-2}). En calidad de testigos se utilizaron discos sumergidos en filtrados, diluidos o no, procedentes de los tres sustratos, donde no se sembró con *Trichoderma* spp. En este bioensayo se consideró como repetición cada una de las cuatro secciones marcadas en las cajas Petri. Se incubó a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) y se realizaron inspecciones cada 24 h durante 4 días. Al término de este periodo se midió con una regla graduada milimétricamente el halo de inhibición de *P. capsici* y se realizó un raspado superficial con una aza estéril para sembrar en placas con medio V8 con el fin de corroborar el efecto fungicida o fungistático de los filtrados. Los datos cuantitativos fueron analizados mediante análisis de varianza y pruebas de rango múltiple con base al método de Tukey (Steel y Torrie, 1980), utilizando para tal efecto el programa SAS (Statistical Analysis System, Cary North Carolina, v. 9.3).

En un segundo bioensayo se evaluaron las mismas combinaciones de cepas, sustratos de crecimiento y concentraciones de filtrado, mediante el procedimiento descrito anteriormente, pero en este caso se utilizaron tres cajas Petri por combinación, divididas en cuatro secciones, para tener un total de 12 repeticiones por tratamiento.

6.10 Fase de invernadero

La fase de invernadero se dividió en dos etapas.

La etapa 1 se realizó en vivero, en contenedores de poliuretano con 200 cavidades, donde se sembraron semillas de chile criollo de Tetela de Ocampo. Las plántulas resultantes se inocularon con las nueve cepas antagonicas en estudio.

En la etapa 2 se utilizó suelo de Tetela de Ocampo en macetas de poliuretano de 470 mL de capacidad donde se trasplantaron plántulas procedentes de la Etapa 1, las cuales, con base en un diseño de tratamientos que se describe a continuación fueron utilizadas para evaluar el efecto

de la inoculación con la cepa de *Phytophthora capsici* (PC-A) sobre las plantas de chile procedentes de la etapa 1 (tratadas con *Trichoderma* spp.).

6.10.1 Colecta y extracción de la semilla de *Capsicum annuum* L.

Se usó semilla de chile serrano de genotipos locales colectada en campos de cultivo de Tetela de Ocampo, Puebla, seleccionados al azar. Para extraer la semilla se cosecharon frutos maduros sanos, que presentaron una coloración roja uniforme. Se obtuvo un total de 25 Kg de chile. Estos frutos fueron almacenados en costales tipo arpilla y se guardaron en una bodega a temperatura ambiente durante 6 días para que perdieran turgencia. Transcurrido este periodo todos los frutos fueron seccionados longitudinalmente con una navaja. Los frutos se colocaron en un contenedor de 200 L, con 100 L de agua potable. Durante las siguientes 48 h se agitó la mezcla con movimientos circulares mediante una espátula de madera de 1.5 m, en intervalos de 5 h aproximadamente, con un tiempo de agitación de 5 min. Al término de este periodo la semilla flotante y el bagazo fueron desechados por decantación. Posteriormente se agregó de nuevo agua potable en el contenedor, se agitó durante 5 min, se dejó reposar 10 min y se eliminó el sobrenadante. La semilla que quedó en el fondo del tanque se colectó en un nuevo contenedor de 20 L se agregó agua a la mitad y con una espátula de madera de 0.5 m se agitó nuevamente durante 5 min y se dejó reposar 10 min para remover el sobrenadante. La semilla que quedó en el fondo fue colocada en una manta para exponerla 5 h al sol durante 3 días. Al término de este proceso la semilla se almacenó en recipientes limpios y secos hasta su uso.

6.10.2 Fertirriego.

Los riegos y la fertilización durante las dos etapas se aplicaron de forma conjunta mediante la solución nutritiva de Steiner (1984) (Cuadro 3). Esta solución se aplicó a las plantas cada semana, iniciando en el cuarto día después del trasplante y hasta el término del experimento.

6.10.3 Preparación de las plántulas de *Capsicum annuum* L.

Antes de la siembra, las semillas se trataron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% durante 3 min, se enjuagaron en agua destilada estéril en tres ocasiones y se eliminó el

exceso de agua colocándolas sobre toallas de papel estéril. Inmediatamente después las semillas se colocaron parcialmente enterradas en placas con medio selectivo para *Phytophthora* spp. (PARPH, Kannwischer y Mitchell, 1978). y fueron observadas cada 6 h durante 5 días para detectar algún posible crecimiento de micelio. Las semillas que no mostraron crecimiento microbiano se colocaron durante 24 horas en agua destilada estéril antes de la siembra. Posteriormente la semilla se sembró bajo condiciones de invernadero en 10 charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato estéril compuesto de turba (PREMIER®) y perlita expandida (DICAMEX®) en una proporción 75:25 v/v. Para la siembra se humedeció el sustrato al 80% y se colocaron dos semillas por cavidad a una profundidad de 3 mm. Treinta días después de la germinación, se raleó a una sola planta por cavidad.

Cuadro 3. Solución nutritiva utilizada para fertilizar el sustrato en los experimentos en invernadero, formulada con base en Steiner (1984).

Compuesto	Cantidad (g/100 L)
Nitrato de Calcio	98.92
Sulfato de Magnesio	49.50
Nitrato de Potasio	9.13
Fosfato de Potasio dibásico	13.61
Sulfato de Potasio	45.13
Quelato de hierro	3.00
Sulfato de Manganeso	0.19
Ácido Bórico en polvo	0.25
Sulfato de zinc	0.03
Sulfato de cobre	0.007
Molibdato de Sodio	0.0012

6.11 Etapa I: Vivero.

6.11.1 Inoculación con las cepas de *Trichoderma* spp.

Cultivos puros de las cepas de *Trichoderma* spp. fueron sembradas en placas de extracto de malta agar de 90 mm. Por cada cepa se utilizaron tres cajas de Petri y se expusieron a temperatura ambiente y luz LED a 60 cm de altura, durante seis días. Al término este lapso se realizó una cosecha de esporas con una asa de vidrio estéril y 20 mL de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión se realizó el conteo en el hematocitómetro y la concentración de esporas se estandarizó mediante diluciones seriadas para tener un nivel de inóculo de 10^6 esporas/mL (Jiménez *et al.*, 2011). Se inoculó 1 mL de la suspensión de cada cepa de *Trichoderma* spp., en 200 plantas de chile (1 charola) de 4 cm de altura y 65 días de edad. Se realizó un total de 4 inoculaciones; en intervalos de 15 días con la misma cantidad de esporas por planta en todos los casos.

6.11.2. Poblaciones de *Trichoderma* spp. en el sustrato

Cada 14 días posteriores a la inoculación, se estimó el número de unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* spp. en el sustrato. Para tal efecto se utilizó el método de dilución en placa bajo condiciones asépticas. Para ello fueron colectadas tres plantas al azar de cada tratamiento, con su respectivo cepellón. El cepellón junto con la raíz de la plántula fue agregado a una botella de dilución con 95 mL de agua destilada estéril. Una vez evaluado el desplazamiento de volumen, se agregó agua hasta tener un volumen de 100 mL. La mezcla correspondiente se agitó durante 1 min y a partir de ella se tomaron alícuotas para hacer diluciones en tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. Antes de tomar una nueva alícuota se agitó cada tubo durante 5 s mediante vortex y así sucesivamente se llegó a la dilución 10^{-4} . Por cada dilución se tomó con una pipeta estéril 0.1 mL y esta alícuota se colocó en el centro de una caja de Petri con extracto de malta agar (medio adicionado con 1 mL de tergitol dupon/Litro de EMA) y fue dispersada mediante una varilla de vidrio estéril. Por cada dilución fueron sembradas cuatro cajas en calidad de repeticiones. Las cajas se incubaron de 5 a 6 días y se inspeccionaron cada 24 h.

6.11.3 Peso seco de raíz y parte aérea

El peso seco de la parte aérea y de la raíz de cada grupo de plantas tratadas con las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. de las plantas no inoculadas, se estimó con las mismas muestras extraídas para la determinación de unidades formadoras de colonias. Las plántulas se colocaron en una bolsa de papel estraza con orificios de ventilación y se sometieron a desecación en una estufa de aire forzado a 70 °C durante 72 h. Posteriormente se pesó en una balanza con una precisión de .0001 g (SWISS MADE, Mod. ES 120A).

6.12. Etapa II. Efecto de cepas de *Trichoderma* spp. en la marchitez causada por *Phytophthora capsici*

6.12.1 Preparación del inóculo e inoculación con *Phytophthora capsici*

El inóculo de la cepa de *P. capsici* (PC-A) se obtuvo mediante el mismo procedimiento descrito para las pruebas de patogenicidad. Las plantas fueron inoculadas (6×10^6 zoosporas/planta) con la suspensión de zoosporas que manifestó los síntomas más severos en dichas pruebas.

La inoculación con *P. capsici* se realizó una vez terminada la cuarta inoculación de las cepas de *Trichoderma* spp., 3 días después del trasplante a macetas con suelo de campos de cultivo chile de Tetela de Ocampo.

6.12.2 Diseño experimental y diseño de tratamientos

Se evaluaron 22 tratamientos. Nueve de ellos consistieron plantas inoculadas en la fase de vivero con las respectivas nueve cepas de *Trichoderma* spp. en estudio; otros nueve tratamientos consistieron en plantas con el mismo tratamiento de las mismas cepas pero a las cuales se les realizó una reinoculación adicional con *Trichoderma* spp. al tercer día del trasplante a macetas con suelo de Tetela de Ocampo, Puebla. Se tuvieron además cuatro testigos sin *Trichoderma* spp; dos a base de suelo y dos a base de sustrato (peat moss y perlita expandida 75/25 v/v, esterilizado). Todas las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. fueron además inoculadas con *Phytophthora capsici*, 15 días después del trasplante. En el caso de los testigos,

uno de cada sustrato fue inoculado con 6×10^5 zoosporas de *P. capsici* (PC-A). Cada unidad experimental constó de una maceta de poliuretano de 0.5 L de capacidad donde se agregó suelo no tratado procedente de campos de cultivo de chile serrano de la localidad antes mencionada, a las que se trasplantó una plántula de chile criollo de la misma región. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones iniciales con el fin de realizar muestreos destructivos para evaluar tanto la ocurrencia del patógeno en las raíces como la cantidad de unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* en dos muestreos, uno 14 días después del trasplante y otro 18 días después de la inoculación con *P. capsici*. Los tratamientos fueron arreglados en el invernadero con base en un diseño experimental completamente al azar, con redistribución aleatoria de las unidades experimentales cada semana. Debido a los muestreos destructivos realizados en el experimento, las variables de severidad y el número acumulado de plantas muertas fueron obtenidas a partir de 12 plantas que no fueron requeridas para dichos muestreos y se consideraron como repeticiones de cada tratamiento en evaluación. Este experimento fue repetido una vez más, con 15 días de diferencia en el tiempo de establecimiento.

6.12.3. Variables evaluadas

6.12.3.1 Severidad

Para cada tratamiento se determinó cada 3 días, iniciando 24 h después de la inoculación con el oomiceto *P. capsici* (PC-A) y hasta el término del experimento (32 días después), Utilizando la escala de Morán *et al.* (2010)

6.12.3.2 Número acumulado de plantas muertas

Después de la inoculación con *P. capsici*, se contabilizó el número de plantas muertas (categoría 9 según la escala de Moran *et al.*, 2010 y la fecha en que se detectó la muerte. Con estos valores se generaron curvas del número acumulado de plantas muertas para cada tratamiento en cada experimento. De cada una de estas se calculó el área bajo la curva (ABCPM), siguiendo un procedimiento similar al que se describe en la siguiente sección. Como el conteo se realizó con base al total de plantas muertas por tratamiento solamente se obtuvo un valor de ABCPM por tratamiento y por experimento. Para realizar el análisis estadístico correspondiente se tomaron

estos datos como una repetición individual y se unieron los resultados de los dos experimentos para tener un total de dos repeticiones.

6.12.3.3 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad

Con base en los valores de severidad a través del tiempo se obtuvo el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Este valor fue calculado mediante el modelo de integración de Campbell y Madden, (1990).

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i)$$

donde, n es el número de evaluaciones, x es la severidad y $(t_{i+1}-t_i)$ es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas.

6.12.3.4 Presencia de *Phytophthora capsici*

Se utilizaron muestreos destructivos de plantas de chile de cada tratamiento, incluyendo los testigos, cada 3 días hasta el término del experimento, para detectar la presencia del oomiceto; para ello se colectó al azar una unidad experimental de cada tratamiento, de las cuales se extrajeron las raíces, se lavaron en agua corriente y se cortaron secciones de 1 cm. 20 ± 2 de estas secciones fueron lavadas con agua destilada estéril y con hipoclorito de sodio al 1%; se escurrieron, enjuagaron y secaron en papel estéril y posteriormente se colocaron en 20 mL de agua destilada estéril. Este procedimiento se realizó en 4 cajas Petri de 90 mm por cada tratamiento. Las cajas se incubaron a 28 °C y se dejaron reposar 6 días y se inspeccionaron para determinar si hubo formación de esporangios. En los casos positivos se observaron los materiales al microscopio compuesto para verificar que la morfología de las estructuras reproductivas correspondió a los descrito en la literatura para *P. capsici* (Whaterhouse, 1963).

6.12.3.5 Presencia de *Trichoderma* spp.

Al final de la evaluación de la severidad, de la muestra de raíz donde se identificó la presencia de *P. capsici*, se tomó una submuestra para identificar la presencia de *Trichoderma* spp. Para ello, las raíces fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio al 1% y sembradas en cajas Petri con Extracto de Malta Agar (Difco ®) con ácido láctico (1 mL/L) y se incubaron a 26 °C con 12 h luz diarias. Se destinaron 4 de estas cajas en forma de repeticiones en las que se sembraron 10 secciones de raíz de 0.5 cm, de cada tratamiento y se distribuyeron completamente al azar en la cámara bioclimática. Cada 24 h se realizaron inspecciones de las colonias en el microscopio estereoscópico durante 6 días para confirmar el crecimiento del hongo; al término de este lapso se contabilizó el número de raíces con *Trichoderma* spp. en cada unidad experimental y se obtuvo un promedio por tratamiento.

6.12.3.6 Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma* spp.

Al final del experimento, durante el muestreo para la determinación de *P. capsici* y *Trichoderma* spp. en raíces, se obtuvo suelo rizosférico de cada unidad experimental para estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) del antagonista. La muestra de cada unidad experimental se dividió en dos submuestras de 10 g; una de ellas se destinó a la determinación del número de UFC de *Trichoderma* spp. mediante la metodología descrita en la sección 6.11.3.3. y la otra fue destinada a desecación a 110 ± 5 °C en una estufa de aire forzado y se pesó cada 12 h hasta que alcanzó un peso constante. Se calculó el contenido de humedad del suelo y se estimó el peso seco de la muestra usada en la determinación biológica. Posteriormente se siguió la metodología empleada en la sección 6.11.3.3.

6.12.3.7 Peso seco de raíz y parte aérea

Se estimó el peso seco de la parte aérea y de la raíz de la planta en cada unidad experimental mediante el procedimiento descrito en la sección 6.11.3.4. Para esta evaluación se destinaron cuatro plantas (repeticiones) por tratamiento. El peso seco de ambas partes de la planta de cada uno de los tratamientos fueron evaluados a partir de los 18 días después del trasplante y 15 días posteriores a la inoculación de *Trichoderma* spp., la evaluación se realizó cada 15 días durante

45 d. En cada muestreo fueron promediados los valores del peso seco para obtener un promedio en cada fecha. Adicionalmente se calculó la relación raíz/parte aérea para cada muestreo.

6.12.3.8 Área foliar de *Capsicum annuum*

Sólo se determinó el área foliar de las hojas de plantas vivas de cada tratamiento al final del experimento. Se descartó toda hoja clorótica, marchita o necrótica. Para cada tratamiento se obtuvo un promedio de las 12 plantas implicadas en la evaluación de la severidad. Para la determinación se utilizó un integrador de área foliar marca LI-COR mod. LI-3100.

6.12.4 Análisis estadístico

Los datos de las variables evaluadas se analizaron mediante análisis de varianza y técnicas de comparación múltiple de medias (Steel *et al.*, 1997). El procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina), versión 9.3.

VII. RESULTADOS

7.1 Aislamiento e identificación morfológica de *Phytophthora capsici*

Se aislaron tres cepas de *P. capsici* (PC-A, PC-B y PC-C) y se confirmó su identidad taxonómica mediante las claves de Whaterhouse (1963). En medio de cultivo V8 estas cepas tienen crecimiento radial y petaloide, con hifas cenocíticas, clamidosporas terminales de 20 a 26 μm de diámetro. Además se observó la formación de esporangióforos ramificados de manera irregular, esporangios de 28-60 X 22-40 μm , ovoides y elipsoides, la mayoría de ellos papilados e incluso con dos y tres papilas. La siembra conjunta de las cepas PC-A con PC-B o PC-B con PC-C estimuló la formación de anteridios anfíginos, oogonios con pared lisa hialina y oosporas esféricas hialinas, de pared gruesa. Esto indica que en la región de Tetela de Ocampo, Puebla, donde se realizó la colecta de plantas enfermas, están presentes los dos grupos de compatibilidad (A₁ y A₂).

7.2 Aislamiento e identificación de cepas de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron tres aislamientos de *Trichoderma* spp. procedentes de la rizósfera de suelos productores de *Capsicum annuum* de Tetela de Ocampo. Dichos aislamientos fueron denominados A2S2P3, S3A4 y S3A3. Las cepas presentaron las características típicas del género descritas por Barnett y Hunter (1972), las cuales consistieron en la formación de cojines verdes, conidióforos hialinos, muy ramificados, no verticilados, con fiálides individuales y en grupos, fialeconidios hialinos unicelulares, ovoides y formados en pequeños racimos terminales.

7.3 Tasa de desarrollo

En el bioensayo 1 se observaron diferencias significativas en la tasa de desarrollo (TD) de las cepas evaluadas (Anexo 1). La cepa S3A4 llenó completamente la caja Petri de 90 mm en 3 días, por lo que logró una TD de 28.3 mm/día (Fig. 2). Las cepas S3A3 y T-5(2) tuvieron una tasa de 24.9 y 24.6 mm/día, respectivamente, pero estos valores no fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos con la cepa S3A4; a sí mismo T5(2) y T4(3) fueron similares a

TMIX (23.1 mm/día) y T4(3) (22.8 mm/día), cuyos valores si resultaron significativamente menores que el de la cepa S3A4. Le siguió en orden descendente la cepa TJIM II con 18.8 mm/día, valor estadísticamente igual al de las cepas TMIX, T4(3), A2S2P3 (17.6 mm/día) y TJIM I (14.17 mm/día). TP1S1 tuvo la tasa de desarrollo más baja en este bioensayo (8.6 mm/día), la cual fue considerablemente menor que la observada en el resto de las cepas.

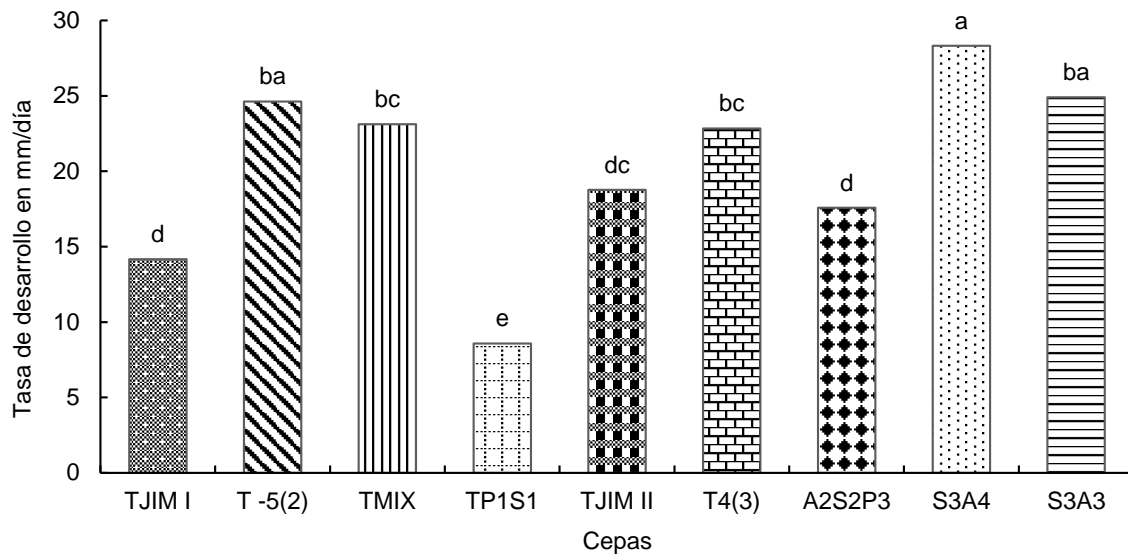


Figura 2. Tasa de desarrollo de cepas de *Trichoderma* spp. en Extracto de Malta Agar, incubadas a 26 °C, bioensayo 1. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).

En el bioensayo 2 también se obtuvieron diferencias significativas en la TD de las cepas evaluadas (Anexo 1), pero el valor de esta variable aumentó en todos los casos, con un mismo patrón general de diferencias en desarrollo que en el bioensayo 1, con excepción de las cepas A2S2P3 y TP1S1 cuyos valores fueron considerablemente más altos (Fig. 3). Las cepas S3A4 y A2S2P3 llenaron las cajas Petri de 140 mm en 4 d, con lo que alcanzaron una TD de 33.7 mm/d. A su vez, S3A3 tuvo valores ligeramente más bajos (31.3 mm/d) pero estadísticamente iguales a estas cepas. Cabe destacar que estas tres cepas fueron aisladas de la rizósfera de Chile de suelos de Tetela de Ocampo. TP1S1 obtuvo valores intermedios, ya que fue estadísticamente similar a S3A3 y las TJIM II (27.5 mm/día), TMIX (26.4 mm/d), T5(2) (25.7 mm/d) y T4(3) (24.4 mm/d) quienes no resultaron significativamente diferentes entre sí. TJIM I tuvo la menor

TD (14.1 mm/d) en este bioensayo, algo similar a lo obtenido en el bioensayo 1 donde tuvo el penúltimo lugar en desarrollo. Los cambios drásticos en la TD de las cepas TP1S1 y A2S2P3 pueden deberse a que al aumentar el sustrato disponible expresaron mayor potencial de crecimiento, además de que en el segundo bioensayo se adaptaron mejor al medio de extracto de malta agar (EMA) que en el bioensayo 1.

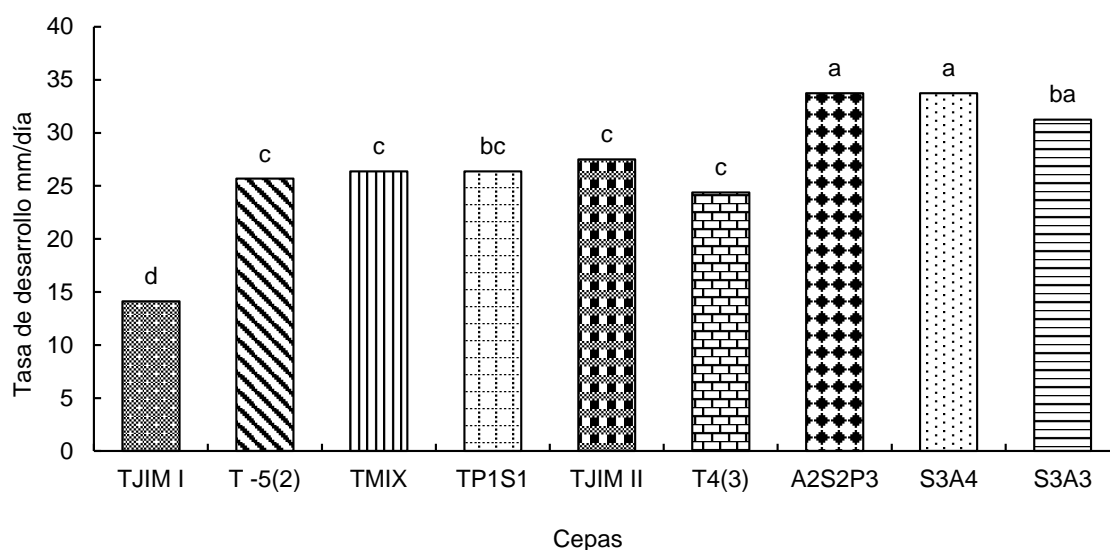


Figura 3. Tasa de desarrollo de cepas de *Trichoderma* spp. en Extracto de Malta Agar, incubadas a 26 °C, bioensayo 2. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).

7.4 Esporulación

En algunas cepas el nivel de esporulación alcanzado a los 4 d de crecimiento siguió una tendencia similar a la tasa de desarrollo (Fig. 4a); así mismo se observaron diferencias significativas con el nivel de esporulación (Anexo 2). La cepa S3A4 tuvo la mayor esporulación (1,730,000 esporas/mL). TP1S1 y S3A3 produjeron 1,532,500 y 1,335,000 esporas/mL, respectivamente, pero sus diferencias con respecto a la S3A4 no fueron significativas. La cepa A2S2P3, aunque fue una de las que llenó completamente la caja Petri a las 96 h, solo alcanzó un nivel de esporulación de 865,000 esporas/mL, además no presentó anillos de esporulación tan marcados como las demás. La cantidad de esporas que produjo fue estadísticamente similar

a la alcanzada por la cepa TJIM II (700,000 esporas/mL). La menor esporulación fue obtenida por las cepas T4 (3) (462,500 esporas/mL) TMIX, (412,500 esporas/mL), T-5(2) (335,000 esporas/mL) y TJIM I (265,000 esporas/mL) y no se detectaron diferencias significativas entre ellas.

En el bioensayo II la esporulación se comportó de manera similar a la del bioensayo I (Fig. 4b), ya que se mantuvo el mismo orden de esporulación y también se observaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 2.). La cepa fue S3A4 (1,722,500 esporas/mL) seguida por TP1S1 (1,520,000 esporas/mL) y S3A3 (1,315,000 esporas/mL) tuvieron las esporulaciones más altas y las diferencias entre ellas no fueron significativas. Las cepas A2S2P3 (865,000 esporas/mL) y TJIM II (700,000) tuvieron niveles de esporulación estadísticamente iguales, las cuales a su vez fueron diferentes de TJIM I, (265,000 esporas/mL) T -5(2), (335,000 espora/mL), TMIX (412,500 esporas/mL) y T4(3) (462,500 esporas/mL), cuyas diferencias no fueron significativas.

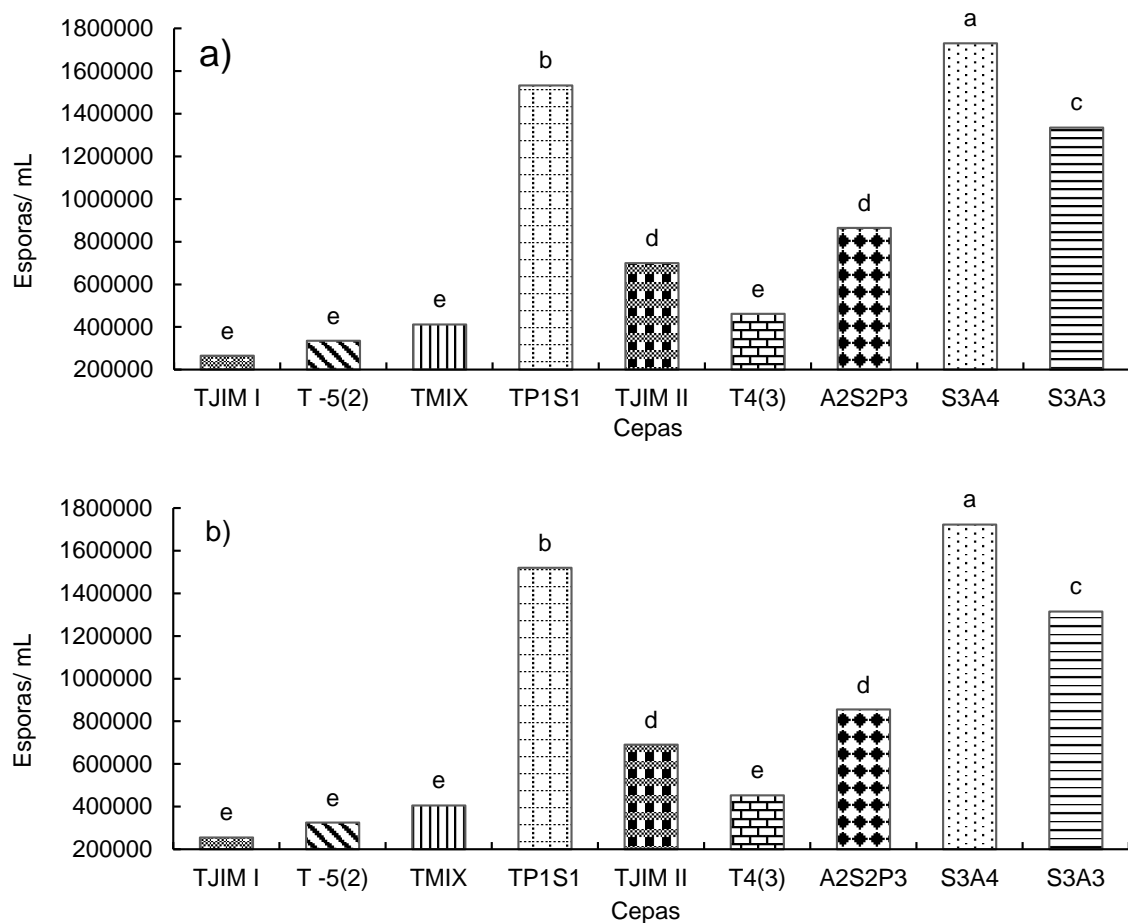


Figura 4. Esporulación de cepas de *Trichoderma* spp., estimada 96 h después de la siembra en Extracto de Malta Agar. (a) Bioensayo I. (b) (Bioensayo II). Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).

Aunque los aislamientos S3A4 y S3A3 tuvieron la mayor esporulación y TD, la cepa A2S2P3 solo tuvo la mayor tasa de desarrollo pero no de esporulación. En la Fig. 5 se muestra la relación observada entre esporulación y TD para las cepas evaluadas en este estudio. Se detectó una relación lineal entre el logaritmo natural del número de esporas y la TD; además de que el análisis de varianza demostró que si hubo regresión (Anexo 3). Las cepas TP1S1 y T5(2) tuvieron las mayores desviaciones con respecto al modelo, lo cual puede ser indicativo de una estrategia diferente de reproducción.

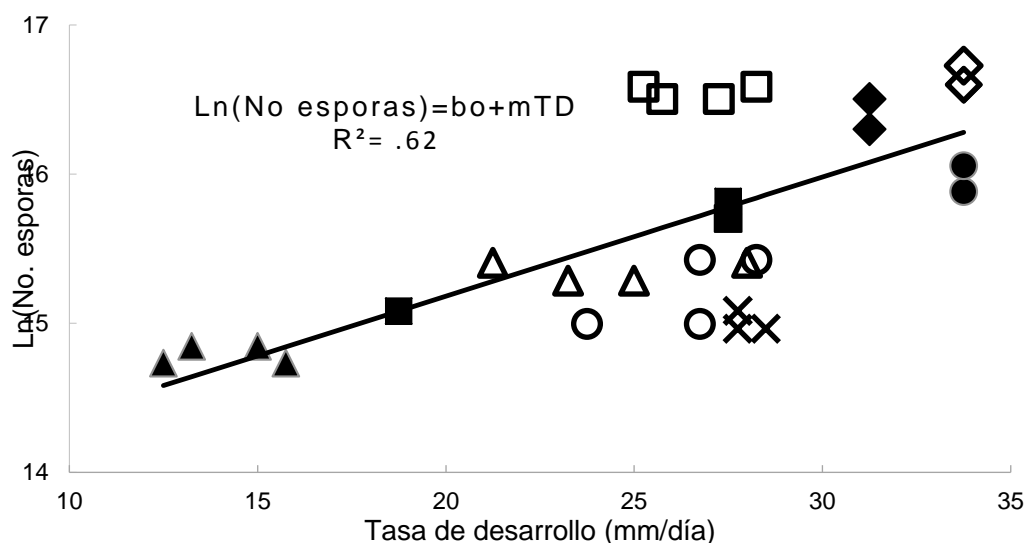


Figura 5. Relación entre el logaritmo natural del número de esporas de las cepas de *Trichoderma* spp. y la tasa de desarrollo del micelio. ○=TMIX, Δ=T4(3), ▲= TJIM I, ●= A2S2P3, ◇= S3A4, □=TP1S1, ■=TJIM II, ◆=S3A3, ×= T5(2).

7.5 Antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora capsici*

En el bioensayo 1, el tiempo en que ocurrió el contacto entre las cepas de *Trichoderma* spp. y las de *P. capsici* varió en un rango de 4 y 7 d. (Cuadro 4). Estas diferencias estuvieron relacionadas con la velocidad de crecimiento del micelio de cada organismo involucrado. Las cepas de *Trichoderma* spp. S3A4, S3A3, T4(3), T-5(2) y TMIX demoraron 5 d en hacer contacto con la cepa PC-A de *P. capsici*, mientras que TJIM I y A2S2P3 duraron 6 d. TJIM II y TP1S1 tardaron 7 días. Con la cepa PC-B de *P. capsici*, S3A4 tardó 4 d en hacer contacto, mientras que S3A3, T-5(2), T4(3) y TMIX demoraron 5 d. TP1S1, A2S2P3, TJIM II y TJIM I por su parte hicieron contacto en 6 días. Con la cepa PC-C de *P. capsici* hubo mayor homogeneidad en el tiempo de contacto ya que seis de las nueve cepas duraron 5 d, a excepción de A2S2P3 que demoró 6 d y TJIM I y TP1S1, que demoraron 7 d.

En el bioensayo 2 el tiempo de contacto entre hifas fue más homogéneo que en el bioensayo 1 (Cuadro 3). Todas las cepas de *Trichoderma* spp. duraron menos tiempo en hacer contacto, pero esta vez no hubo diferencias asociadas a la cepa de *P. capsici*. Las cepas TP1S1 y A2S2P3 redujeron considerablemente su tiempo de contacto, debido al incremento en su tasa de desarrollo, ya que pasaron de 6 a 7 d en el bioensayo 1 a sólo 3 d en el bioensayo 2.

Similarmente, las cepas S3A3 y S3A4 mantuvieron el tiempo de contacto de 3 d observado en el bioensayo 1, mientras que T4(3), T-5(2) y TMIX lo realizaron en 5 d. TJIM II y TJIM I demoraron 6 d, independientemente de la cepa de *P. capsici*.

A 10 d después de la siembra, el tipo de antagonismo que ejercieron las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las cepas de *P. capsici* fue igual en ambos bioensayos (Cuadro 3). Las cepas S3A3 y A2S2P3 ejercieron un antagonismo tipo 1 en PC-B y PC-C, debido a que colonizaron completamente la colonia del patógeno y cubrieron totalmente la superficie del medio, pero fue de tipo 2 en PC-A ya que sólo lograron parasitar dos terceras partes de la colonia. TJIM I fue la única cepa que mostró un antagonismo tipo 3 sobre las tres cepas de *P. capsici*, debido a que su tasa de desarrollo fue la más baja, lo que propició que hasta al décimo día apenas generara contacto con las cepas del oomiceto. T5(2) estableció una relación de tipo 1 con la cepa PC-C y de tipo 2 con PC-A y PC-B. TJIM II, TMIX y TP1S1 presentaron el tipo 2 con las tres cepas, sin embargo TP1S1 se observó más agresiva al momento de invadir las estructuras aéreas. S3A4 logró sobreponerse a PC-A y PC-B consiguiendo antagonismo tipo 1, pero un tipo 2 con la PC-C, además de que en esta última confrontación la esporulación no fue tan abundante como en PC-A y PC-B. T4(3) fue la única cepa con antagonismo tipo 1 contra las tres cepas de *P. capsici*. En este caso se observó que el parasitismo ejercido fue a base de micelio, ya que no mostró la coloración verde característica de las esporas. (Fig. 6) De acuerdo con estos resultados, las cepas más antagónicas contra las cepas patogénicas fueron T4(3), S3A3, S3A4, A2S2P3 y TP1S1.

En el bioensayo 1 el porcentaje de inhibición ejercido por las cepas de *Trichoderma* spp. tuvo diferencias estadísticamente significativas (Anexo 4) y varió de 47.8 a 68.7 % para PC-A. (Fig. 7 a) La cepa que causó el mayor porcentaje de inhibición en PC-A fue T4(3) con 68.7 %; este resultado fue estadísticamente diferente del observado con la cepa A2S2P3 quien causó 47.8 % de inhibición, mientras que T-5(2) (60.3 %), S3A3 (57 %), TJIM II (55.8 %), TP1S1 (54.4 %) S3A4 (52 %), TMIX (52 %) y TJIM I (52 %) no resultaron significativamente diferentes de la cepa T4(3).

Cuadro 4. Día del primer contacto entre hifas de las cepas de *Trichoderma* spp. y las de *P. capsici*. en medio de cultivo de Extracto de Malta Agar (EMA). Bio 1= Bioensayo 1, Bio 2= Bioensayo 2, T.A.= Tipo de antagonismo ejercido.

Cepa	PC-A (Bio 1)	PC-A (Bio 2)	T.A.	PC-B (Bio 1)	PC-B (Bio 2)	T.A.	PC-C (Bio 1)	PC-C (Bio 2)	T.A.
TP1S1	7	3	2	6	3	2	7	3	2
TJIM I	6	5	3	6	5	3	7	5	3
A2S2P3	6	3	2	6	3	1	6	3	1
TJIM II	7	5	2	6	5	2	5	5	2
T4(3)	5	4	1	5	4	1	5	4	1
TMIX	5	4	2	5	4	2	5	4	2
T-5(2)	5	4	2	5	4	2	5	4	1
S3A3	5	3	1	5	3	1	5	3	1
S3A4	5	3	1	4	3	1	5	3	2

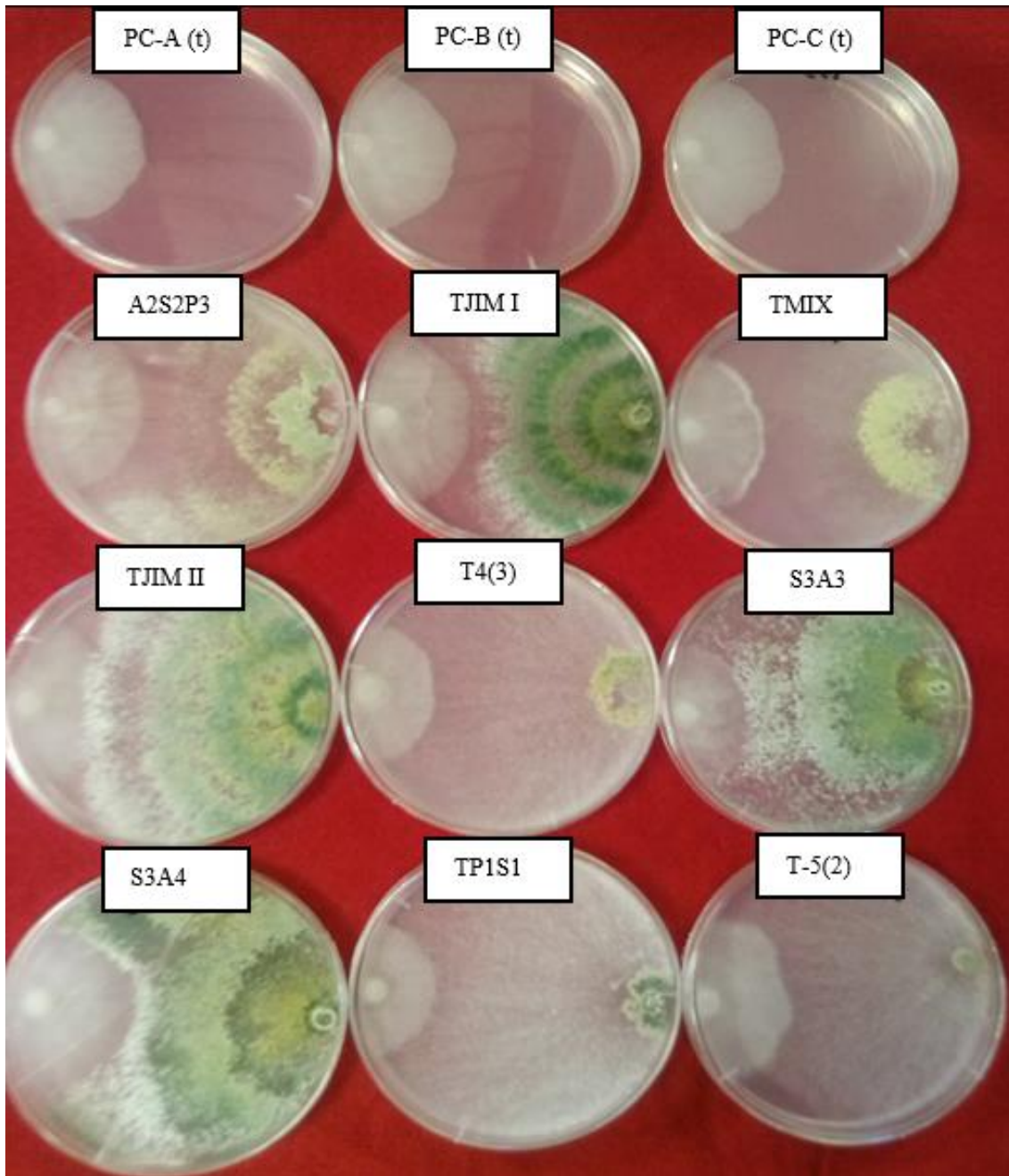


Figura 6. Confrontaciones antagónicas de cepas de *Trichoderma* spp. con cepas de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo Extracto de Malta Agar, a 10 días de la siembra de *Trichoderma* spp. (Bioensayo 2). Columna 1, cepas de *Trichoderma* spp contra PC-A, columna 2, contra PC-C y columna 3 contra PC-C. (t)= testigo de *P. capsici* sin *Trichoderma* spp.

Con la cepa PC-B el porcentaje de inhibición se mantuvo en un rango de 48.5 a 62.1 %. (Fig. 7 c). TJIM I tuvo la menor inhibición sobre PC-B (48.5 %), seguida de TJIM II con 49.1 %. T5(2) alcanzó 52.3 %, S3A4 53.2 %, A2S2P3 53.8 %, TMIX 55.1 % y T4(3) 57.5 %. S3A3 y

TP1S1 tuvieron la mayor inhibición (59.4 y 62.6 %, respectivamente). Sin embargo, en ningún caso las diferencias resultaron estadísticamente significativas (Anexo 5).

Con la cepa PC-C el porcentaje de inhibición varió de 52.4 % a 64.5%. (Fig. 7 e). La menor inhibición se observó en la cepa A2S2P3 con 52.4 %; le siguieron en orden creciente las cepas T-5(3) (53.5 %), TMIX y TJIM II (54.4 %), TJIM I (56.5 %) y T4(3) 59.7 %. Los valores más altos fueron obtenidos con S3A3 (62.9 %), S3A4 (63.7 %) y TP1S1 (64.5 %). No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Anexo 6). Estos resultados muestran que el porcentaje de inhibición puede cambiar de acuerdo a la cepa antagonista pero puede variar en función del tipo de cepa del patógeno involucrada.

En el bioensayo 2 el Porcentaje de inhibición sobre la cepa PC-A de *P. capsici* varió de 57 a 62.9 % (Fig. 7 b). Este rango fue menor al observado en el bioensayo 1. La cepa T4(3) causó la mayor inhibición (64.9%) y fue precedida por las cepas TJIM II y A2S2P3 (60.5 %), S3A3 (59.8 %), TJIM I (59.4 %), TMIX (58.2%), TP1S1 (57.4 %), T-5(2) (57 %) y S3A4 (55.5 %), pero las diferencias entre estos tratamientos no fueron significativas (Anexo 4). Esta homogeneidad relativa en el grado de inhibición puede ser debida al lento crecimiento de *P. capsici* (PC-A) en el medio de extracto de malta-agar, mientras que *Trichoderma* spp. creció profusamente acortando el tiempo requerido para hacer contacto con las hifas del oomiceto, con respecto a lo observado en el bioensayo 1.

Con la cepa PC-B de *P. capsici* la inhibición varió de 49.1 a 79 % (Fig. 7 d), un rango más amplio que el observado en el bioensayo 1. La cepa S3A4 inhibió 79 % el crecimiento de este patógeno, lo cual fue 25.8 % mayor que lo observado en el bioensayo 1. Probablemente este incremento se debió a la mayor TD observada en el bioensayo 2, a la ocurrencia de un parasitismo tipo 1 y al acortamiento del tiempo de contacto con las hifas del patógeno, al grado de que el crecimiento micelial de *P. capsici* se vio muy disminuido, sin permitirle dispersarse en el medio de cultivo. Debido a estos cambios las diferencias entre S3A4 con A2S2P3 (50 %) y TJIM I (49.1 %) sí resultaron significativas (Anexo 5). En el caso de las cepas TP1S1 (69.6 %), T4(3) (62.6 %), T-5(2) (62.1 %), S3A3 (59.8 %), TJIM II (56.1 %) y TMIX (53.7 %) los valores de inhibición resultaron estadísticamente iguales que los de S3A4, pero también

resultaron iguales a los de A2S2P3 y TJIM I, que tuvieron los porcentajes más bajos (50 y 49.1 %, respectivamente).

En el caso de PC-C el rango de inhibición varió de 56.5 a 65.7 % (Fig. 7 f), el cual fue similar al observado en el bioensayo 1; sin embargo en este caso la cepa que logró mayor inhibición fue T4(3) (65.7 %). Este valor fue precedido por TP1S1 (64.4 %), TMIX (63.7 %) y S3A3 (62.9 %). El resto de cepas tuvo menor grado inhibición (A2S2P3, 60.5 %; T-5(2), 60.1 %; S3A4, 58.9 %; TJIM II, 58.1 %; y TJIM I, 56.5 %). No obstante estos resultados, las diferencias entre cepas no fueron significativas (Anexo 6).

7.6 Patogenicidad de diferentes cepas de *Phytophthora capsici* en chile serrano cv. Tetela de Ocampo

Las tres cepas de *P. capsici* evaluadas causaron algún tipo de síntoma de marchitez en el cultivar criollo de Tetela de Ocampo. Estos síntomas se empezaron a presentar a partir del tercer día después de la inoculación. Cuando las plantas fueron inoculadas con 6×10^5 zoosporas de la cepa PC-A, al doceavo día ocurrió muerte de la planta (severidad de nueve) (Fig. 8). Con la cepa PC-B sólo se observó marchitez ligera con afectaciones en las hojas inferiores y medias (severidad de cinco). Con la cepa PC-C sólo se observó pérdida de turgencia (severidad de tres).

Cuando se usaron 3×10^5 zoosporas la severidad en las plantas inoculadas con PC-A tuvo un valor de cinco, mientras que con las cepas PC-B y PC-C se observó un valor de tres. Las plantas inoculadas con 1×10^5 zoosporas con PC-A tuvieron una severidad de tres, ya que apenas pudo notarse una pérdida de turgencia, mientras que para la cepa PC-B y PC-C no se detectaron síntomas.

Con 5×10^4 zoosporas de cualquiera de las cepas no se detectó ningún síntoma y las plantas lucieron igual que los testigos no inoculados.

La cepa PC-A tuvo mayor potencial patogénico, para asegurar la infección y la expresión de síntomas severos en las plantas de *Capsicum annum* L. cv criollo de Tetela de Ocampo, Puebla; en particular cuando el nivel de inóculo fue de 6×10^5 zoosporas.

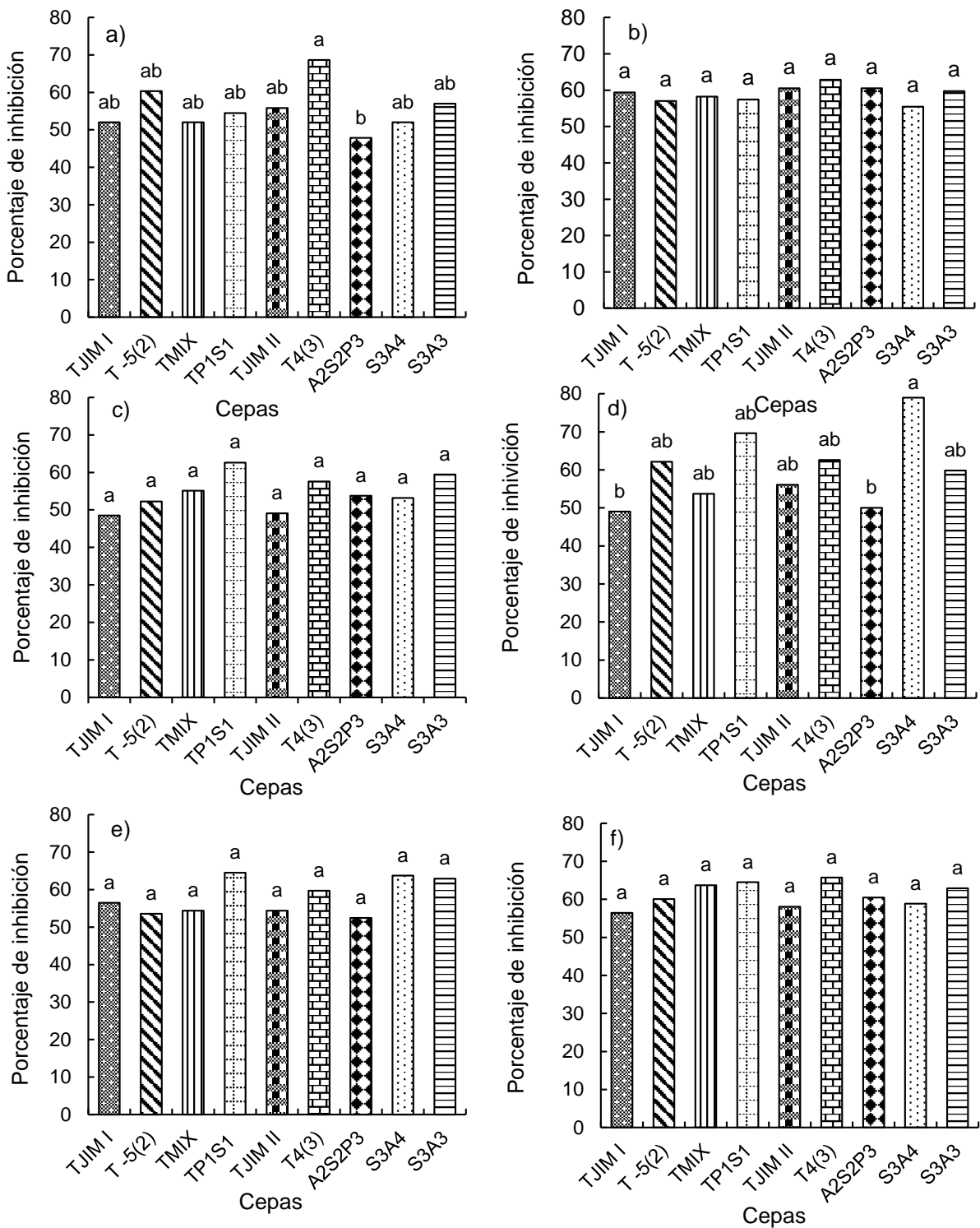


Figura 7. Porcentaje de inhibición ejercido por cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora capsici* en medio de cultivo extracto de malta-agar a 10 días de la siembra del patógeno. a), y b) cepa PC-A; c) y d) cepa PC-B; e) y f) cepa PC-C de *P. capsici*. Las gráficas a), c) y e) corresponden al Bioensayo 1; b), d) y f) corresponden al Bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey P < 0.05).

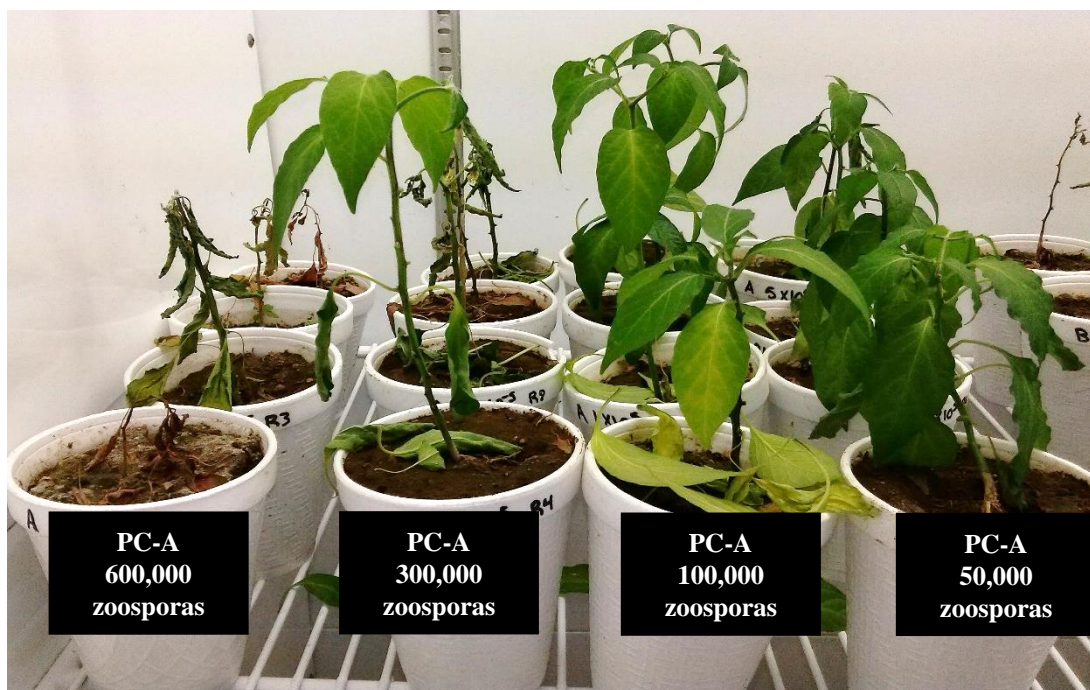


Figura 8. Pruebas de patogenicidad en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Puebla; a 12 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici* (PC-A) con diferentes niveles de zoosporas.

7.7 Influencia de filtrados de cepas de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de *Phytophthora capsici*

En el bioensayo 1 se observó que los filtrados producidos mediante el cultivo del antagonista vario significativamente con respecto a la cepa de *Trichoderma* spp; sustrato de crecimiento, dilución y las interacciones entre estas (Anexo 7). En el sustrato a base de trigo, el diámetro del halo formado en la zona de aproximación con *P. capsici* PC-A dependió tanto de la cepa de *Trichoderma* spp. y de la concentración utilizada. El mayor diámetro de inhibición se generó en el filtrado no diluido, seguido por la diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . La cepa T-5(2) generó los halos más grandes en cada concentración del filtrado. Con el filtrado no diluido el halo fue de 25 mm (Fig. 9a y 10); con la dilución 10^{-1} fue de 18 mm, mientras que con la 10^{-2} fue de 11 mm. Por su parte, la cepa T4(3) formó halos de 17 (10^0), 12 (10^{-1}) y 8 mm (10^{-2}). TP1S1 los formó de 15 (10^0), 12 (10^{-1}) y 7 mm (10^{-2}). Con TJIM II se obtuvieron valores de 16 (10^0), 11 (10^{-1}) y 5 mm (10^{-2}). TJIM I formó halos de 13 (10^0), 7 (10^{-1}) y 0 mm (10^{-2}).

Cuando las cepas fueron cultivadas en medio a base de maíz, los patrones de formación de halos contra PC-A fueron diferentes a los observados con el sustrato a base de trigo. En las cepas T-5(2) y T4(3) el halo de inhibición fue de 20 mm cuando se aplicó filtrado no diluido (10^0) (Fig. 9c), es decir 5 mm menos para T-5(2) y 4 mm más para T4(3) que los observados en el sustrato a base de trigo. Esto indica que la formación de halos de inhibición no solo es influenciada por el tipo de cepa y la dilución, sino también por el sustrato donde creció el antagonista. Con los filtrados no diluidos de la cepa TJIM II se formó un halo de 17 mm, mientras que con TP1S1 y TJIM I el halo fue de 15 y 10 mm, respectivamente. Al aplicar filtrados con una de 10^{-1} no se mantuvo el mismo patrón de inhibición anterior, ya que con T-5(2) y T4(3) fue de 12 mm de diámetro. Al aplicar la dilución 10^{-2} el halo en ambos casos fue de 7 mm, mientras que con TP1S1 fue de 6 mm, con TJIM II de 5 mm y con TJIM I no se observó inhibición.

En el sustrato a base de arroz los filtrados de la cepa T-5(2) produjeron un halo de 19 mm de diámetro cuando se aplicaron sin diluir. Este valor fue similar al observado con los filtrados a base de maíz. T4(3) formó un halo de 16 mm (Fig. 9e), TP1S1 fue de 12 mm y TJIM II de 7 mm. TJIM I no formó halo de inhibición. Cuando se utilizó una dilución de 10^{-1} los filtrados de T4(3) formaron un halo de 13 mm, los de TP1S1 de 12 mm y los de T5(2) de 7 mm. En estos tratamientos los filtrados de la cepa TP1S1 mostraron una disminución gradual en el diámetro del halo conforme aumentó la dilución, mientras con los de TJIM II la disminución fue más drástica, al grado de no formar halo cuando se aplicaron diluidos. Estos resultados indican la posibilidad de que las sustancias inhibitorias producidas por las diferentes cepas sean distintas y que sus dosis letales varíen a concentraciones diferentes.

Las cepas TMIX, S3A4, S3A3 y A2S2P3 no generaron halo de inhibición a ningún caso, independientemente del sustrato de crecimiento de donde se obtuvieron los filtrados. Cabe destacar que estas cepas fueron aisladas de la rizósfera de Chile (S3A3, S3A4 y A2S2P3), con excepción de TMIX. Estos resultados indican que los posibles metabolitos producidos durante su crecimiento en los medios líquidos aparentemente no tienen efecto sobre el patógeno, por lo tanto el antagonismo observado en las confrontaciones *in vitro* puede ser por parasitismo o competencia por sustrato.

En el bioensayo 2 se observaron resultados similares a los del bioensayo 1, ya que el efecto de filtrados vario significativamente con respecto a la cepa de *Trichoderma* spp.,-sustrato de crecimiento, dilución y las interacciones entre estas (Anexo 7). Con el sustrato a base de trigo las cepas mantuvieron un grado similar de inhibición al bioensayo 1; en la dilución 10^{-0} la cepa T-5(2) obtuvo el mayor halo (23.3 mm de diámetro) sobre de *P. capsici* PC-A (Fig. 9b), es decir, 1.7 mm menos que lo obtenido en el bioensayo 1. T4(3) produjo un halo de 19 mm, TJIM II 16 mm, TP1S1 14.3 mm y TJIM I 13.3 mm. En la dilución 10^{-1} la cepa T5-(2) también tuvo la mayor inhibición (14 mm), seguida por T4(3) con 13 mm. No obstante que la cepa TJIM II produjo un halo de 12 mm, que es menor al obtenido por TP1S1 (11 mm), este resultado fue similar al observado en el bioensayo 1, pues se esperaba que TJIM II al obtener mayor diámetro de inhibición en el filtrado madre que la cepa TP1S1, continuara con la misma tendencia en la dilución 10^{-1} , sin embargo no fue así en cualquiera de los bioensayos. TJIM I obtuvo el menor diámetro (7 mm). Con la dilución 10^{-2} , la cepa T-5(2) causó la mayor inhibición (9 mm), mientras que T4(3) produjo un halo de 8 mm, TP1S1 de 7 mm, TJIM II de 6.3 mm y TJIM I no mostró inhibición.

Cuando se usaron filtrados obtenidos en medio a base de maíz la cepa T5(2) tuvo la mayor inhibición (21 mm) (Fig. 9d). Este valor fue ligeramente mayor al observado con T4(3) (19.9 mm). Con excepción de esta variación las demás cepas conservaron el mismo patrón observado en el bioensayo 1. TJIM II obtuvo un halo de inhibición de 17.3 mm, TP1S1 de 16 mm y TJIM I 10.1 mm. Con la dilución 10^{-1} T5(2) causó un diámetro de inhibición de 13 mm, T4(3) 11 mm, TP1S1 10 mm, TJIM II 9 mm y TJIM I no tuvo ningún efecto. Con la dilución 10^{-2} T5-(2) tuvo un diámetro de 8 mm, TP1S1 6.4 mm y TJIM II 5 mm y TJIM I no mostró inhibición.

Con los filtrados obtenidos en el sustrato de arroz los resultados fueron muy similares a los observados en el bioensayo 1. En el filtrado no diluido T5(2) tuvo un halo de inhibición de 18 mm de diámetro (Fig. 9f), T4(3) de 15.8 mm, TP1S1 de 12.8 mm y TJIM II de 7.8 mm. TJIM I no mostró inhibición. Con el filtrado diluido (10^{-1}) T5-2 produjo un halo de 12 mm, T4(3) 11.3 mm, TP1S1 8.7. Con TJIM II a partir de esta dilución no se observó inhibición. Cuando se utilizó la dilución 10^{-2} la cepa T5-(2) generó un halo de 8 mm, T4(3) 5 mm y TP1S1 5 mm.

Al igual que en el bioensayo 1, en este nuevo experimento las cepas TMIX, S3A4, S3A3 y A2S2P3 no generaron halo de inhibición en ninguna dilución. Dado que los resultados en ambos bioensayos fueron similares para todas las cepas y que la desviación estándar de sus respectivos halos de inhibición fue también muy similar, podemos concluir que los patrones observados con estos antagonistas son reproducibles.

Las observaciones que se realizaron en el microscopio compuesto sobre el área de inhibición que ejercieron los filtrados de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp; revelaron que a pesar de haber micelio de *Phytophthora capsici* con evidencias de lisis, algunas hifas estaban casi intactas. También se observó un cambio notable entre los efectos del filtrado madre y las diluciones, ya que las hifas más alteradas se observaron cuando se usó el filtrado no diluido. Cuando se utilizó la dilución 10^{-1} las hifas mostraron mayor daño que cuando se utilizó la 10^{-2} . Al transferir micelio del oomiceto de la zona de inhibición a cajas nuevas de medio de cultivo (Extracto de malta-Agar) se observó crecimiento activo en todos los casos. Estos resultados indican que además de lisis ocurrieron efectos de tipo fungistático.

7.8 Poblaciones de *Trichoderma* spp. en el sustrato de plantas en la fase de vivero

En los dos bioensayos, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada tratamiento varió significativamente con respecto a la cepa, el número de inoculación y la interacción de estas dos variables (Anexo 8); además se observó que a los 14 días después de cada inoculación fue considerablemente menor las UFC que el número de esporas agregado. Sin embargo, todas las cepas incrementaron considerablemente su número de UFC a través del tiempo, pero la máxima cantidad de UFC en el cuarto muestreo no excedió las 300,000 UFC/g suelo. En el sustrato de las plantas testigo no se detectó crecimiento de *Trichoderma* spp. en ninguna de las evaluaciones.

En el bioensayo 1, las mayores poblaciones de *Trichoderma* spp. se observaron en los tratamientos con las cepas nativas de suelo de Tetela de Ocampo no asociadas al cultivo de chile serrano (T-5(2), T4(3) y TP1S1).

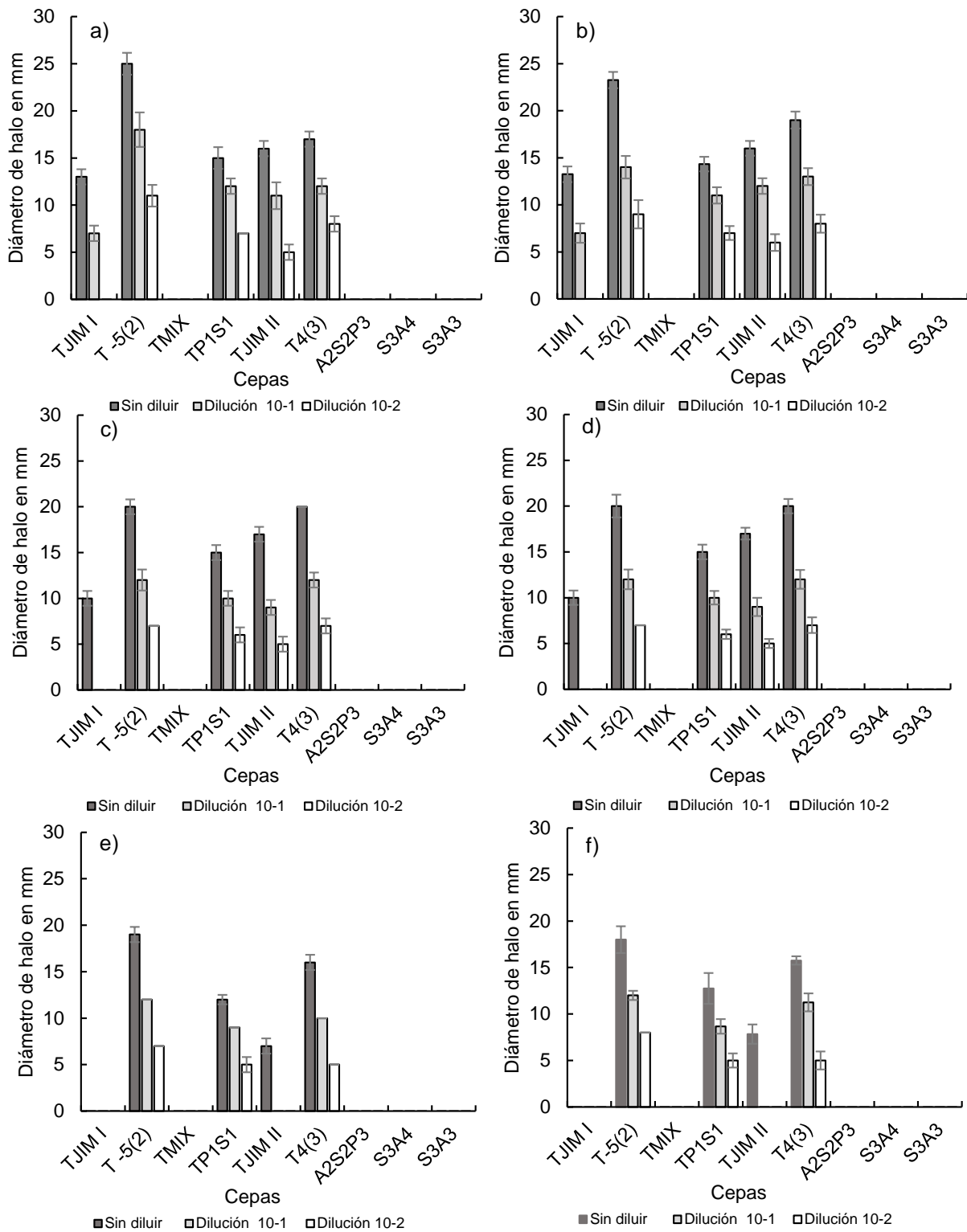


Figura 9. Halo de inhibición de *Phytophthora capsici* (PC-A) ejercido por filtrados de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo de extracto de malta-agar. (a) y (b): Filtrados obtenidos en sustrato a base Trigo (a y b), maíz (b y c) y arroz (d y e). Las gráficas a, c y e) corresponden al Bioensayo 1; b, días y f) corresponden al Bioensayo 2. Las líneas verticales en cada barra indican el error estándar.

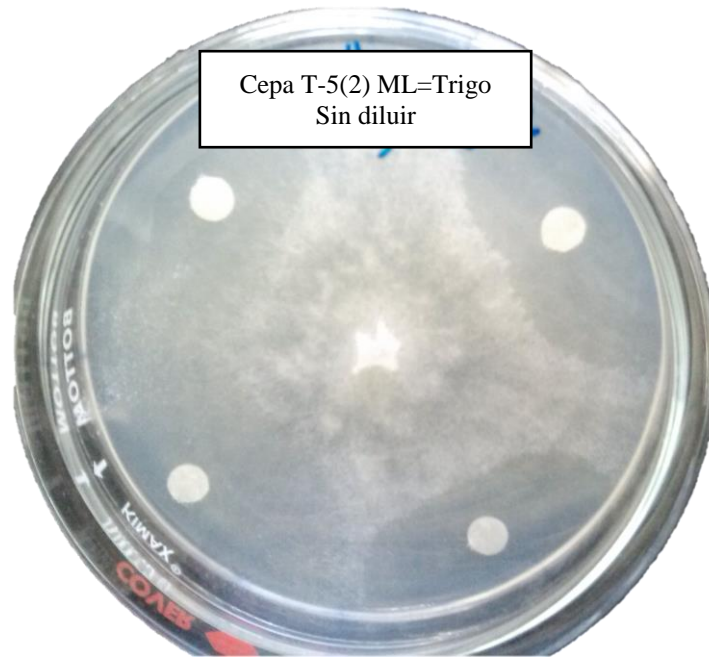


Figura 10. Halos de inhibición en colonia de *Phytophthora capsici* de 8 días de edad, ejercido por filtrado de *Trichoderma* spp. (Cepa T-5(2)). ML= medio líquido a base de trigo. Los discos de papel estéril fueron sumergidos en el filtrado sin diluir y se colocaron a la periferia de la colonia al sexto día de crecimiento del oomiceto (bioensayo 1).

En el primer muestreo se obtuvieron 45,833 unidades formadoras de colonias (UFC/g suelo) para la cepa T-5(2), seguido por T4(3) (41,666) TP1S1 (33,333), A2S2P3 (29,166), TJIM II (25,000), S3A3 (20,833), S3A4 (20,833), TMIX (16,666) y TJIM I (12,500).

En el segundo muestreo la tendencia fue similar en casi todas las cepas; T-5(2) tuvo 112,500 UFC/g suelo, T4(3) 95,833, TP1S1 104,166, A2S2P3 100,000 y TJIM II con 87,500; cabe destacar que en este muestreo la tendencia cambió para la cepa S3A3, ya que solo alcanzó 45,833 UFC/g suelo, mientras que S3A4 tuvo 62,500. Por otro lado TMIX y TJIM I tuvieron 58,333 y 29,166 UFC/g suelo, respectivamente.

En el tercer muestreo, la cepa T4(3) obtuvo el mayor número de UFC/g suelo con 225,000 UFC y superó el valor obtenido por las cepas TP1S1 (200,000), A2S2P3 (195,833) S3A4 (170,833) y T5(2) (154,166) que había tenido los valores más altos en los muestreos previos. Por otra

parte la cepa TJIM II alcanzó 145,833 UFC/g suelo; este valor fue seguido en orden descendente por las cepas TMIX (129,166), S3A3 (125,000) y TJIM I (79,166).

En el cuarto muestreo nuevamente la cepa T4(3) alcanzó el valor más alto con 291,666 UFC/g suelo; este valor fue seguido por las cepas A2S2P3 (250,000), S3A4 (250,000) y TP1S1 (245,833). TJIM II tuvo un valor intermedio (241,666), similar al obtenido por la cepa T-5(2) (237,500 UFC/g suelo), mientras que las cepas S3A3 (195,833 UFC/g suelo), TMIX (175,000 UFC/g suelo) y TJIM I (133,333 UFC/g suelo) tuvieron los valores más bajos.

De forma semejante a lo observado en el bioensayo 1, en el bioensayo 2 las cepas nativas de Tetela de Ocampo, aisladas de suelo no cultivado con chile, alcanzaron el mayor número de UFC. La cepa T-5(2) también alcanzó el mayor número de UFC/g suelo (54,166) en el primer muestreo; este valor fue seguido por TP1S1 (45,833), T4(3) (41,666), A2S2P3 (41,666) TJIM II (33,333) y S3A3 (33,333). Las cepas que acumularon menor cantidad de UFC fueron S3A4 (29,166), TMIX (25,000) y TJIM I (20,833).

En el segundo muestreo se detectaron cambios en la tendencia de algunas cepas. Las cepas T-5(2) (116,666 UFC/g suelo) y T4(3) (108,333 UFC/g suelo), de manera similar a lo observado en el bioensayo 1, tuvieron los valores más altos. Las cepas TJIM II y A2S2P3 tuvieron mayor de población de propágulos (104,166 UFC/g suelo) que en el bioensayo 1. Este valor fue superior al obtenido por TP1S1 (100,000) en este muestreo. Las cepas que tuvieron menor número de UFC/g suelo fueron S3A4 (83,333), TMIX (62,500), S3A3 (54,166) y TJIM I (41,666), pero todas mostraron un incremento con respecto a lo detectado en el primer muestreo.

En el tercer muestreo, al igual que en el bioensayo 1, la cepa T4(3) tuvo el mayor número de UFC/g suelo (283,333), este valor fue mayor a lo alcanzado por TP1S1 (191,666), A2S2P3 (179,166) y T-5(2) (175,000) quien hasta el segundo muestreo había presentado la mayor población. La cepa S3A4 también aumentó sus poblaciones en este muestreo (162,500 UFC/g suelo) respecto a lo observado en el bioensayo 1. Las menores UFC/g suelo fueron obtenidas por las cepas TJIM II (141,666), S3A3 (150,000), TMIX (125,000) y TJIM I (91,666).

En el cuarto muestreo la cepa T4(3) continuó con la misma tendencia mostrada en el bioensayo 1, ya que pudo alcanzar el valor más alto con 291,666 UFC/g suelo, mismo que fue seguido por las cepas TP1S1 (254,166), A2S2P3 (250,000), S3A4 (250,000) y TJIM II (241,666). Por otro lado, las cepas que mantuvieron las poblaciones más bajas fueron T5(2) (220,833 UFC/g suelo), S3A3 (195,833 UFC/g suelo), TMIX (175,000/g suelo UFC) y TJIM I (133,333 UFC/g suelo), pero estos valores fueron considerablemente más altos que los detectados en el primer muestreo.

Cabe resaltar que dos de las tres cepas nativas de Tetela de Ocampo que no fueron aisladas de suelos cultivados con chile (*Capsicum annuum* L.) (T4(3) y TP1S1) tienen mayor potencial para sobrevivir a través del tiempo en el sustrato usado en la fase de charola, (peat moss-agrolita 75/25 v:v) mediante la estrategia de inoculación usada en nuestros bioensayos. A sí mismo cabe señalar que dos cepas asociadas al cultivo (A2S2P3 y S3A4) tuvieron poblaciones relativamente altas, lo que también representó una mayor adaptación al sustrato utilizado que las cepas externas usadas como referencia (TJIM I, TJIM II y TMIX).

7.9 Peso seco de raíz

En ambos bioensayos el análisis de varianza del peso seco de raíz indicó diferencias estadísticamente significativas entre cepas en todos los muestreos (Anexo 9).

Bioensayo 1. A los 15 días después de la primera inoculación con las cepas de *Trichoderma* spp, las plantas de chile inoculadas con la cepa S3A3 tuvieron el mayor peso seco (0.0174 g) (Fig. 11a); este valor fue estadísticamente igual al de los tratamientos S3A4 (0.0118 g), A2S2P3 (0.0102 g), TP1S1 (0.0108 g) y TMIX (0.0102 g) pero resultó estadísticamente diferente del observado con las cepas T-5(2) (0.0104 g), T4(3) (0.0092), TJIM II (0.0086 g) y TJIM I (0.0078 g). Con excepción de S3A3, las medias del resto de tratamientos fueron estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$) al testigo (0.0064 g).

A los 30 días de la primera inoculación y 15 días después de haber realizado la segunda, la biomasa radical fue mayor para el tratamiento S3A3 (0.0227 g) (Fig. 11b), valor que fue estadísticamente igual a la cepa S3A4 (0.019 g), pero esta última fue similar a T-5(2) (0.0142 g) y T4(3) (0.0156 g). A2S2P3 (0.0124), TP1S1 (0.0123), TJIM II (0.0129) y TJIM I (0.0121 g)

resultaron iguales al testigo (0.0092 g).; sólo S3A3, S3A4, y T4(3) resultaron estadísticamente diferentes de este.

A los quince días después de la tercera inoculación (45 días después de la primera), el peso seco radical fue mayor con la cepa S3A3 (0.0249 g) que en el resto de tratamientos (Fig. 11c); sin embargo en esta ocasión hubo un aumento considerable con la cepa A2S2P3 (0.0207 g), lo que dio lugar a que su media resultara estadísticamente igual a S3A3 y S3A4 (0.0221 g). La cepa T4(3) (0.0196 g) fue estadísticamente diferente de S3A3, TJIM I (0.0151 g) y el tratamiento testigo (0.0133 g), quien tuvo el promedio más bajo. TP1S1 (0.0177 g) tuvo un valor menor a S3A3 y mayor que el testigo, pero resultó igual que el resto de cepas. A su vez T5(2) (0.0159), TJIM II (0.0151 g), TMIX (0.0159) y TJIM I resultaron estadísticamente iguales entre sí y el testigo.

El peso seco de la raíz 15 días después de haber realizado la cuarta inoculación (60 días después de la primera) en las plantas inoculadas tuvo un peso significativamente mayor que el testigo (0.0174 g) (Fig. 11d), con excepción de las plantas tratadas con TJIM I (0.0182 g), cuyo valor fue similar a este; sin embargo, el peso de raíz con el resto de cepas (S3A4, 0.0281; A2S2P3, 0.0263 g; T4(3), 0.0260 g; TJIM II, 0.0223 g; TP1S1, 0.0219 g; TMIX, 0.0212 g; T-5(2), 0.0205 g) y S3A3 (0.03 g) no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Bioensayo 2. Los tratamientos inoculados con las cepas nativas acumularon el mayor peso seco en la parte radical (Fig. 12). A 15 días después de la primera inoculación las cepas S3A3 (0.0197 g) y S3A4 (0.017 g) tuvieron los valores más altos, los cuales resultaron estadísticamente diferentes al resto de tratamientos (Fig. 12a). Les siguió en orden decreciente A2S2P3 (0.0106 g), pero su promedio no fue significativamente diferente al de las cepas T-5(2) (0.0106 g), TP1S1 (0.0105 g), T4(3) (0.0088 g), TJIM II (0.0085 g) y TMIX (0.0102 g). TJIM I (0.0073 g), TJIM II y T4(3) resultaron estadísticamente iguales al testigo (0.0066 g).

En el segundo muestreo (30 días después de la primera y 15 días después de la segunda inoculación) las cepas S3A3 y S3A4 indujeron la mayor acumulación de biomasa radical en las plantas de Chile (0.025 y 0.022 g, respectivamente, Fig. 12 b) y sus valores fueron estadísticamente diferentes al resto de tratamientos. El resto de cepas (A2S2P3 (0.016 g);

TP1S1 (0.016 g); T-5(2) (0.014 g); T4(3) (0.014 g); TJIM I (0.013 g); TJIM II (0.013 g) y TMIX (0.012 g)) tuvieron valores estadísticamente iguales entre sí, pero sólo las cepas externas (TJIM I, TMIX, TJIM II) y T5(2) resultaron iguales al testigo (0.010 g).

En el tercer muestreo (45 días después de la primera y 15 días después de la tercera inoculación) se obtuvo la mayor biomasa radical en plantas tratadas con la cepa nativa S3A3 (0.032 g), valor estadísticamente diferente al resto de tratamientos (Fig. 12 c). Este valor fue seguido por S3A4 (0.028 g) quien a su vez fue significativamente diferente del resto de cepas y el testigo. El tercer orden de peso seco de raíz lo ocupó la cepa A2S2P3 (0.022 g), pero su valor no fue estadísticamente diferente de T4(3) (0.020 g) y TP1S1 (0.019 g). TJIM II y T-5(2) tuvieron un valor intermedio (0.018 y 0.017 g), mientras que TMIX (0.016 g) y TJIM I (0.017 g) fueron iguales al testigo (0.013 g).

En el cuarto muestreo (60 días después de la primera inoculación y 15 días después de la cuarta) el mayor peso seco de la raíz fue producido por las plantas tratadas con las cepas nativas asociadas al cultivo. S3A3 (0.041 g) tuvo un valor significativamente más alto que el resto de cepas y el testigo (0.0165g) (Fig. 12d). S3A4 (0.035 g) y A2S2P3 (0.027g) tuvieron valores menores y diferentes entre sí y el tratamiento S3A3; la media de A2S2P3 resultó estadísticamente igual a T4(3) (0.0236 g) y TJIM II (0.0226 g); a su vez estos dos últimos tratamientos tuvieron valores iguales a TP1S1 (0.0219 g), TMIX (0.02) y TJIM I (0.0193 g). Por su parte, TJIM I y TMIX no fueron significativamente diferentes al testigo (0.0165 g).

7.10 Peso seco de la parte aérea

En ambos bioensayos se detectaron diferencias estadísticas significativas en el peso seco de la parte aérea relacionadas con el tipo de cepa de *Trichoderma* spp. (Anexo 10)

Bioensayo 1. A los 15 días después de la primer inoculación con las cepas de *Trichoderma* spp. sólo se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea (PSPA) entre S3A3 (0.0192 g), el testigo (0.0081 g) y T-5(2) (0.0093 g) (Fig. 13a), pero estos dos últimos fueron estadísticamente iguales a TP1S1 (0.0163 g), S3A4 (0.0151 g), A2S2P3 (0.0138 g), T4(3) (0.0105 g), TJIM I (0.0102 g) y TJIM II (0.0099 g).

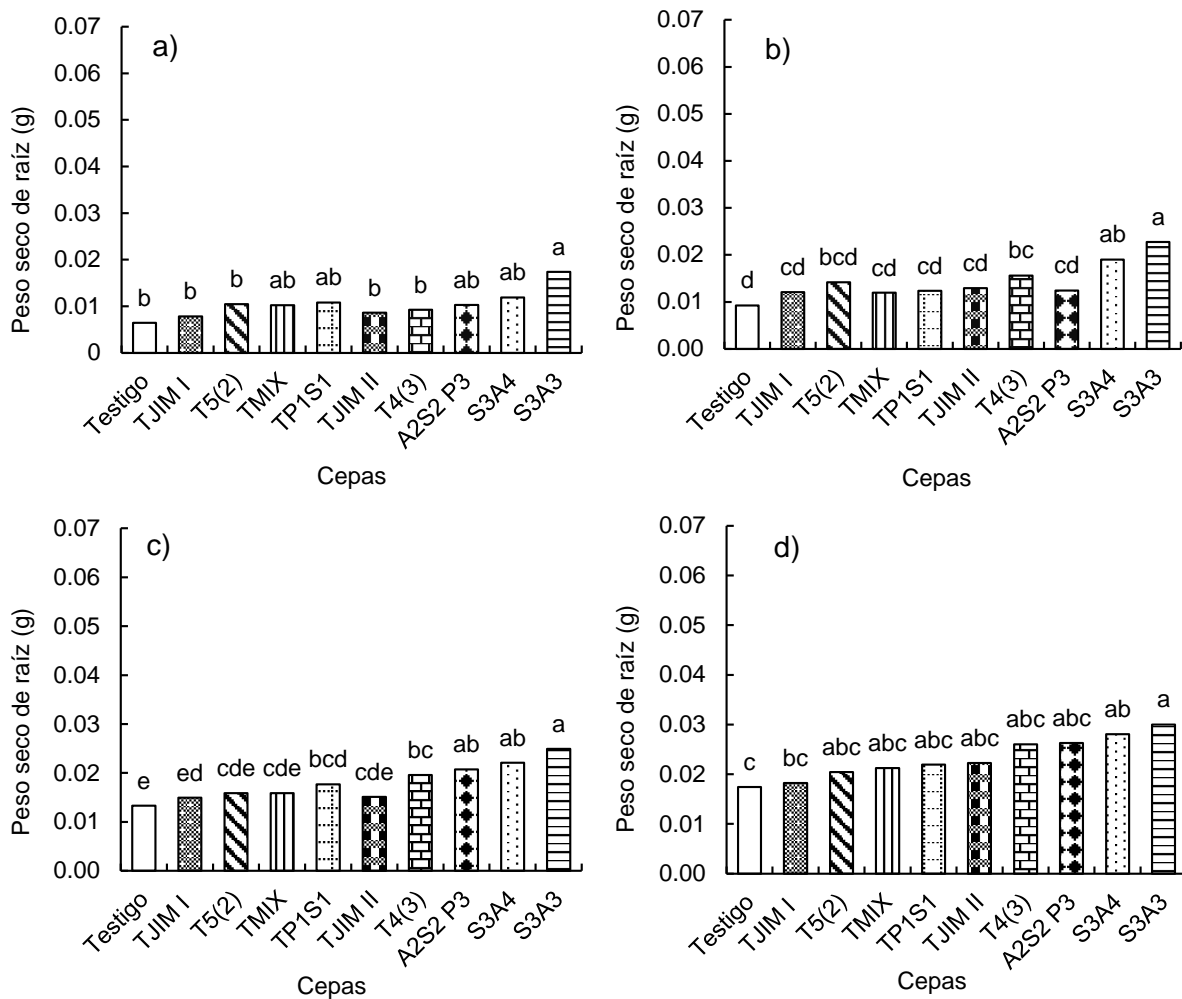


Figura 11. Peso seco de la raíz de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 1. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

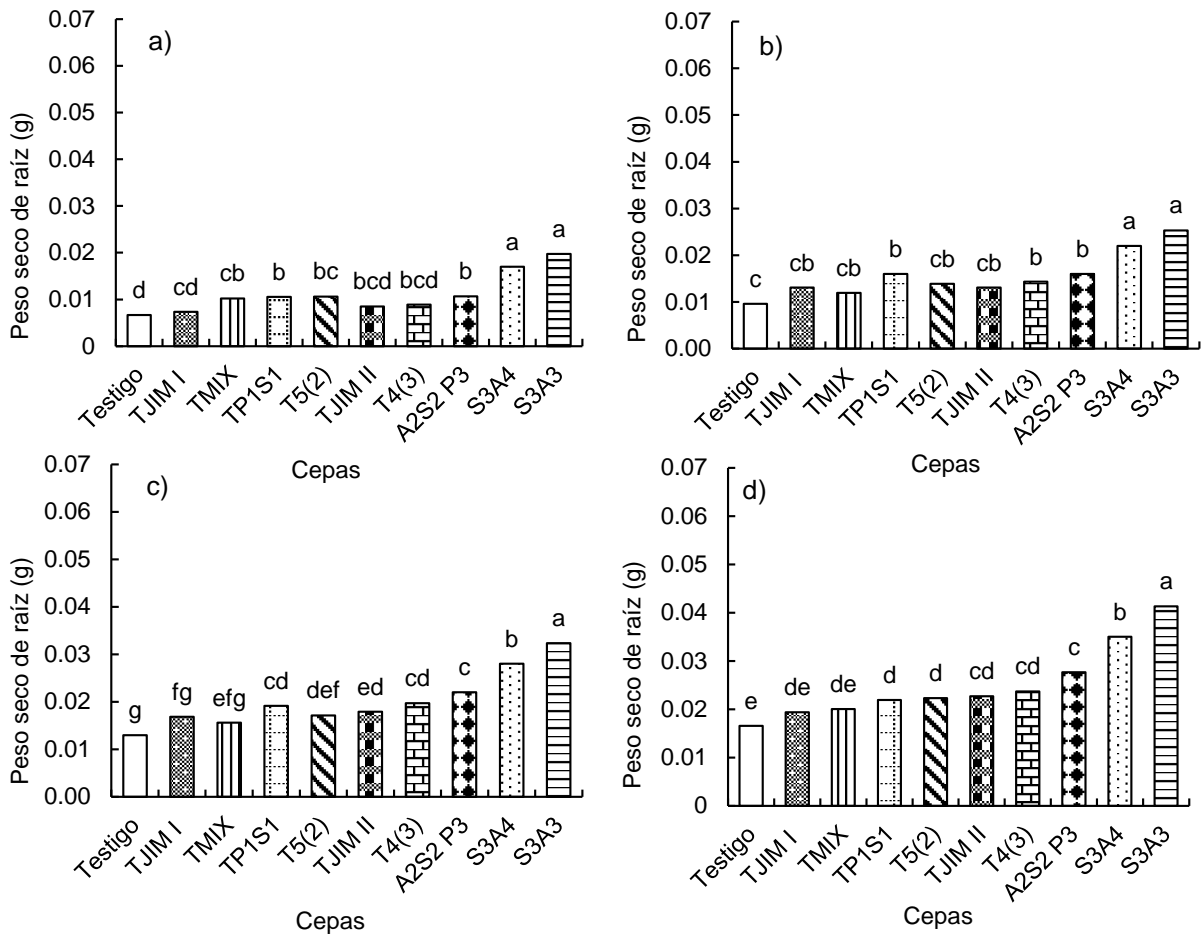


Figura 12. Peso seco de la raíz de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 2. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

A los 30 días de la primera y 15 días posteriores a la segunda inoculación, las plantas de chile aumentaron su PSPA en todos los tratamientos. S3A3 (0.0293 g) (Fig. 13b) nuevamente fue el que tuvo el valor más alto, pero no fue significativamente diferente de S3A4 (0.0273 g), A2S2P3 (0.0254 g), TJIM II (0.0223 g), TJIM I (0.0208 g) y TP1S1 (0.203 g). El tratamiento testigo (0.0121 g) fue estadísticamente igual a los tratamientos TJIM I, TP1S1, TMIX (0.0163 g), T4(3) (0.0156 g) y T-5(2) (0.0157 g).

A los 45 días después de la primera inoculación y 15 días después de la tercera, la cepa S3A3 alcanzó nuevamente el mayor PSPA (0.04 g) (Fig. 13c), pero este valor no fue estadísticamente

diferente de los obtenidos por los tratamientos S3A4 (0.037 g) y A2S2P3 (0.0330 g). Las cepas TP1S1 (0.0299 g), T-5(2) (0.0279 g), T4(3) (0.0267 g), TJIM II (0.0249 g) y TJIM I (0.0245 g) indujeron valores estadísticamente iguales entre sí, pero significativamente menores a lo observado con S3A3. Los únicos tratamientos iguales al testigo (0.0197 g) fueron las cepas externas (TJIM I, TJIM II y TMIX(0.0264)) y la cepa nativa T4(3). En esta evaluación las cepas TJIM I y TJIM II disminuyeron drásticamente su incremento en PSPA con respecto al muestreo previo, a diferencia de lo observado en la segunda evaluación con respecto a la primera.

En la última evaluación (60 días después de la primera inoculación y 15 días después de la cuarta) las cepas nativas asociadas al cultivo de chile fueron las que más estimularon el crecimiento de las plantas (Fig. 13d). S3A3 tuvo 0.0577 g, S3A4 0.0504 g, A2S2P3 0.0496 g, T4(3) (0.0464 g); estos valores fueron estadísticamente iguales. La cepa TJIM II tuvo un PSPA menor (0.0368 g) pero este resultado estadísticamente igual T4(3). Este tratamiento a su vez tuvo un PSPA igual al de las cepas TP1S1 (0.0319 g), TMIX (0.0296 g), T-5(2) (0.0299 g) y TJIM I (0.0290 g) y el testigo (0.0275 g).

Bioensayo 2. Todas las cepas incluyendo el testigo obtuvieron valores más altos que lo observado en el primer bioensayo; este aumento estuvo relacionado con los 15 días de ventaja entre un bioensayo y otro; sin embargo la dinámica en general en el aumento del peso seco no mostró cambios relevantes entre bioensayos (Fig. 14a). Las tres cepas nativas asociadas al cultivo estimularon un mayor PSPA en las plantas de chile. S3A3 (0.0289 g) fue estadísticamente diferente a todas las cepas (Fig. 13 a). S3A4 (.0248 g), aunque con un promedio menor, también tuvo diferencias significativas con todas. A2S2P3 (0.185 g) obtuvo un valor estadísticamente similar a T-5(2) y TP1S1 (0.0173 g). Por otro lado, T4(3) (0.0143 g), TMIX (0.013 g) y TJIM I (0.0125 g) tuvieron valores más bajos pero similares. Sólo TJIM II (0.0104 g) resultó igual que el testigo (0.008 g).

Treinta días después de la primera y 15 días después de la segunda inoculación de *Trichoderma* spp., el mayor peso seco de la parte aérea fue obtenido con los tratamientos S3A3 (0.0364 g) y S3A4 (0.0341 g) (Fig. 14b). A2S2P3 (0.0271 g), TP1S1 (0.0243 g) y T-5(2)(0.0230 g) tuvieron valores

menores y estadísticamente iguales entre sí. A su vez las cepas TMIX (0.0185 g), TJIM I (0.0216 g), T4(3) (0.0207 g) y TJIMII (0.0193 g) tuvieron PSPA aún más bajos pero iguales entre sí. Cabe destacar que todas las cepas indujeron pesos significativamente mayores que el testigo (0.0133 g).

Quince días después de la tercera inoculación (45 días posteriores a la primera inoculación) el tratamiento inoculado con S3A3 (0.0487 g) tuvo un PSPA significativamente más alto que el resto de tratamientos (Fig. 14c). Les siguió con un valor más bajo la cepa nativa S3A4 (0.0436 g) y A2S2P3 (0.0325 g), pero esta última se comportó de manera semejante a TP1S1 (0.0327 g), T4(3) (0.0312) y T-5(2) (0.0295 g). Por otra parte las cepas externas TMIX (0.0247 g), TJIM I (0.0263 g) y TJIM II (0.0259 g), no obstante que obtuvieron valores aún más bajos y fueron estadísticamente iguales entre sí, resultaron significativamente diferentes al testigo (0.0208 g).

En el cuarto muestreo (15 días después de la cuarta inoculación y 60 días después de la primera) las cepas nativas indujeron el mayor PSPA en las plantas de chile (S3A3 0.0655 g; S3A4 0.0581 g y A2S2P3 0.0496 g), pero S3A3 tuvo valores significativamente más altos que todas las demás cepas y el testigo (Fig. 14d). Aunque las otras dos cepas (S3A4 y A2S2P3) a su vez resultaron diferentes de las restantes. Estos valores fueron seguidos por las cepas nativas no asociadas al cultivo T4(3) (0.0421 g), TP1S1 (0.0377 g) y T-5(2) (0.0363 g) que tuvieron promedios estadísticamente iguales. Sólo las cepas TJIM II (0.0325 g), TJIM I (0.0318 g) y TMIX (0.03 g) resultaron iguales al testigo (0.0281 g).

7.11 Experimentos en suelo, con plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* y *Trichoderma* spp.

7.11.1 Área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS). Aunque los datos de severidad de la marchitez son reportados en las Figs. 16 y 17, las diferencias estadísticas entre tratamientos son reportadas con base en el análisis del ABCPS (Fig. 18)

Los análisis de varianza para el ABCPS indicaron diferencias significativas entre tratamientos (Anexo 11), pero la preinoculación con *Trichoderma* spp. en vivero o la reinoculación de las

mismas al suelo después del trasplante, no evitó la aparición de síntomas de marchitez (Figs. 16, 17 y 18) por *P. capsici*. No obstante que en los dos bioensayos los niveles de enfermedad fueron más altos en los testigos sin *Trichoderma* pero con *P. capsici* (TsueCP y TsusCP), en el bioensayo 1, sólo las cepas S3A3 y TP1S1 tuvieron áreas bajo la curva significativamente menores a éstos (Fig. 18a), mientras que las demás cepas, aunque redujeron el nivel de enfermedad, resultaron estadísticamente iguales a uno o ambos testigos. En el bioensayo 2 se observó un patrón similar, donde los testigos antes mencionados tuvieron los mayores niveles de enfermedad, pero en este caso las cepas S3A3, TP1S1, TJIMII sin reinoculación de *Trichoderma* spp. al suelo y S3A4 con reinoculación, tuvieron ABCPS significativamente menores a ambos testigos (Fig. 18b). El resto de cepas, aunque también redujo la cantidad de enfermedad produjo valores estadísticamente iguales a uno o ambos testigos.

Resalta el caso de la cepa S3A3, quien mostró consistentemente los valores más bajos de enfermedad en ambos experimentos y su promedio resultó incluso estadísticamente menor que el de las cepas T-5(2)R en el bioensayo 1 y a T-5(2), T-5(2)R, A2S2P3 en el bioensayo 2.

Por otra parte, la reinoculación al suelo después del trasplante con TMIX, TP1S1 y S3A4 en el bioensayo 1 y TMIX, TP1S1, S3A4 y A2S2P3 en el bioensayo 2, produjo valores de ABCPS numéricamente más bajos que sus respectivos tratamientos sin reinoculación, pero en el caso de las cepas TJIM I, T-5(2), TJIM II, T4(3), A2S2P3 y S3A3 en bioensayo 1 y TJIM I, T-5(2), TJIM II, T4(3) y S3A3 en el bioensayo 2, se observó un efecto contrario; sin embargo estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas para la cepa S3A3 en el bioensayo 2, al grado de que la reinoculación con S3A3 causó que el ABCPS en este tratamiento no tuviera diferencias estadísticas con cualquiera de los testigos (TsueCP y TsusCP), ni con el resto de cepas. Cabe también señalar que en ambos bioensayos los testigo sin *P. capsici* y sin *Trichoderma* spp. (TsueSP y TsusSP) no mostraron síntomas de enfermedad

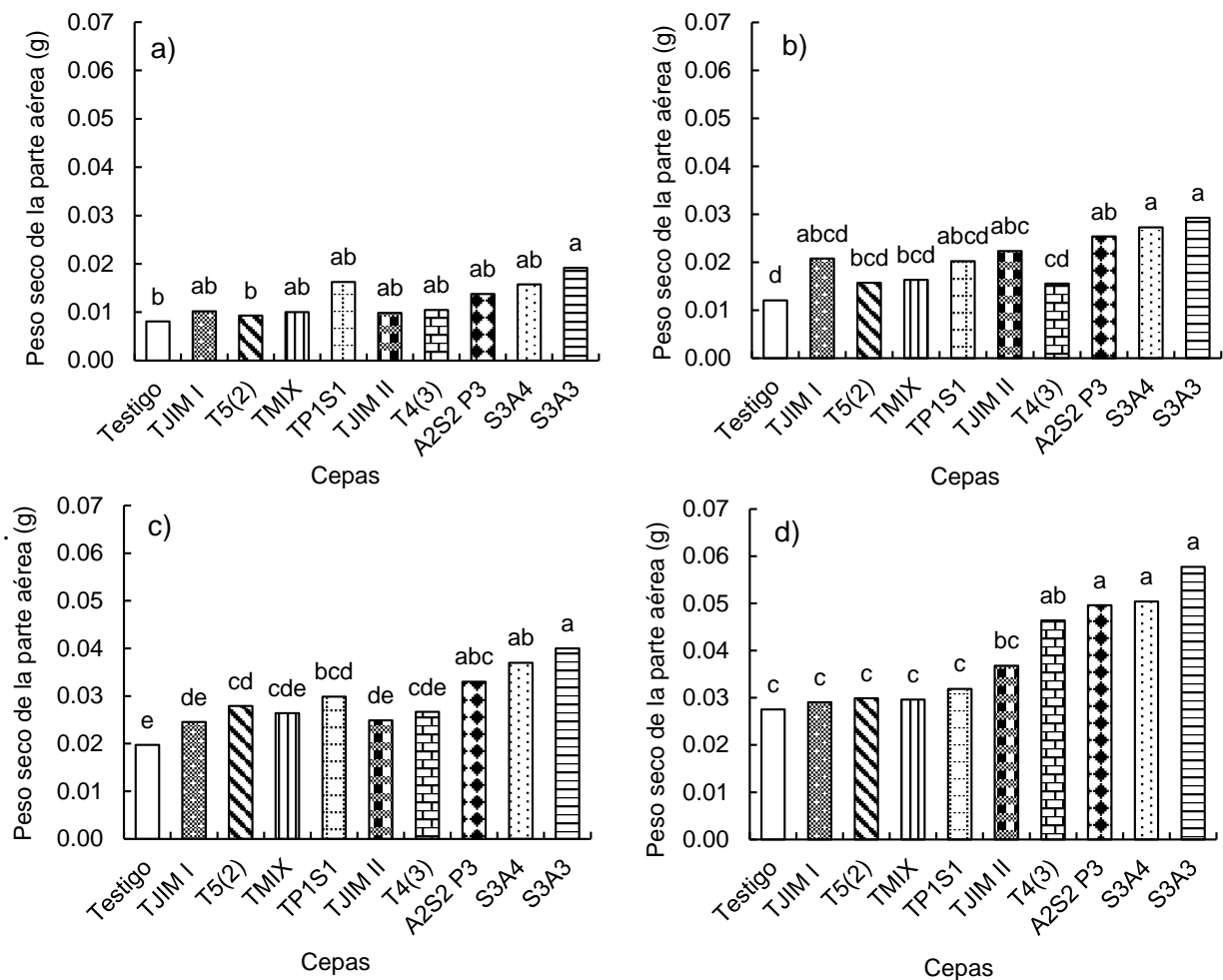


Figura 13. Peso seco de la parte aérea de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 2. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

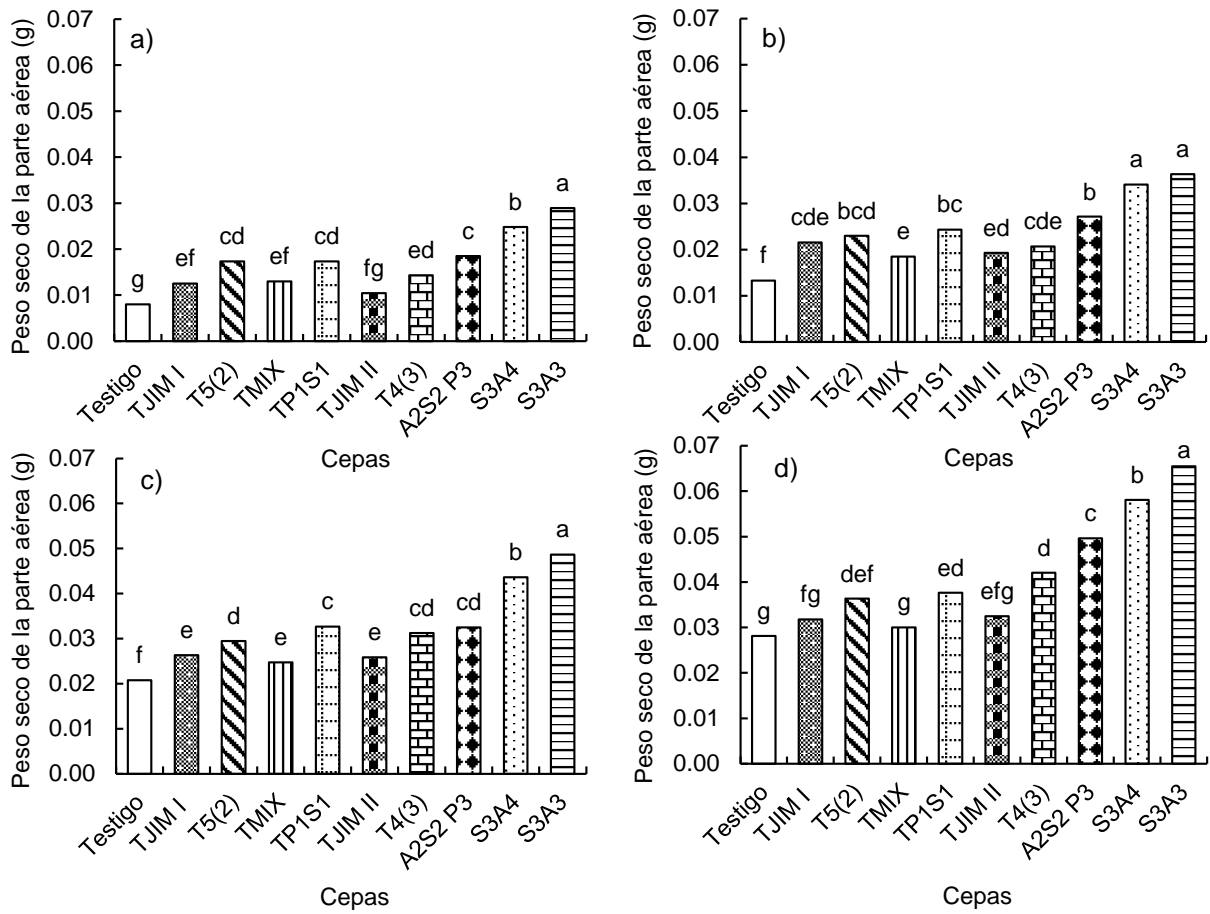


Figura 14. Peso seco de la parte aérea de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo, a diferentes días de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el bioensayo 2. a)= 15 días después de la primera inoculación y 35 días después de la siembra, b) 15 días después de la segunda inoculación y 50 días después de la siembra, c) 15 días después de la tercera inoculación y 65 días después de la siembra, d) 15 días después de la cuarta inoculación y 75 días después de la siembra. Cada barra representa el promedio de 4 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

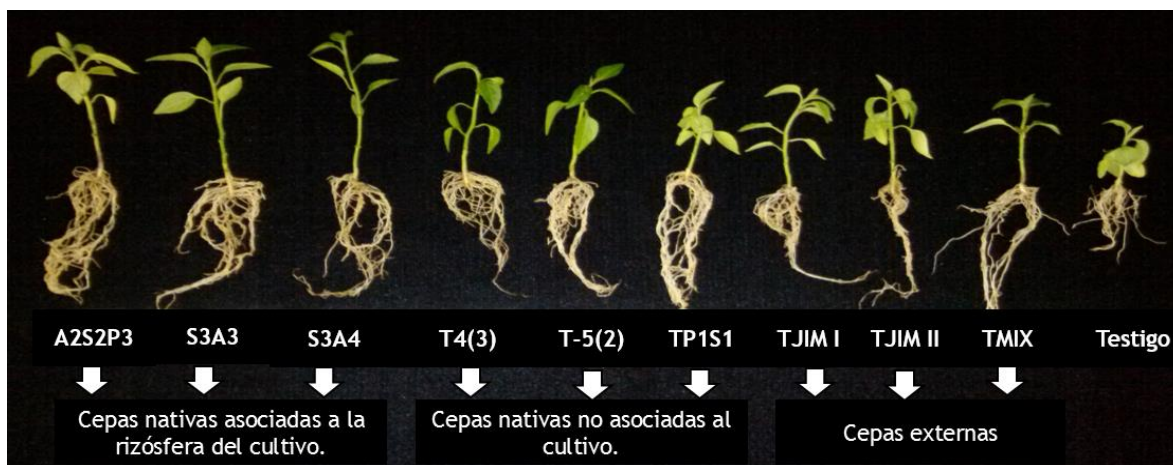


Figura 15. Biomasa de la raíz y de la parte aérea de plantas de chile (*Capsicum annum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo cultivadas en sustrato de Peat moss-perlita expandida (75/25 v:v), a los 15 días después de la inoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y 50 días después de la siembra del chile.

7.11.2 Número acumulado de plantas muertas

En el Bioensayo 1, la muerte de plantas se observó hasta el sexto día después de la inoculación con oomiceto. En el tratamiento testigo TsusCP murieron 5 plantas mientras que en TsueCP únicamente una, al igual que en TJIMIIR. Los tratamientos restantes no presentaron mortalidad (Fig. 19)

En el Bioensayo 2, al tercer día después de la inoculación se observó la muerte de 1 individuo en TsueCP y 2 en TsusCP. Al sexto día (6 Ddi) después de la inoculación hubo mayor mortalidad en los testigos TsusCP (4) y TsusCP (6); no obstante también ocurrió muerte de plantas en TJIMIR (1) y TJIMIIR (2). Los demás tratamientos permanecieron sin cambios al igual que los testigos no inoculados (Fig. 20).

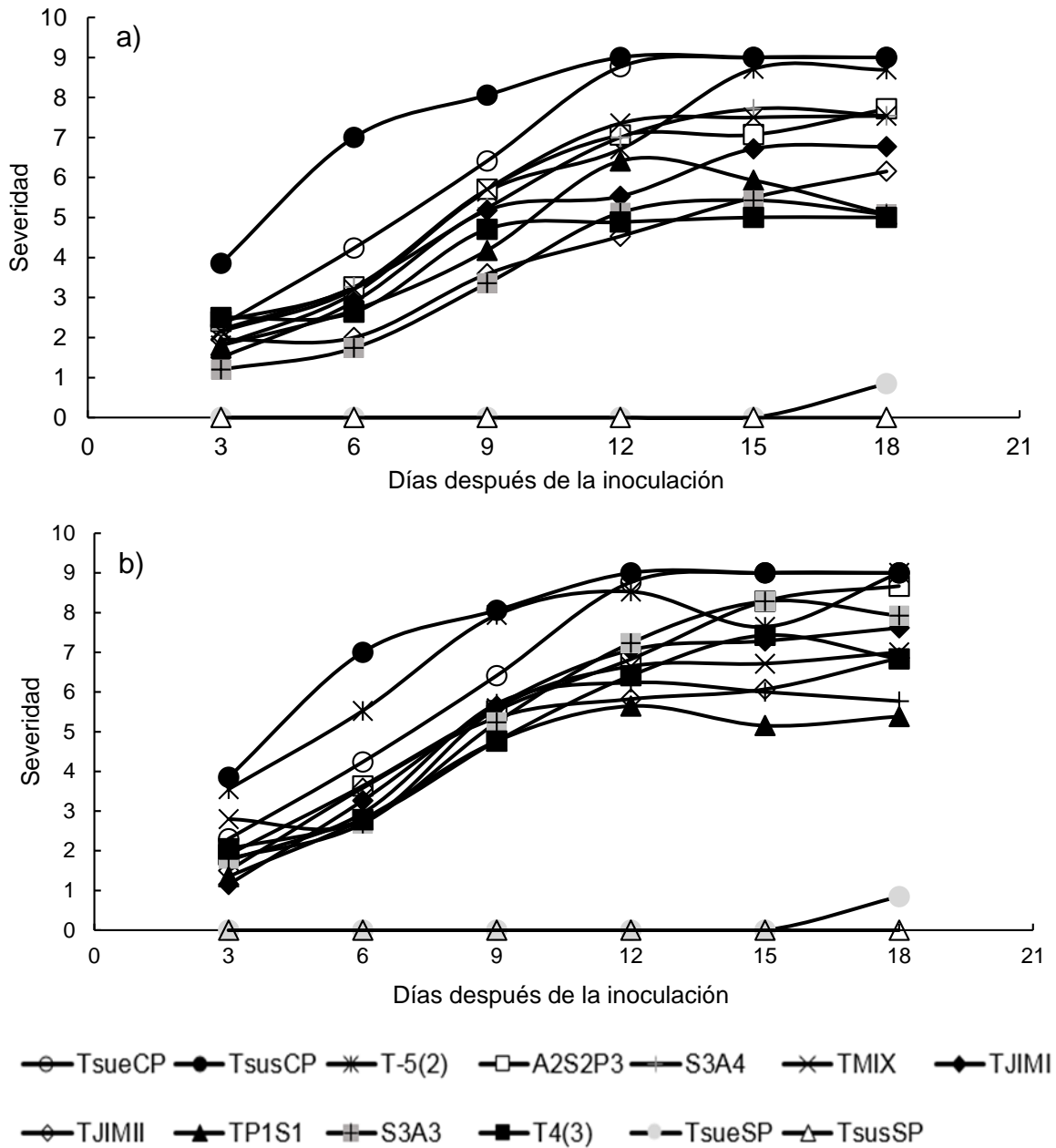


Figura 16. Severidad de la marchitez (Moran *et al.*, 2010) de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas 15 días, después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 1. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad.

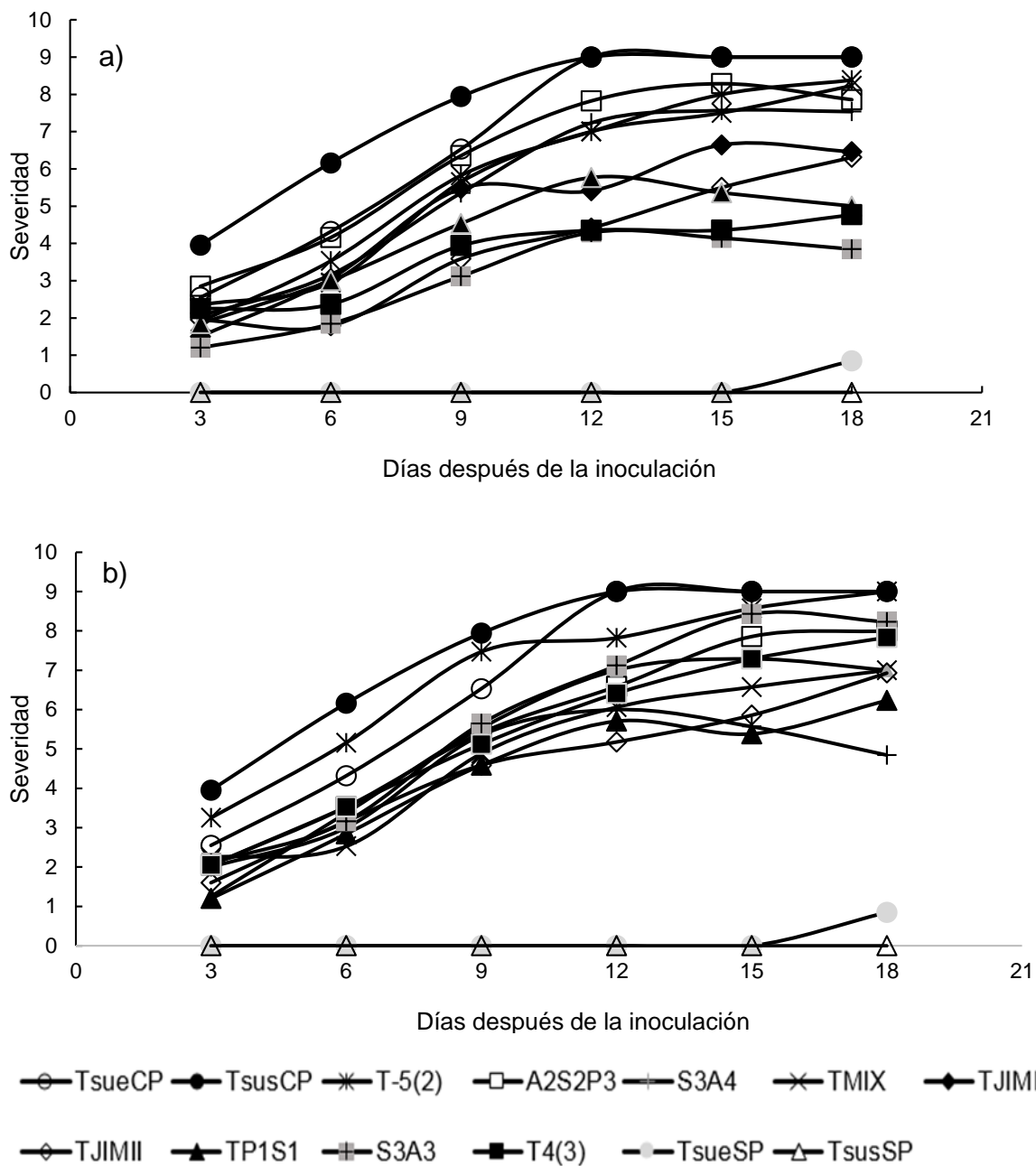
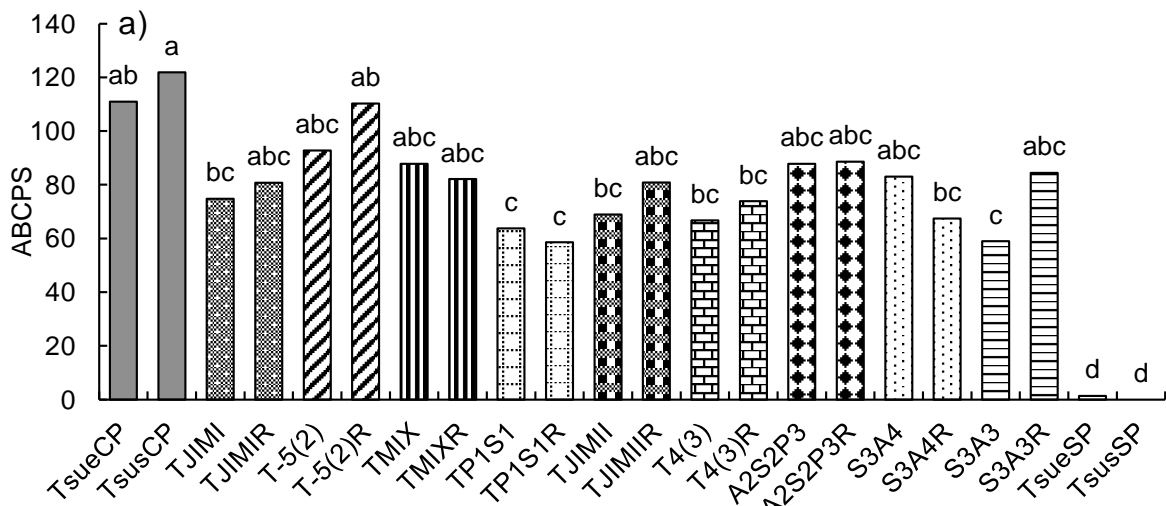
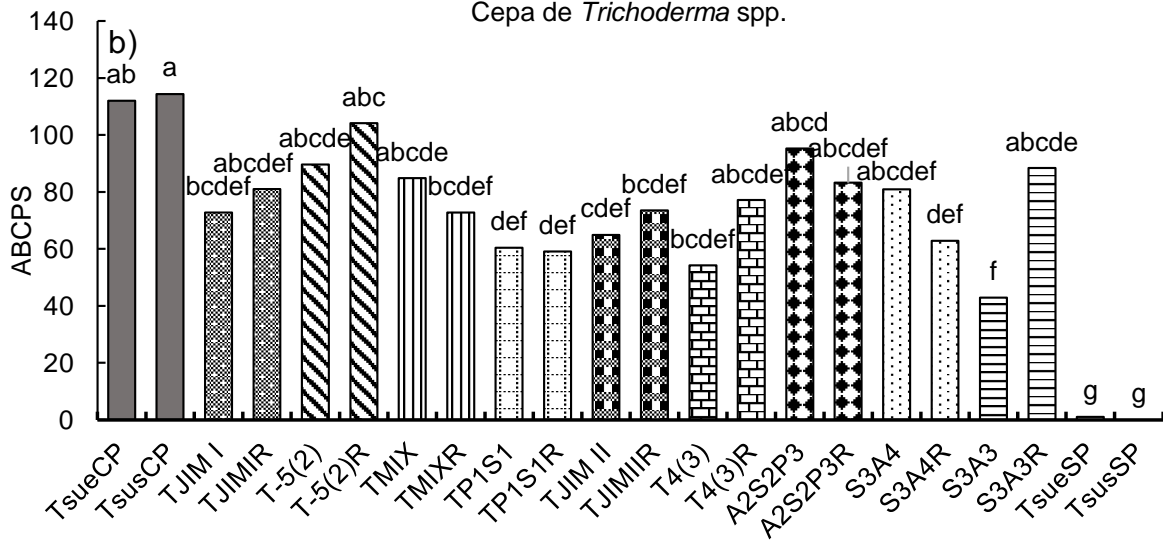


Figura 17. Severidad de la marchitez (Moran *et al.*, 2010) de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas, 15 días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). bioensayo 2. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad.



Cepa de *Trichoderma* spp.



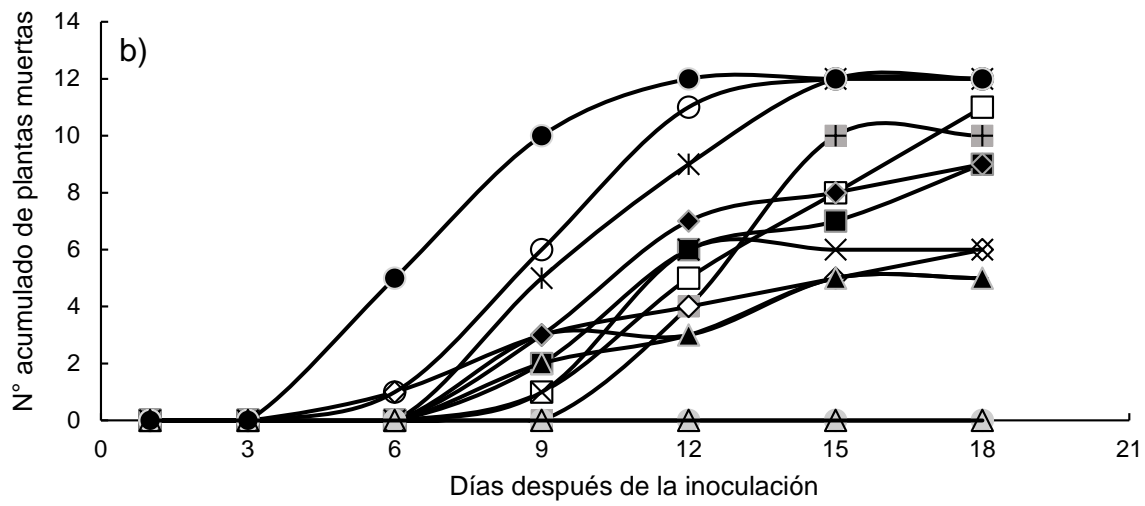
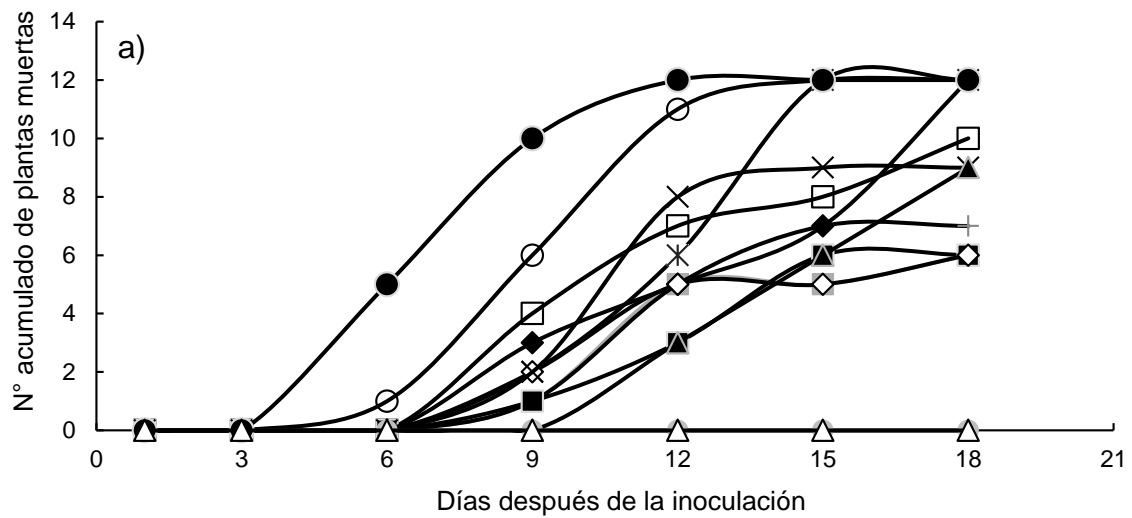
Cepa de *Trichoderma* spp.

Figura 18. Área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS) de la marchitez de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., trasplantadas a suelo natural de la misma localidad e inoculadas con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici*, 15 días después del trasplante, en plantas pretratadas con, o sin, alguna cepa de *Trichoderma* spp. a) Bioensayo 1. b) Bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.5$). Las cepas de *Trichoderma* spp con una R al final indican que fueron reinoculadas (1×10^6 esporas) al tercer día después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v).

Al analizar los datos del área bajo la curva del número acumulado de plantas muertas (ABCPM), tomando los valores de cada bioensayo como si fuesen repeticiones, el análisis de varianza correspondiente indicó diferencias significativas entre tratamientos (Anexo 12). Las ABCPM de las plantas tratadas con TMIXR (35.25), TP1S1 (32.25), TP1S1R (33.75) y S3A3 (22.5) fueron las únicas que tuvieron medias estadísticamente diferentes a los testigos sin *Trichoderma* y con *P. capsici* (Fig. 21); esto indica que hubo tres veces menos mortalidad con estas cepas que en los testigos. Después de estos T-5(2)R (85.5) y A2S2P3 (73.5) tuvieron los valores más altos de ABCPM. Estas dos últimas cepas a su vez fueron seguidos de T-5(2) (72), TJIMIR (66.75), TMIX (66), TJIM I (59.25), TJIMIIR (57) y T4(3)R (57) que lograron valores significativamente iguales entre sí y con ambos testigos (TsusCP y TsueCP). Por otra parte TJIM II (42), S3A3R (54.75), A2S2P3R (51.75), S3A4 (50.25) y S3A4R (37.5) tuvieron valores estadísticamente iguales a TsueCP pero no a TsusCP. Cabe señalar que en los testigos sin *Trichoderma* y sin *P. capsici* el ABCPM tuvo un valor de cero.

7.11.3 Presencia de *Phytophthora capsici* en las raíces

En ambos bioensayos se observó la presencia del oomiceto a partir del tercer día de su inoculación. La detección fue confirmada en todos los tratamientos donde se inoculó con *P. capsici* hasta el término del experimento (18 días después de la inoculación). En todos los tratamientos a excepción de los testigos no inoculados con *P. capsici* (TsueCP y TsusCP) se formaron abundantes esporangios sobre las secciones de raíz (algunos con crecimiento de forma simpodial); también se formaron hifas largas y algodonosas, micelio hialino, ramificado de diámetros variados y no toruloso; en algunos casos se observaron engrosamientos. Los esporangios se produjeron de tamaño y formas variables, entre los cuales predominaron los de tipo obpiriformes y ovoides. En algunos casos las papilas fueron prominentes, además de que se detectaron bipapilados y tripapilados con largos pedicelos persistentes, simétricos o a veces asimétricos.



- TsueCP ● TsusCP ✱ T-5(2) □ A2S2P3 + S3A4 ✕ TMIX ◆ TJIMI
- ◇ TJIMII ▲ TP1S1 ▣ S3A3 ■ T4(3) ◐ TsueSP △ TsusSP

Figura 19. Número acumulado de plantas muertas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas, 15 días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 1. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad.

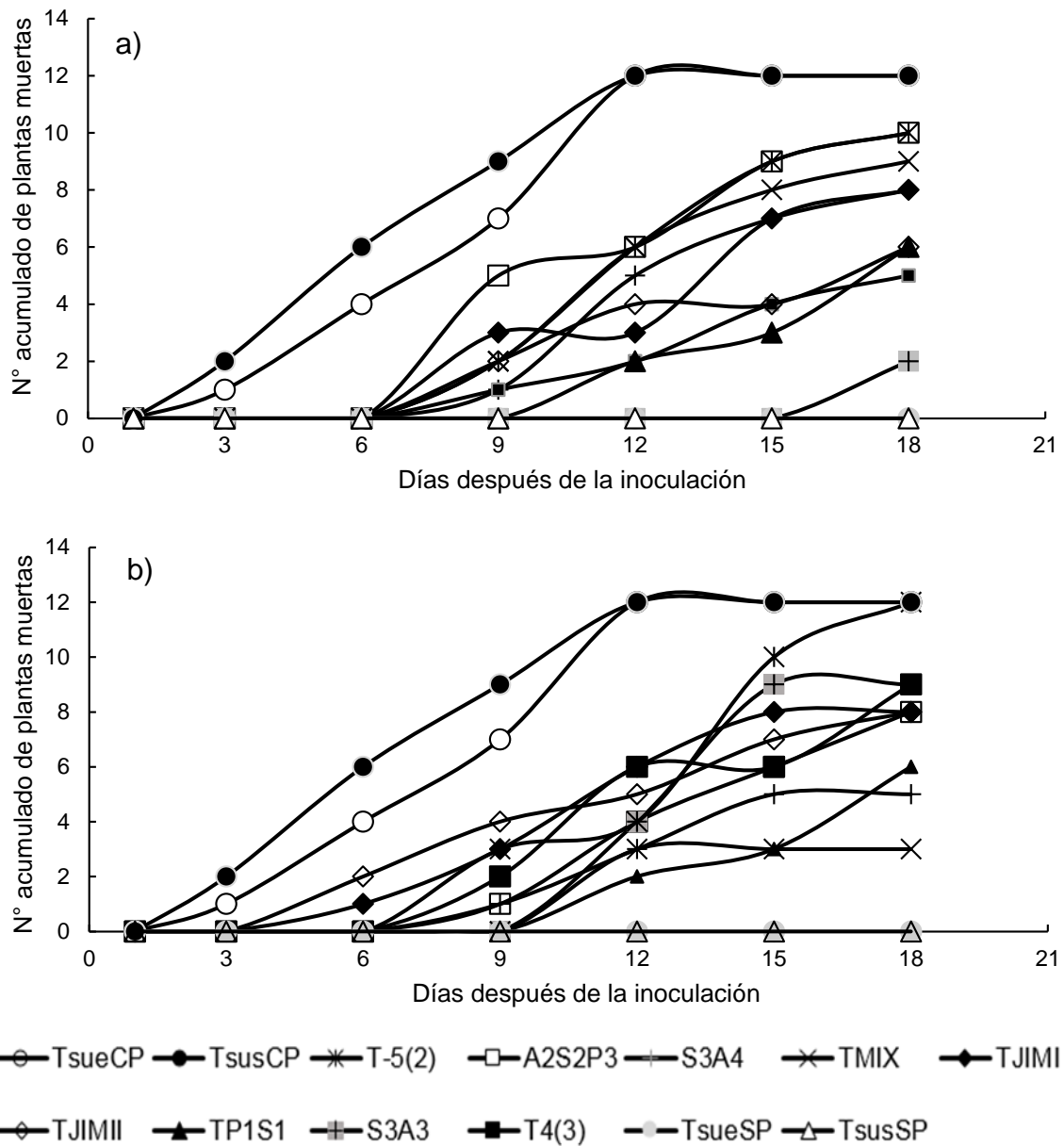


Figura 20. Número acumulado de plantas muertas en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue., inoculadas con 6×10^5 zoosporas, 15 días después del trasplante con *Phytophthora capsici* (PC-A). Bioensayo 2. a) Plantas preinoculadas con *Trichoderma* spp. en sustrato peat moss-perlita (75:25 v/v) en etapa de vivero y trasplantadas a suelo. b) Plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en vivero más una reinoculación de las mismas al tercer día del trasplante en suelo natural de la misma localidad.

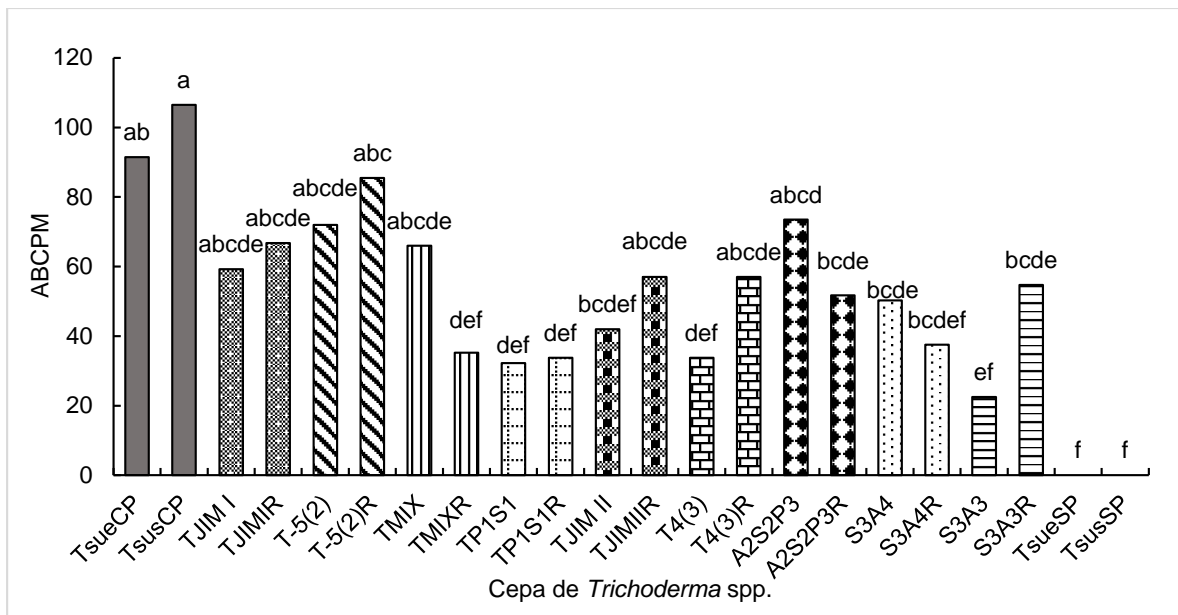


Figura 21. ABCPM= Área bajo la curva del número de plantas muertas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican una reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas) tres días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa a el promedio de 2 repeticiones (1 por cada bioensayo) a los 45 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 48 días después del trasplante. Barras con diferente letra indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

7.11.4 Presencia de *Trichoderma* sp. en las raíces

El análisis de varianza para el número de raíces con *Trichoderma* spp. en ambos bioensayos indicó diferencias significativas (Anexo 13). En ambos bioensayos destacan los tratamientos S3A3, T4(3), TP1S1, TP1S1R, TJIMII y S3A4R quienes obtuvieron mayor número de raíces con presencia de *Trichoderma* spp. y obtuvieron diferencias significativas con los demás. Por el contrario, las cepas T5(2) y A2S2P3 (con o sin reinoculación) tuvieron el menor número de raíces con presencia de *Trichoderma* spp. Cabe señalar que en los cuatro testigos sin *Trichoderma* spp. (TsueCP, TsusCP, TsueSP y TsusSP) no se observaron colonias de dicho hongo.

En el Bioensayo 1, el mayor número de raíces colonizadas con *Trichoderma* spp. se obtuvo en S3A3 (10), TP1S1 (10), TP1S1R (10), T4(3) (9.75), TJIMII (9.5) y S3A4R (9.25) (Fig.22 a), quienes obtuvieron valores estadísticamente iguales entre sí, pero no de T4(3) (7.5), TJIMIIR (6.75), TJIMI (6.75) y TJIMIR (6.75) los cuales no fueron significativamente diferentes entre sí. Estos valores fueron seguidos por TMIXR (5.25) quien resultó estadísticamente diferente de todas las cepas. Por su parte S3A4 (3.25), S3A3R (3) y TMIX (3) colonizaron menor cantidad de raíces, pero la menor colonización se obtuvo con A2S2P3 (2) T-5(2) (1.5), T-5(2)R (1.5) y A2S2P3R (1.25) quienes fueron iguales estadísticamente, pero sólo A2S2P3R fue igual a los testigos (TsueCP, TsusCP, TsueSP y TsusSP).

En el Bioensayo 2, al igual que en el bioensayo 1, los mayores niveles de colonización con *Trichoderma* sp. se observaron en los tratamientos S3A3 (9.75), TP1S1R (9.75), TP1S1 (9.5), T4(3) (9.5), TJIMII (9) y S3A4R (9.25) (Fig. 22b) quienes a su vez fueron estadísticamente iguales entre sí. Estos valores fueron seguidos por T4(3)R (8) que fue significativamente igual a TP1S1, TJIMII, T4(3), S3A4R y TJIM I (6.75) pero no de TJIMIIR (6.25), TMIXR (5.75) y TJIMIR (5.75) quienes junto con TJIM I no fueron estadísticamente diferentes. Valores con menos del 35% de presencia se obtuvieron con S3A4 (3.5), TMIX (3.25), S3A3R (3) y A2S2P3 (2.25), pero la menor frecuencia de este hongo se observó con A2S2P3 (2.25), A2S2P3R (1.5) T-5(2) (1.25) y T-5(2)R (1) que además de que fueron estadísticamente iguales entre sí, todas, con excepción de A2S2P3 fueron iguales a los testigos (TsueCP, TsusCP, TsueSP y TsusSP).

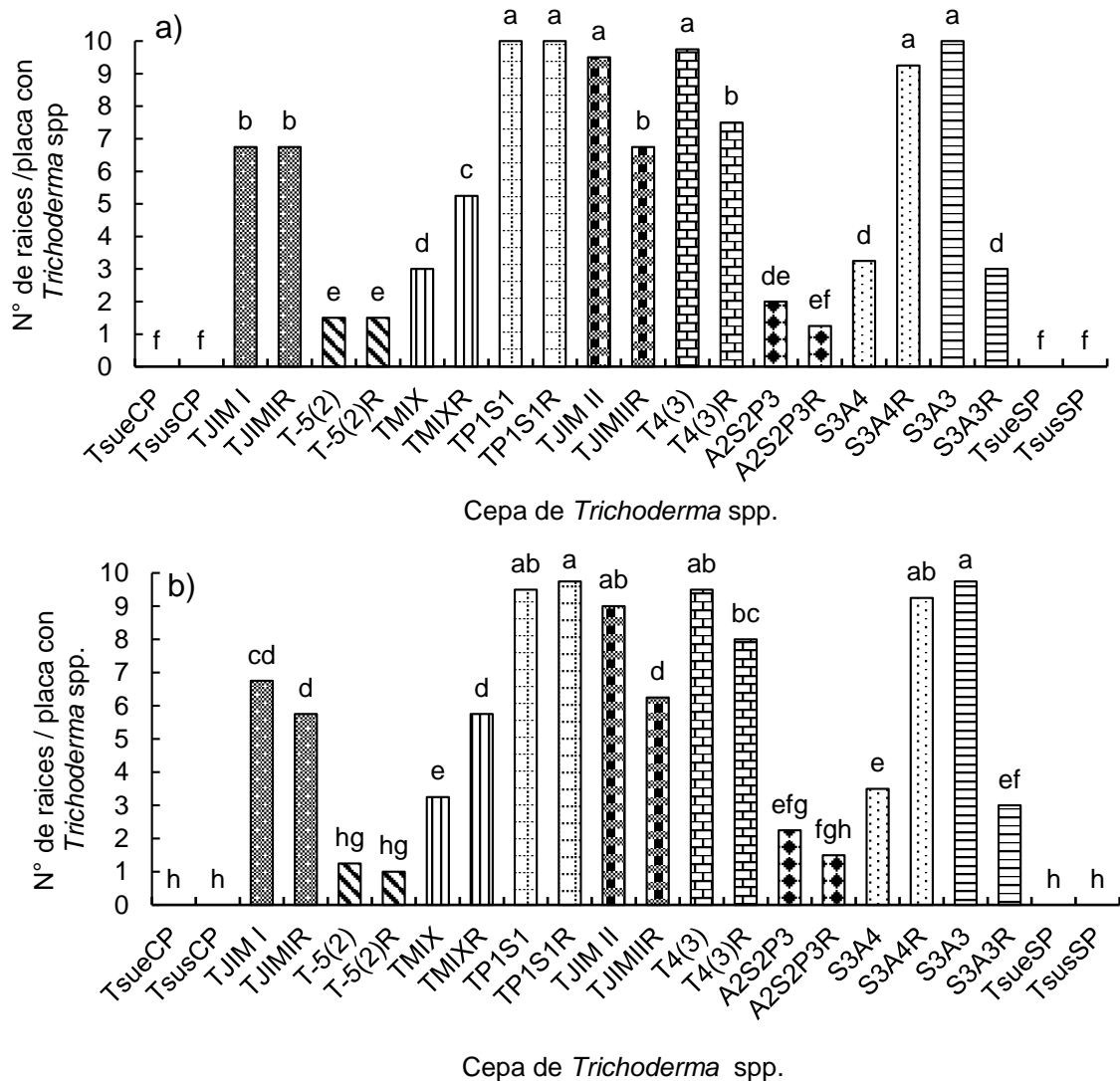


Figura 22. Número de raíces de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Pue con presencia de *Trichoderma* spp a 18 días después del trasplante en suelo de la misma localidad. Cada barra es el promedio de cuatro repeticiones, cada una con diez segmentos de raíz (0.5 cm) por caja de Petri cultivados en Extracto de Malta Agar enriquecido con ácido láctico (1 mL/L) e incubadas a 26 °C, a seis días de la siembra. Las cepas con la letra “R” indican reinoculación con *Trichoderma* (1×10^6 esporas, tres días después del trasplante). En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici*. a) Bioensayo 1. b) Bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.5$). TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v).

7.11.5 Unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* spp.

El análisis de varianza de las unidades formadoras de colonias en suelo mostró diferencias altamente significativas para ambos bioensayos (Anexo 14). Dichas diferencias dependieron tanto del tipo de cepa utilizada como del tratamiento (con o sin reinoculación en suelo tres días después del trasplante).

En el bioensayo 1, el mayor número de UFC fue obtenido con T4(3)R (140,315 / g), TP1S1R (132, 517 / g), TP1S1 (108, 632 / g) y TMIXR (103, 108 / g) (Fig. 23a) , los cuales no variaron estadísticamente; así mismo TP1S1, TMIXR obtuvieron valores significativamente iguales a T4(3) (99, 426 / g). Por su parte este último no tuvo diferencias estadísticamente significativas con T-5(2)R (75,490 / g), T-5(2) (66, 284 / g), S3A4R (58, 919 / g), S3A3 (58, 919 / g), TMIX (57, 078 / g), A2S2P3R (49,713 / g), S3A3R (49,713 / g), (TJIMIIR (48,872 / g), A2S2P3 (46,030 / g), TJIM II (46,030 / g), S3A4 (42,348 / g), TJIMIR (34983 / g) y TJIM I (31301 / g) quienes a su vez fueron iguales; sin embargo los valores de TJIM I y TJIMIR fueron los únicos estadísticamente iguales a los cuatro testigos (TsueCP, TsusCP, TsueSP y TsusSP) donde no se obtuvieron colonias.

En el bioensayo 2, los tratamientos T4(3)R (128,885 / g), TP1S1R (121, 520 / g), TP1S1 (115, 996 / g), TMIXR (106,790 /g), T4(3) (104, 949 / g), T-5(2)R (93, 902 / g) y T-5(2) (86, 537 / g) (Fig. 23b), obtuvieron el mayor valor de UFC, los cuales no variaron estadísticamente; sin embargo TMIXR, T-5(2) y T-5(2)R fueron significativamente iguales de S3A3 (81, 013 / g), S3A4R (71, 807 / g) y TJIMIR (66,284 / g) quienes obtuvieron valores más bajos pero que no fueron diferentes estadísticamente. Este último fue seguido por TMIX (51,254 / g), TJIMIIR (51,254 / g) y S3A3R (51,254 / g), los cuales obtuvieron UFC con valores intermedios que resultaron diferentes significativamente de los cuatro testigos (TsueCP, TsusCP, TsueSP y TsusSP) donde no se obtuvieron colonias, pero fueron iguales a A2S2P3 (40,507 / g), S3A4 (40,507 / g), A2S2P3R (33,142 / g), TJIM I (27,618 / g) y TJIM II (23,936 / g), que no fueron diferentes significativamente a estos.

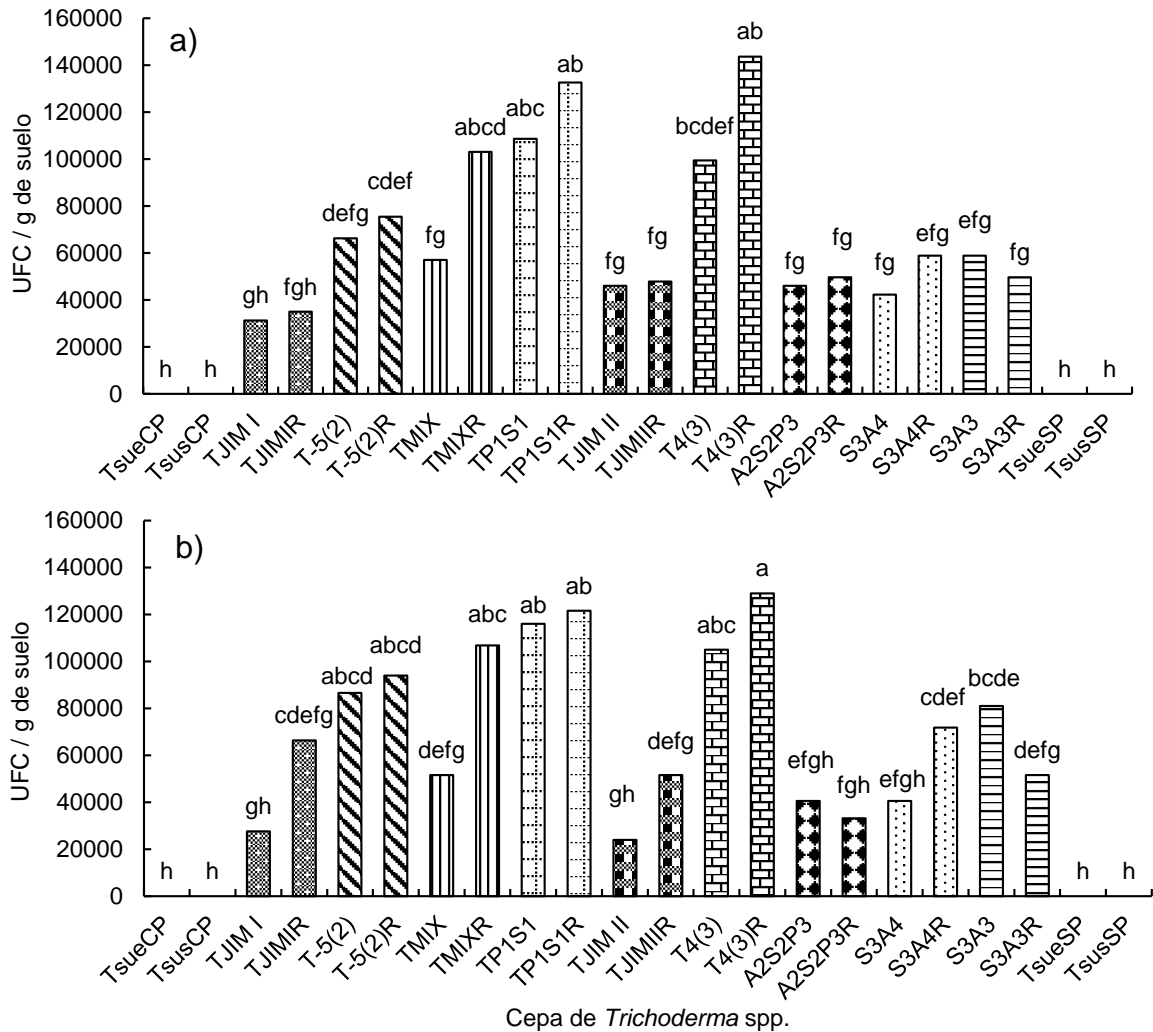


Figura 23. UFC= Unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* spp. / g de suelo en plantas de Chile cv. criollo de Tetela de Ocampo. A excepción de los tratamientos testigo todas las plantas fueron inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican una reinoculación adicional en suelo (1×10^6 , esporas) tres días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa a el promedio de 4 repeticiones a los 45 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 48 días después del trasplante. a) bioensayo 1; b) bioensayo 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

7.11.6 Peso seco de raíz y de parte aérea

El análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas entre tratamientos para ambos bioensayos, en todas las evaluaciones realizadas y en ambas partes de las plantas (Anexos 15 y 16). En términos generales el peso seco de raíz y de parte aérea de la planta presentó un comportamiento similar en ambos bioensayos.

7.11.6.1 Peso seco de raíz

Bioensayo 1. El mayor peso seco de raíz a los 15 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 18 días después del trasplante se observó en las plantas tratadas con S3A3R (0.055 g), TMIXR (0.047 g) S3A3 (0.042 g) T4(3)R (0.045 g) TJIMIIR (0.042 g) y T-5(2)R (0.041 g) los cuales obtuvieron valores estadísticamente iguales entre sí (Fig. 24a). A excepción de T-5(2)R, estos valores fueron diferentes de los grupos testigo TsueSP (0.031 g), TsueCP (0.025 g), TsusSP (0.25 g) y TsusCP (0.024 g). S3A4 (0.046 g), TJIM I (0.038 g), T-5(2) (0.039 g), TMIX (0.038 g), T4(3) (0.037 g), TJIMIR (0.035), A2S2P3 (0.034 g), A2S2P3R (0.034 g), TP1S1 (0.029 g) y TJIMII (0.028 g) indujeron valores intermedios que no fueron estadísticamente diferentes de los testigos, pero sí de S3A3R.

A los treinta días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante el mayor peso seco se obtuvo con TsueSP (0.071 g), TsusSP (0.064 g), TJIMIR (0.07 g), TMIX (0.055 g), T-5(2) (0.053 g), T4(3)R (0.053 g), TJIM II (0.048 g), TJIM I (0.044 g), S3A4R (0.037 g) T-5(2)R (0.031 g), S3A3 (0.030 g) y TsueCP (0.028 g) que fueron iguales estadísticamente (Fig 24b). Por otro lado TP1S1 (0.024 g) A2S2P3 (0.021 g), TsusCP (0.021 g), A2S2P3R (0.024 g), S3A4 (0.022 g), S3A3R (0.019 g), T4(3) (0.019 g) TMIXR (0.013 g), TP1S1R (0.015 g) y TJIMIIR (0.014 g) tuvieron valores más bajos, y estadísticamente iguales entre sí y de los demás tratamientos, con excepción de TsueSP y TJIMIR que obtuvieron los valores más altos.

Cuarenta y cinco días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante los testigos TsusSP (0.183 g) y TsueSP (0.131 g) (Fig. 24c) fueron los de mayor acumulación de biomasa y a su vez fueron estadísticamente diferentes de la mayoría de tratamientos; sin embargo S3A3 (0.107 g) y TP1S1R (0.107 g) fueron significativamente iguales a TsueSP, TJIMI (0.048 g), T-5(2) (0.044 g), TMIXR (0.046 g) TJIM II (0.046 g) S3A4R (0.046 g) y TJIMIR (0.038 g), pero diferentes de TsusSP y el resto de tratamientos. Por otra parte la menor biomasa acumulada en

la raíz se obtuvo en TMIX (0.014 g), T4(3)R (0.030 g), T-5(2)R (0.016 g), TP1S1 (0.032 g) A2S2P3 (0.026 g), A2S2P3R (0.018 g), S3A4 (0.028 g), S3A3R (0.034 g), T4(3) (0.030 g) y TJIMIIR (0.034 g), los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí y a los tratamientos testigo TsusCP y TsusSP, quienes no acumularon biomasa.

En el bioensayo 2, a los 15 días después de la reinoculación de *Trichoderma* spp. y 18 días después del trasplante, el peso seco de la parte radical fue mayor en todas las cepas a lo alcanzado en el bioensayo 1, debido a los 15 días de diferencia entre un bioensayo y otro. El tratamiento S3A3 obtuvo el mayor desarrollo de la raíz al acumular 0.058 g (Fig. 25a); este valor fue estadísticamente igual al obtenido en TMIXR (0.050 g), S3A4R (0.048 g), T4(3)R (0.047 g), TJIMIIR (0.046 g), S3A3R (0.045 g), T-5(2)R (0.044 g) y T5(2) (0.042), quienes no variaron significativamente entre sí. Los testigos TsueCP (0.028 g), TsusSP (0.028 g) y TsusCP (0.026 g) acumularon el menor peso seco; dichos valores fueron estadísticamente iguales a TP1S1R (0.041 g), TMIX (0.041 g), T4(3) (0.040 g), TJIM I (0.040 g), S3A4 (0.040 g), (0.040 g), TJIM IR (0.038 g), A2S2P3 (0.037 g), A2S2P3R (0.037 g) TsueSP (0.033 g), TP1S1 (0.031 g) y TJIM II (0.030 g) quienes no fueron diferentes entre sí. Cabe señalar que los únicos tratamientos para esta evaluación que tuvieron diferencias significativas con los cuatro testigos, fueron S3A3 y TMIXR.

A los treinta días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante, el efecto de inoculación de *P. capsici* fue evidente, ya que los testigos con *P. capsici* sin *Trichoderma* spp. tuvieron menor peso seco, por lo que el mayor peso seco obtuvo en TsueSP (0.073 g) y TJIMIR (0.073 g) (Fig. 25b); estos valores fueron significativamente iguales a lo alcanzado TsusSP (0.066 g), TMIX (0.058 g), T4(3) (0.056 g), T-5(2) (0.054 g), TJIM II (0.051 g), TJIM I (0.047 g), S3A4R (0.040 g), T-5(2)R (0.034 g), S3A3 (0.033 g) y TsueCP (0.031 g) pero fueron diferentes de A2S2P3R (0.027 g), TP1S1 (0.027 g), T4(3) (0.022 g), A2S2P3 (0.024), S3A4 (0.025 g), S3A3R (0.022 g), TP1S1R (0.017 g) y TMIXR (0.016 g) los cuales obtuvieron valores significativamente iguales.

Cuarenta y cinco días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante el mayor peso seco de raíz se obtuvo con TsusSP (0.186 g) y TsueSP (0.134 g) (Fig. 25c) quienes fueron iguales estadísticamente. Estos valores fueron seguidos por S3A3 (0.11 g) y TP1S1R (0.11 g) los cuales no fueron diferentes significativamente de TsueSP, TJIMI (0.050 g), TMIXR (0.049

g), S3A4R (0.049 g), TJIM II (0.048 g) y T-5(2) (0.047 g) que no variaron estadísticamente entre sí y fueron iguales a TJIMIR (0.041 g), pero diferentes de T-5(2)R (0.018 g), TMIX (0.016 g), T4(3)R (0.036 g), TP1S1 (0.035 g) A2S2P3 (0.029 g), A2S2P3R (0.021 g), S3A4 (0.031 g), S3A3R (0.037 g), T4(3) (0.033 g) y TJIMIIR (0.037 g) quienes fueron estadísticamente iguales entre sí y los tratamientos testigo (TsusCP y TsueCP), que no acumularon biomasa.

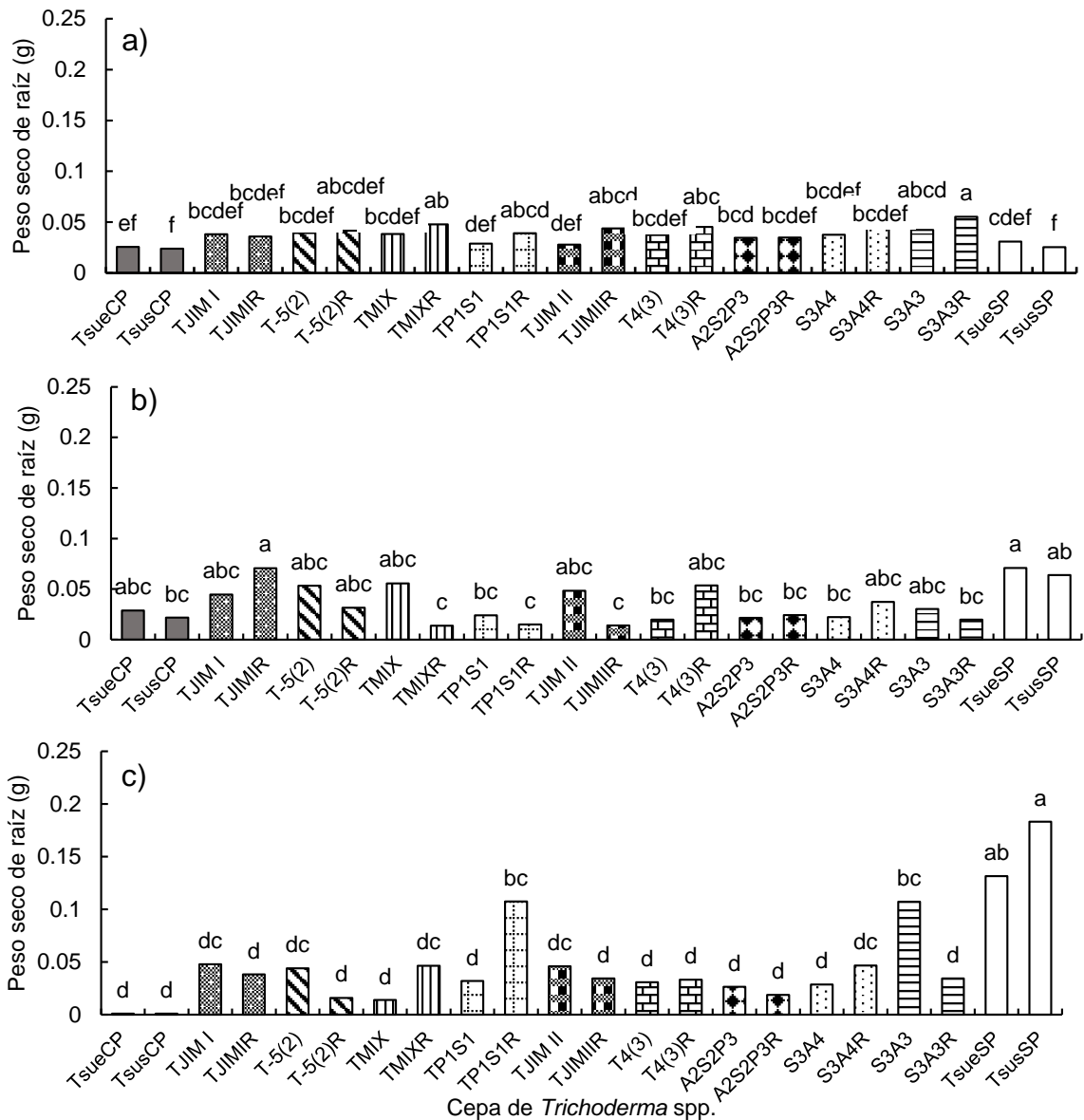


Figura 24. Peso seco de la raíz de plantas de Chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 1, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a) = 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP = Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

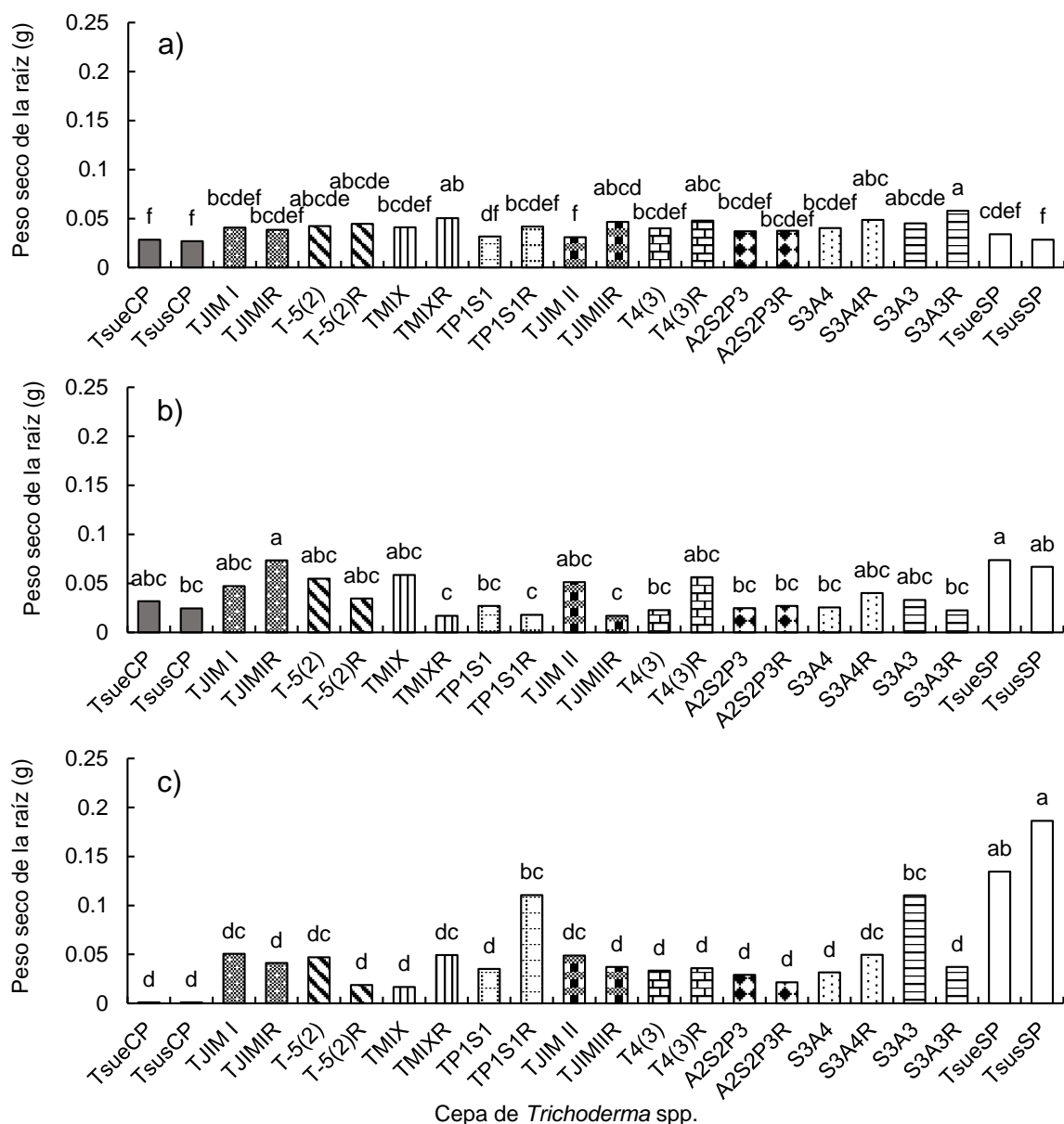


Figura 25. Peso seco de la raíz de plantas de Chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 2, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a)= 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp. en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

7.11.6.2 Peso seco de la parte aérea

En el bioensayo 1, el peso seco de la parte aérea a los 15 días de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 18 días del trasplante, fue mayor en S3A3R (0.123 g). Este peso fue estadísticamente igual a T-5(2)R (0.095 g) (Fig. 26a). Estos valores fueron significativamente diferentes de TJMIR (0.065 g), A2S2P3 (0.064 g), TJIM I (0.57 g) TsueSP (0.050 g), TJIMII (0.048 g), TsueCP (0.045 g), TsusSP (0.044 g) y TsusCP (0.038 g), los cuales no variaron significativamente y acumularon menor peso. Por otro lado S3A3 (0.092 g), S3A4R (0.091 g) TP1S1R (0.087), T5(2) (0.084 g), A2S2P3R (0.079 g), T4(3) (0.077 g), S3A4 (0.076 g), TMIXR (0.075 g), TJIMIIR (0.073 g) T4(3)R (0.073 g), TP1S1 (0.068 g) y TMIX (0.037 g) obtuvieron valores intermedios que sólo fueron significativamente iguales entre sí, pero diferentes de S3A3R, TsusSP, TsueCP y TsusCP.

A los treinta días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 33 días después del trasplante, el efecto de inoculación de *P. capsici* fue evidente, ya que los testigos (TsueCP y TsusCP) obtuvieron el menor peso seco (Fig. 26b); sin embargo el incremento de biomasa de la parte aérea no fue afectada cuando se utilizaron los tratamientos T4(3)R (0.196 g), TJMIR (0.183 g) y T5(2) (0.169 g), quienes fueron los únicos que resultaron estadísticamente diferentes de los testigos sin *Trichoderma* spp. y con *P. capsici* (TsueCP (0.052 g) y TsusCP (0.038 g)). Por otra parte TsueSP (0.145 g), T5(2)R (0.13 g) TJIM I (0.129 g), TJIMII (0.116 g), S3A4R (0.112 g), TsusSP (0.111 g), TMIXR (0.102 g), TP1S1 (0.102 g), A2S2P3R (0.101 g), S3A3R (0.93 g), TMIX (0.090 g) S3A3 (0.089 g), TJIMIIR (0.086 g), A2S2P3 (0.079 g), S3A4 (0.077 g), TP1S1R (0.076 g), y T4(3) (0.057 g), obtuvieron valores intermedios que no variaron significativamente a ninguno de los tratamientos.

Cuarenta y cinco días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante el mayor peso seco se obtuvo con S3A3 (0.231 g), TP1S1R (0.201 g), TsueSP (0.199 g), T-5(2) (0.187 g), T4(3) (0.184 g), TsusSP (0.183 g) TJIMI (0.178 g), S3A4R (0.162 g) y S3A3R (0.147 g), quienes fueron iguales estadísticamente, pero obtuvieron diferencias significativas con los testigos (TsueCP y TsusCP), los cuales a consecuencia de su muerte posterior a la inoculación de *P. capsici* no obtuvieron valor de peso (Fig. 26c). Cabe destacar que S3A3 fue el único tratamiento que resultó diferente significativamente de TMIX (0.081 g) y TJIM II (0.084), que acumularon el menor peso seco. Por otra parte TP1S1 (0.139 g), TMIXR (0.136 g), A2S2P3R

(0.129 g), TJMIR (0.125 g), T-5(2)R (0.125 g), T4(3)R (0.124 g), TJIMIIR (0.123 g), A2S2P3 (0.118 g), TJIM II (0.084 g) y TMIX (0.081 g) acumularon valores intermedios que resultaron estadísticamente iguales entre sí y de los demás tratamientos.

En el bioensayo 2, el peso seco de la parte aérea a los 15 días de la reinoculación de *Trichoderma* spp. y 18 días del trasplante, fue mayor que en lo presentado al bioensayo 1, debido a los 15 días de diferencia entre uno y otro bioensayo. El mayor peso seco se obtuvo con S3A3R (0.129 g) (Fig. 27a), el cual sólo fue estadísticamente igual a T-5(2)R (0.101 g); este valor resultó significativamente igual a S3A3 (0.098 g), S3A4R (0.097 g), TP1S1R (0.092) y T5(2) (0.090 g) los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí, pero no de los testigos TsueSP (0.056 g), TsueCP (0.047 g), TsusSP (0.050 g) y TsusCP (0.044 g) los cuales acumularon el peso más bajo; estos testigos a su vez fueron significativamente iguales a A2S2P3 (0.070 g), TJIM I (0.66 g) y TJIMII (0.054 g), que no fueron significativamente diferentes entre sí, ni tampoco de A2S2P3R (0.085 g), T4(3) (0.083 g), T4(3)R (0.083 g), S3A4 (0.082 g), TMIXR (0.081 g), TMIX (0.079 g), TJIMIIR (0.079 g), TP1S1 (0.074 g) y TJMIR (0.071 g) que acumularon valores intermedios estadísticamente iguales entre sí y con uno o más testigos.

Al igual que en el bioensayo 1, a los treinta días después de la reinoculación de *Trichoderma* spp. y 33 días después del trasplante, el efecto de inoculación de *P. capsici* también fue evidente, ya que los testigos (TsueCP (0.058 g) y TsusCP (0.044 g)) obtuvieron el menor peso seco (Fig. 27b) ; sin embargo el incremento de biomasa de la parte aérea no fue afectada cuando se utilizaron los tratamientos T4(3)R (0.202 g) y TJMIR (0.189 g) quienes alcanzaron el mayor peso seco para esta evaluación y obtuvieron diferencias significativas con T4(3) (0.063 g), TsueCP y TsusCP. Por otra parte T5(2) (0.175 g), TsueSP (0.151 g), T5(2)R (0.136 g) TJIM I (0.135 g), TJIMII (0.122 g), S3A4R (0.118 g), TsusSP (0.117 g), TMIXR (0.108 g), TP1S1 (0.107 g), A2S2P3R (0.107 g), S3A3R (0.98 g), TMIX (0.096 g) S3A3 (0.095 g), TJIMIIR (0.092 g), A2S2P3 (0.085 g), S3A4 (0.083 g) y TP1S1R (0.082 g) acumularon valores intermedios que no variaron significativamente a ninguno de los tratamientos.

Cuarenta y cinco días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante el mayor peso seco se obtuvo con S3A3 (0.237 g), TP1S1R (0.201 g), T-5(2) (0.193 g), T4(3) (0.190 g) y TJIMI (0.178 g) (Fig. 27c), los cuales no tuvieron diferencias estadísticas entre ellos, pero sí

con TJIM II (0.090), TMIX (0.087 g) y los testigos (TsueCP y TsusSP) quienes acumularon la menor biomasa. Por otra parte TsueSP (0.205 g), TsusSP (0.189 g), S3A4R (0.168 g), S3A3R (0.153 g), TP1S1 (0.145 g), TMIXR (0.142 g), A2S2P3R (0.135 g), TJIMIR (0.131 g), T-5(2)R (0.131 g), T4(3)R (0.129 g), TJIMIIR (0.129 g) y A2S2P3 (0.124 g) alcanzaron valores intermedios que resultaron estadísticamente iguales entre sí y de los demás tratamientos.

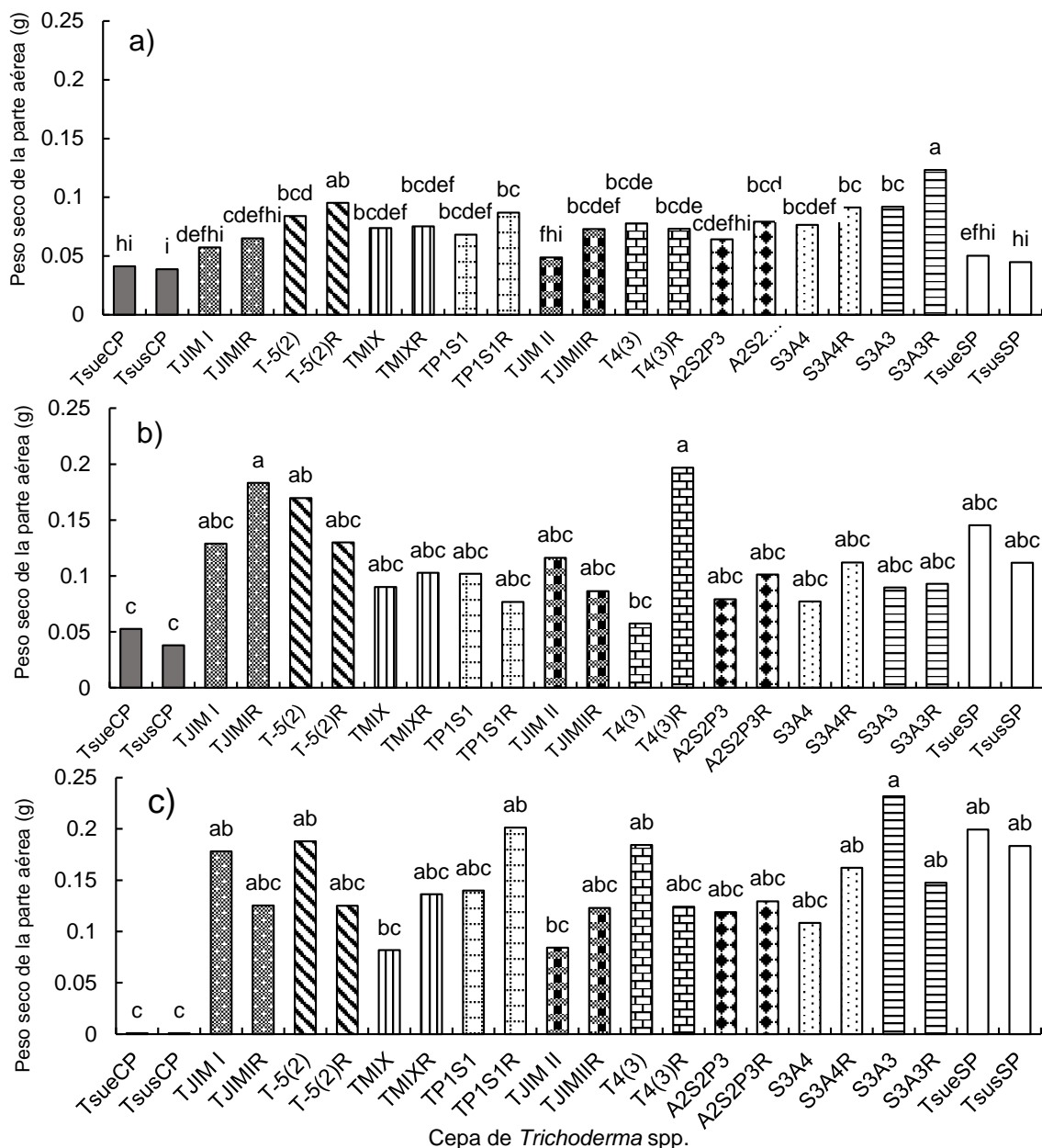


Figura 26. Peso seco de parte aérea de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 1, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4 x 10⁶ esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1 x 10⁶, esporas). a)= 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6 x 10⁵ zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp. en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v /v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

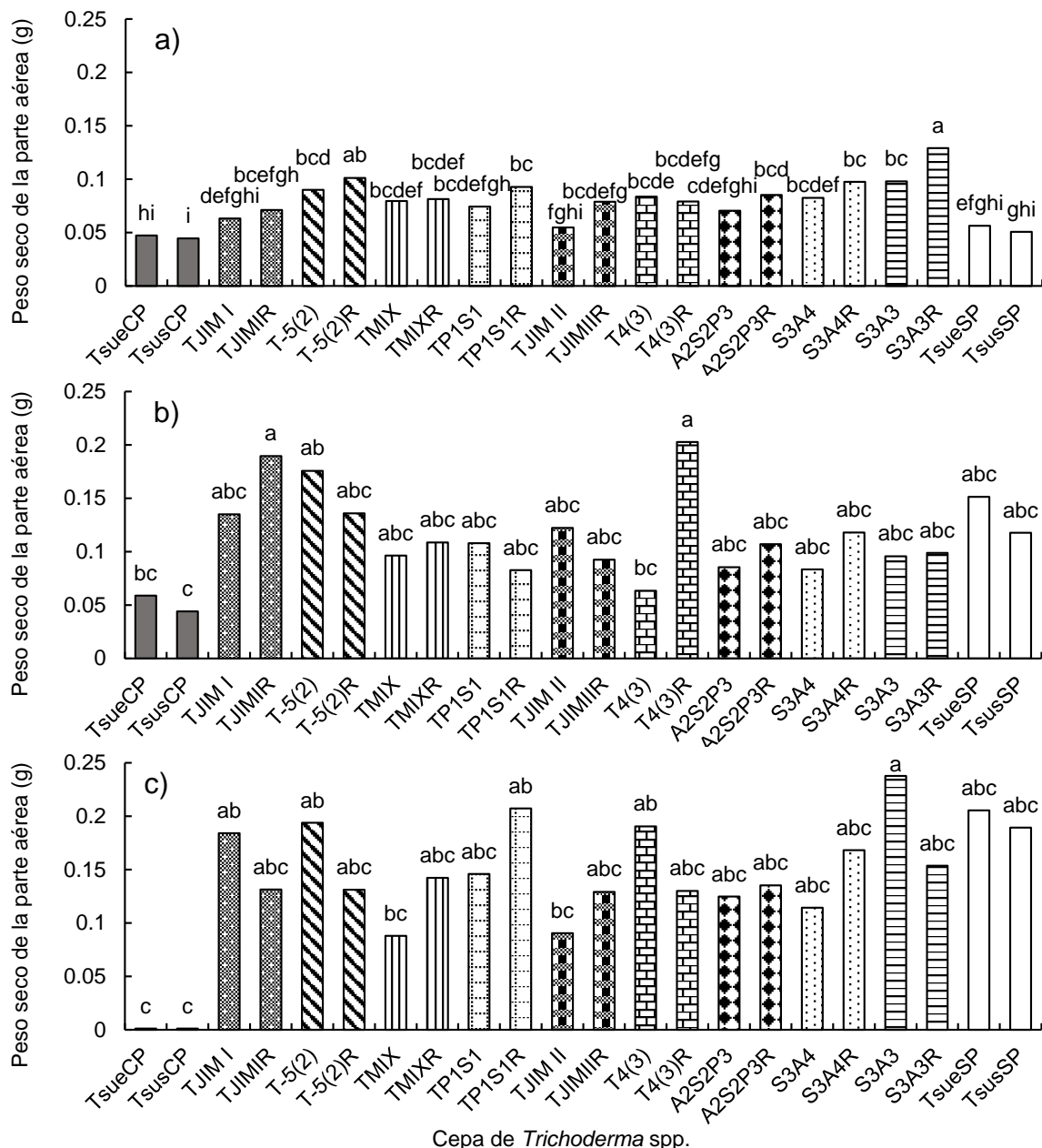


Figura 27. Peso seco de parte aérea de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 2, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4 x 10⁶ esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1 x 10⁶, esporas). a)= 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6 x 10⁵ zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

7.11.7 Relación raíz/parte aérea

En el bioensayo 1, a 15 días de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 18 días después del trasplante, la relación del peso seco de raíz con la parte aérea varió en un rango de 0.44 a 0.66 y no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anexo 17) (Fig. 28a).

Treinta días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante la relación raíz/parte aérea varió en un rango de 0.13 a 0.61 (Fig. 28b). Dicha relación fue mayor para TMIX (.061), TsusSP (0.57), TsusCP (0.57), TsueCP (0.54) y TsueSP (0.49) quienes fueron estadísticamente iguales entre sí. A su vez TsueCP y TsusSP fue significativamente igual a TJIM I (0.40). TJIMIR (0.40), TJIM II (0.40), T4(3) (0.34), y S3A4R (0.32) los cuales no variaron estadísticamente. Éstas cepas (excepto TJIMIR y TJIM II) obtuvieron valores que no fueron significativamente diferentes de T-5(2) (0.31), A2S2P3 (0.30), T4(3)R (0.26), S3A4 (0.26), S3A3R (.23) TP1S1 (0.23), S3A3 (0.22), TP1S1R (0.21), TJIMIIR (0.18), TJIMIIR (0.15) y TMIXR (0.13), pero que a su vez fueron iguales entre sí.

Cuarenta y cinco días después de la inoculación los tratamientos testigo TsueCP (1), TsusCP (1), TsusSP (1) y TsueSP (0.86) obtuvieron el mayor valor de la relación raíz/parte aérea (Fig. 28c); estos valores fueron estadísticamente iguales a TP1S1R (0.67), TJIM II (0.56) y S3A3 (0.48) quienes a su vez resultaron significativamente iguales a los tratamientos restantes (TMIXR (0.35), S3A4R (0.29), TJIMIR (0.29), TJIMIIR (0.28), TJIM I (0.26), S3A4 (0.24), A2S2P3R (0.22) TP1S1 (0.22) A2S2P3 (0.22), T-5(2) (0.21), T4(3) (0.16), S3A3R (0.21), TMIX (0.16), T-5(2)R (0.16) y T4(3)R (0.14)), los cuales no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero si fueron estadísticamente diferentes de los cuatro tratamientos testigo.

En el bioensayo 2, a los quince días de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 18 días después del trasplante, la relación del peso seco de raíz con la parte aérea de la planta varió en un rango de 0.45 a 0.64; sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Anexo 17) (Fig. 29a).

Treinta días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante la relación raíz/parte aérea varió en un rango de 0.15 a 0.60 (Fig. 29b). Esta relación fue mayor para TMIX (0.60), TsusSP (0.56), TsusCP (0.55), TsueCP (0.53), TsueSP (0.49), TJIM II (0.41) y TJIMIR (0.40)

quienes alcanzaron valores estadísticamente iguales entre sí, pero fueron diferentes a los alcanzados por TJIMIIR (0.18) y TMIXR (0.15). TMIX, TJIMIIR y TMIXR resultaron significativamente diferentes de TJIM I (0.39). Este valor fue seguido por S3A3 (0.35), T4(3) (0.35), A2S2P3 (0.32), S3A4R (0.33), T-5(2) (0.31), T4(3)R (0.27), A2S2P3R (0.25), T-5(2)R (0.24), TP1S1 (0.24), TP1S1R (0.23) y S3A3R (0.23) quienes fueron significativamente iguales entre sí, pero diferentes de TMIX, TsusSP y TsusCP.

A 45 días después de la inoculación los tratamientos testigo TsueCP (1), TsusCP (1), TsusSP (1) y TsueSP (0.84) obtuvieron la mayor relación de raíz/parte aérea, estos valores fueron estadísticamente iguales a TP1S1R (0.66), TJIM II (0.55) y S3A3 (0.48) (Fig. 29c). A su vez estos valores fueron significativamente iguales de TMIXR (.35), T4(3) (0.3), TJIMIR (0.29), TJIMIIR (0.29), S3A4R (0.29), S3A4 (0.26), TJIM I (0.27), TP1S1 (0.23) A2S2P3 (0.23), T-5(2) (0.22), S3A3R (22), TMIX (.18) T4(3)R (0.17), T-5(2)R (0.16) y A2S2P3R (0.15) quienes fueron significativamente iguales entre sí, pero diferentes de los cuatro tratamientos testigo.

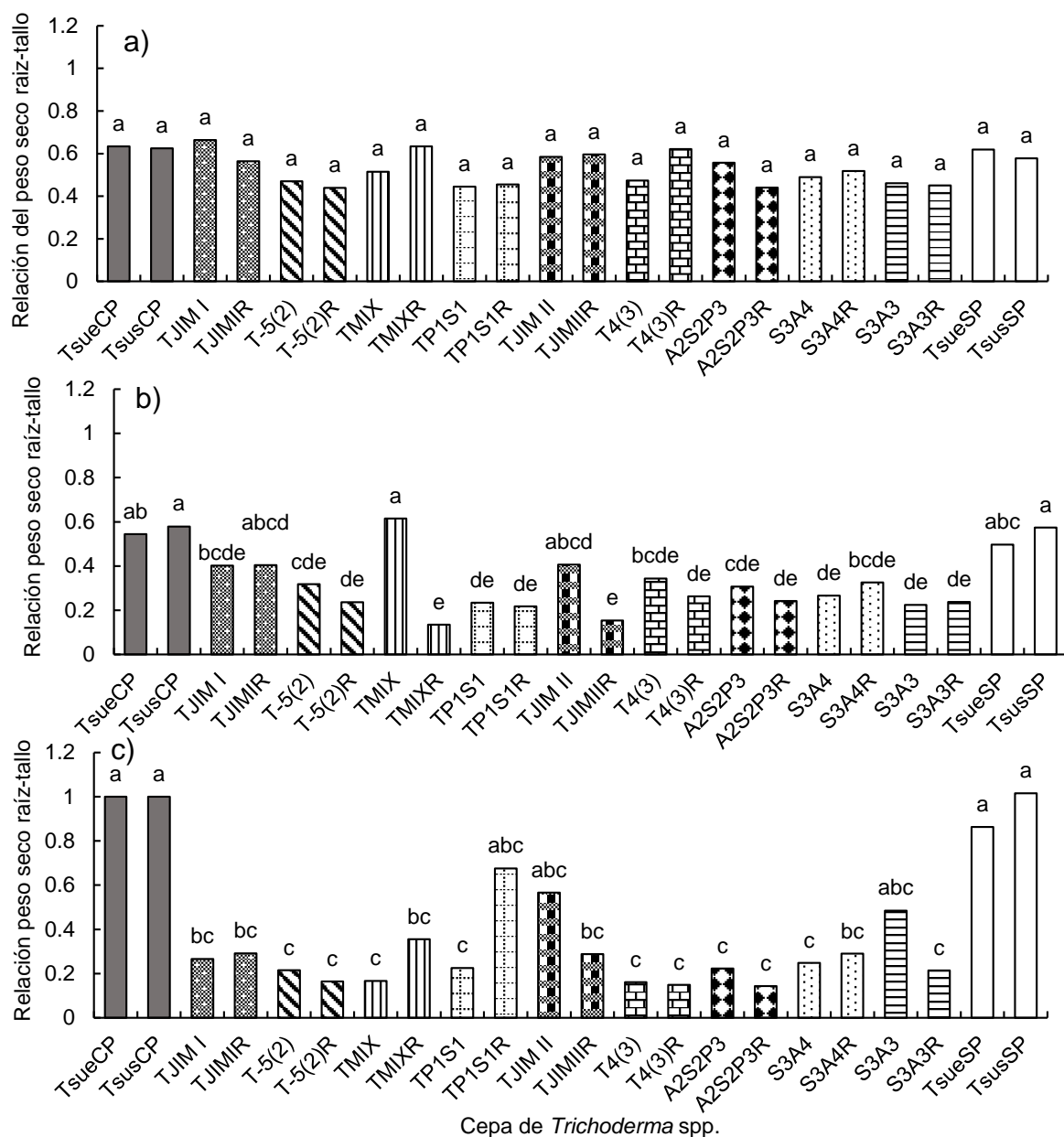


Figura 28. Relación peso seco raíz / tallo en plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del experimento 1, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a)= 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TssSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp. en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

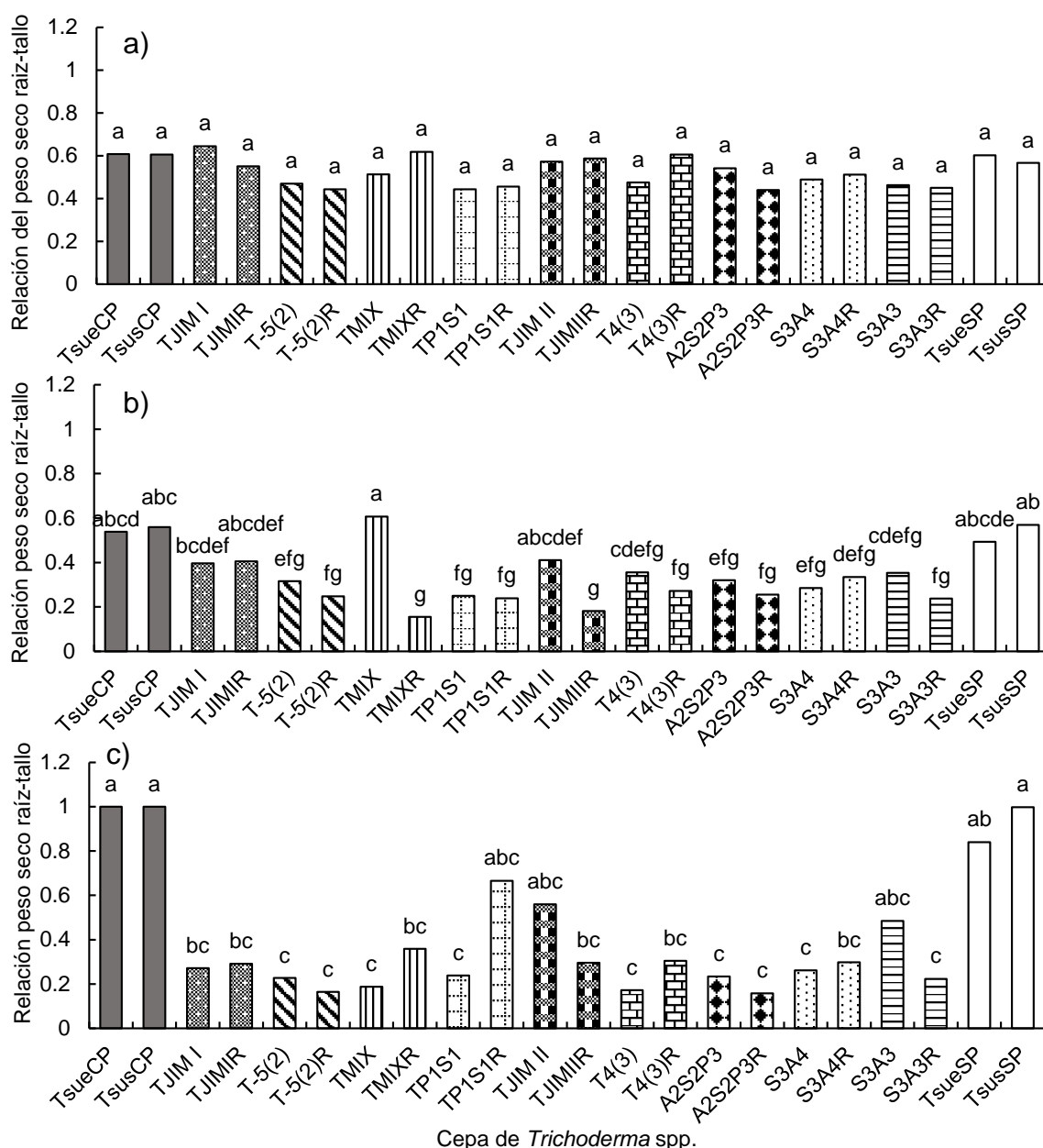


Figura 29. Relación peso seco raíz / tallo en plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, del bioensayo 2, inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas). a)= 15 días después de la reinoculación y 18 días después del trasplante. b) 30 días después de la reinoculación y 33 días después del trasplante. c) 45 días después de la reinoculación y 48 días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP=Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp. en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa el promedio de 12 repeticiones. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

7.12 Área foliar

El análisis de varianza del área foliar de las plantas al final del experimento (48 días después del trasplante y 45 días de la reinoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. e inoculadas con *Phytophthora capsici* en suelo) tuvo diferencias significativas en ambos bioensayos (Anexo 18). En los dos bioensayos destaca el tratamiento de S3A3 que consistentemente mostró diferencias estadísticas con los testigos inoculados con *P. capsici* y sin *Trichoderma* spp. (TsueCp y TsusCP).

En el bioensayo 1, el área foliar (AF) fue mayor en los tratamientos testigos TsueSP y TsusSP (sin inoculación de *P. capsici* y *Trichoderma* spp.), con 9.6 y 9.1 cm² respectivamente (Fig. 30a); estos valores fueron estadísticamente iguales de los alcanzados por S3A3 (8.5 cm²), S3A4R (7.1 cm²), T4(3) (5.6 cm²), TP1S1R (5.2²), TJIMIIR (4.3 cm²), S3A4 (4 cm²) y TP1S1 (3.5 cm²), pero diferentes de T4(3)R (2.6 cm²), TMIX (2 cm²), TJIMIR (2 cm²), A2S2P3 (1.8 cm²) y A2S2P3R (.9), los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí; cabe destacar que a excepción de los tratamientos S3A3 y S3A4R todos los valores de AF fueron significativamente iguales de los testigos con *P. capsici* y sin *Trichoderma* spp. (TsusCP y TsueCP), T-5(2)R, T-5(2) y TJIM I, quienes a causa de su muerte no tuvieron AF sana.

A diferencia del bioensayo 1, en el bioensayo 2 el mayor valor de AF fue observado con S3A3 (10.9 cm²) (Fig. 30b); este valor fue estadísticamente igual al obtenido en TsueSP (9.8 cm²), TsusSP (9.5 cm²), S3A4R (6.3 cm²), TP1S1R (6.3 cm²), TP1S1 (5.9 cm²), TMIXR (5.8 cm²) y T4(3) (4.8 cm²), que fueron significativamente iguales entre sí. Estos valores fueron seguidos de TJIM II (3.9 cm²), A2S2P3R (3.7 cm²), S3A4 (3.5 cm²), S3A3R (3 cm²), TJIMIIR (2.6 cm²), TJIMIR (2.6 cm²), TJIM I (2.5 cm²), T-5(2)R (2.3 cm²), TMIX (2.1 cm²), T4(3)R (2 cm²) y A2S2P2 (1.4) los cuales resultaron estadísticamente iguales entre sí. Cabe señalar que a excepción de S3A3, TsueSP y TsusSP, todos los tratamientos fueron significativamente iguales a T-5(2), TsueCP y TsusCP, quienes a causa de su mortalidad no acumularon AF viva.

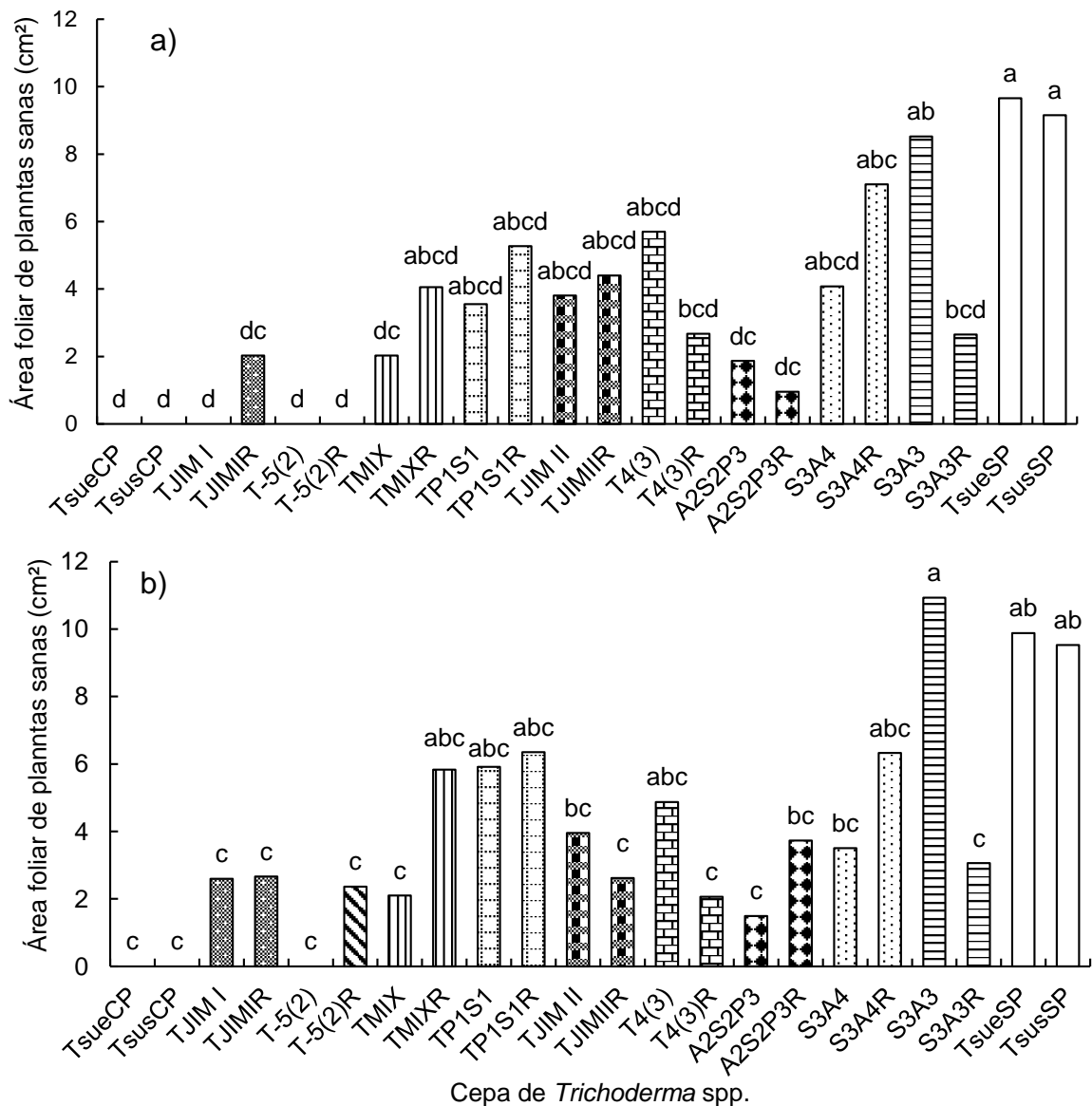


Figura 30. Área foliar de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo inoculadas en vivero con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (4×10^6 esporas), con o sin reinoculación tres días después del trasplante a suelo de la misma localidad. Cepas de *Trichoderma* spp. con la letra R indican una reinoculación en suelo (1×10^6 , esporas) tres días después del trasplante. En todos los tratamientos, con excepción de los testigos SP, las plantas se inocularon con 6×10^5 zoosporas de *Phytophthora capsici* a los 18 días después del trasplante. TsueCP y TsusCP= Testigos con *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). TsueSP y TsusSP = Testigos sin *P. capsici*, sin *Trichoderma* spp, en suelo o en sustrato de peat moss-perlita (75:25 v/v). Cada barra representa a el promedio de 12 repeticiones a los 45 días después de la reinoculación con *Trichoderma* spp. y 48 días después del trasplante. a) experimento 1; b) experimento 2. Barras con diferente letra dentro de cada gráfica indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se observó que las cepas nativas asociadas en condiciones naturales a la rizósfera de *Capsicum annuum* L. fueron más eficientes para colonizar el medio de cultivo. Este resultado es relevante si se desea elegir una cepa por sus cualidades *in vitro*, ya que la tasa de desarrollo (TD) es una medida indirecta de la capacidad para utilizar una fuente de carbono; a su vez permite evaluar la capacidad saprofítica que puede poseer cierto aislado. Uzonovic y Webber (1998) consideran que la TD es una herramienta útil en la caracterización de la capacidad de biocontrol de las cepas de *Trichoderma* spp. La TD permite saber el tiempo óptimo para realizar la siembra en los cultivos duales en estudios para determinar el potencial de los metabolitos secundarios de los dos hongos sometidos a la confrontación (Cherif y Benhamou, 1990). No obstante, la capacidad de crecimiento obtenida por alguna cepa en una placa con medio de cultivo, donde crece libremente sin agentes competidores y condiciones óptimas no garantiza el establecimiento en otro sustrato y con condiciones ambientales diferentes, por lo que tampoco se puede excluir a las cepas que no tienen buen crecimiento en el medio de cultivo (*in vitro*), ya que existe la posibilidad de que sean éstas las que respondan mejor ante el sustrato donde se pretende inocular en las fases posteriores (invernadero o campo). Sin embargo la TD ha sido usada en diversos estudios como una forma de caracterizar el potencial de los antagonistas (Guigón *et al.*, 2010). La TD obtenida por las cepas antagónicas aisladas en la rizósfera (S3A4, S3A3 y A2S2P3) indica que son más efectivas para invadir el medio de cultivo (Extracto de Malta-Agar) respecto a las cepas nativas aisladas en suelos no cultivados y las cepas externas. Además, esta variable particularmente en el bioensayo 2, fue equivalente a la mayoría de los resultados de severidad, ya que las cepas S3A3 y TP1S1 además de tener los valores más altos de TD redujeron en mayor grado la enfermedad y por ende la muerte de plantas, a la vez de que la cepa TJIM I obtuvo la menor TD y fue de los tratamientos con mayor grado de marchitez y mortalidad.

Por otra parte, la esporulación también puede ser una medida importante para estimar el grado de biocontrol, ya que forma parte de las cualidades de sobrevivencia, colonización y dispersión del antagonista. De acuerdo con Papavizas (1985) el género *Trichoderma* solo produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas; sin embargo, de estos, los conidios o esporas son los propágulos de mayor viabilidad en los programas de biocontrol (Elad *et al.*

1993). Los valores de esporulación observados estuvieron asociados a la capacidad de crecimiento micelial en la mayoría de cepas evaluadas. Dado que las cepas S3A3 y S3A4 obtuvieron mayor TD y esporulación que las demás cepas evaluadas y a sí mismo TJIM I obtuvo menor TD y menor esporulación, podemos afirmar que las cepas nativas de la rizósfera de Chile tienen el mayor potencial de expansión, aunque en casos como el de la A2S2P3, donde no se observó el mismo patrón, podría haber una estrategia diferente en el uso de energía, donde la cepa destina mayor recurso en la producción de micelio para invadir la superficie del medio limitándose a la producción de esporas. La esporulación es un mecanismo que puede ser afectado por factores como la luz (Gonzales *et al.*, 2000), en este sentido el suelo representa una barrera física en el desempeño del antagonista ya que condiciona la entrada de esta y consecuentemente la esporulación. Otro de los factores que limitan a esta variable es el sustrato (Agamez *et al.*, 2008). Al ser el sustrato una condicionante de la esporulación que indirectamente limita o beneficia la propagación y dispersión del antagonista, una cepa puede ser efectiva *in vitro* (con el sustrato evaluado) pero su efecto podría ser totalmente distinto cuando es liberada en suelo, pues dependerá de la habilidad del antagonista para utilizar los nutrientes aportados por el suelo y de la capacidad para sobrevivir en las condiciones en que se libera. Este comportamiento fue el que se presentó con la cepa T4(3) ya que a pesar de que obtuvo la menor esporulación (*in vitro*) alcanzó el mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC); caso contrario a S3A3 que obtuvo la mayor esporulación y a su vez alcanzó los valores más bajos de UFC en el sustrato en ambos bioensayos respecto al cuarto muestreo.

En la presente investigación se observó que también el sustrato influye en la capacidad antagónica ya que algunas cepas como la TJIM I y TJIM II, ejercen actividad lítica sobre *P. capsici* cuando crecen en un medio líquido a base de trigo o maíz, y contrariamente, esta actividad se mitiga cuando el medio en el que crecen es arroz. En la mayoría de estudios sobre las interacciones entre *P. capsici* y *Trichoderma* spp. *in vitro* se han utilizado bioensayos duales, donde básicamente se siembra de forma confrontada en extremos opuestos el patógeno y el antagonista (Cherif y Benhamou 1990; Michel *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2013); en la mayoría de estos bioensayos se ha optado por medio de cultivo PDA, otorgando cierta ventaja al antagonista, donde comúnmente el oomiceto no desarrolla micelio aéreo, aunado a las altas tasas de desarrollo que obtienen ciertas cepas de *Trichoderma* spp. en este medio de cultivo. En este trabajo se optó por extracto de malta-agar, ya que es un medio donde

Trichoderma spp. y *P. capsici* producen micelio aéreo y a su vez las tasas de desarrollo por el antagonista son relativamente menores a las que se obtienen con PDA. Sin embargo aún con este ajuste, en este estudio el desarrollo de *Trichoderma* spp. propició un tiempo de contacto con las hifas del patógeno que varió de 1 a 3 días, lo que implica que las cepas en general tienen cualidades biológicas deseables; este comportamiento podría jugar un papel importante en la actividad antagonista del hongo, ya que al aumentar la velocidad con la que *Trichoderma* spp. colonizó el medio y localizó al patógeno podría traducirse en mejor eficiencia de control. Entre menor sea el tiempo al contacto es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagonista y menor la resistencia del fitopatógeno (Michel *et al.*, 2001); en este sentido las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en la rizósfera de *Capsicum annuum* L. solo demoraron 3 d en hacer contacto, a diferencia de algunas cepas nativas y las de referencia que hicieron mayor tiempo. Esto indica que las variables de TD, esporulación y además el tiempo de contacto, son variables estrechamente relacionadas que pueden estimar el potencial de los antagonistas. Uno de los métodos más utilizados que permiten caracterizar el tipo de relación que ejerce *Trichoderma* spp. con *P. capsici* es la escala de Bell *et al.* (1953) que clasifica el tipo de antagonismo ejercido por el género *Trichoderma* spp. Esta escala se ha usado en diversos estudios como una medida visual del potencial biocontrolador de *Trichoderma* spp. ante muchos patógenos (Arzate *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2013). La clase de antagonismo no solo dependerá del tipo de antagonista sino también del patógeno; esto se refuerza con los resultados obtenidos en la presente investigación, por ejemplo; la cepa de *Trichoderma* spp. A2S2P3 ejerció una clase de antagonismo tipo 2 con la cepa de *P. capsici* PC-A, pero fue de tipo 1 cuando se confrontó con PC-B y PC-C. De acuerdo con Dennis y Webster (1971) el sobrecrecimiento es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes y forma parte de la estrategia del biocontrol, ya que puede reducir o detener completamente el desarrollo del micelio; además Michel *et al.*, (2008) mencionan que todos los aislados con antagonismo clase 1 y 2 se consideran antagonistas muy eficientes y con potencial de biocontrol suficiente para seguir evaluándose bajo condiciones de invernadero y campo; sin embargo este criterio es demasiado tajante puesto que existen cepas como las de esta investigación en la cual el tipo de antagonismo es de clase 3, pero su mecanismo de acción está mayormente relacionado a la antibiosis y no al parasitismo como tal, haciendo que esta evaluación sea demasiado superficial para caracterizar el verdadero potencial de un antagonista. Por otro lado los resultados del porcentaje de inhibición que se obtuvieron en un rango de 47

% a 79 % dependiendo de la cepa de *Trichoderma* spp. y de *P. capsici*, demostraron que en general no hay diferencias estadísticamente significativas entre las cepas que tienen un tipo de antagonismo de tipo 3 con respecto a uno que obtiene de tipo 1.

El porcentaje de inhibición es un parámetro que ha sido evaluado en varios estudios como una variable que permite caracterizar la aptitud biológica de los antagonistas versus el patógeno (Cherif y Benhamou 1990; Michel *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2013). Las implicaciones de esta interacción tienen características relevantes en donde se involucran los mecanismos de acción de los agentes de control biológico y las cualidades de resistencia y sobrevivencia del patógeno. Las nueve cepas de *Trichoderma* spp. empleadas en este estudio demostraron cierta homogeneidad en la inhibición de las tres cepas patogénicas de *P. capsici*, y no se detectaron diferencias importantes entre aislados nativos y externos, además de que los resultados reflejan la alta capacidad antagonica de la mayoría de los aislados, lo cual contrasta con lo obtenido por Osorio *et al.*, (2011) quienes evaluaron la inhibición de 30 aislados de *Trichoderma* spp. frente a *P. capsici* y obtuvieron inhibiciones inferiores al 50 % al octavo día; donde destacó la cepa T25 (*T. hamatum*) con 49 % de inhibición.

Cabe señalar que aún con porcentajes de inhibición altos, este comportamiento no fue reflejado de la misma forma en la etapa de suelo cuando se avaluó la severidad, ya que solo las plantas tratadas con S3A3 y TP1S1 fueron capaces de controlar a *Phytophthora capsici*; lo que sugiere que esta variable puede sobreestimar la acción del antagonista en contra del patógeno y al mismo tiempo puede explicar por qué muchos de los programas de control han fracasado cuando sólo se cuenta con un análisis *in vitro*.

Trichoderma spp. también puede actuar como promotor del crecimiento vegetal de plantas como la papaya y el chile (Cubillos *et al.*, 2009; Nera *et al.*, 2013). En este estudio las plantas que se inocularon con las cepas asociadas a la rizósfera (S3A3, S3A4 y A2S2P3) produjeron mayor biomasa que las que no fueron aisladas de suelos productores y aquellas externas a la zona (Fig. 15), esto podría explicarse por el hecho de al haber estado con anterioridad asociadas a la rizósfera de chile se adaptan mejor a este tipo de sistema; sin embargo, la sobrevivencia de las cepas nativas en el sustrato no fue la mejor, ya que el mayor valor de UFC se obtuvo con una cepa nativa no asociada al cultivo (T4(3)) y que fue aislada de suelos erosionados, por

consiguiente con mayor adaptación a suelos con poca fertilidad el sustrato utilizado para la fase de vivero tuvo características similares; esto también explica porque las cepas no asociadas también fueron buenas promotoras de crecimiento. Sin embargo cuando se intentó reforzar la inoculación de *Trichoderma* spp. tres días después del trasplante en S3A3, A2S2P3, T5(2), TJIM II y T4(3) resultó contraproducente ya que una vez que se inoculó el oomiceto la severidad de la enfermedad aumentó con respecto aquellos tratamientos donde estas mismas cepas sólo se inocularon en vivero y por consecuencia las variables de peso seco de raíz, parte aérea y área foliar disminuyeron; lo contrario ocurrió con S3A4, TP1S1, TMIX y TJIM I donde el tratamiento de reinoculación al parecer benefició las plantas. Una posible explicación de este fenómeno puede ser que las cepas son tan agresivas que al momento de realizar una nueva inoculación en la fase de suelo compiten entre ellas mismas, tal y como se muestra en el Anexo 18, donde se reaislaron las cepas de *Trichoderma* spp. de cada tratamiento y se sometieron a una confrontación interespecífica con las cepas originales. En dicha figura se observa que las cepas S3A3, A2S2P3, T5(2), TJIM II y T4(3) compiten entre ellas mismas para colonizar el medio a tal grado que se ejerce un parasitismo similar al de las confrontaciones con *P. capsici* y no es el caso de las cepas S3A4, TP1S1, TMIX y TJIM I, ya que cada aislado de la misma cepa solo colonizan la mitad de la placa sin ejercer parasitismo sobre la otra; esto se pudo haber dado por múltiples factores entre los cuales el suelo puede ser uno de los principales, pues como se demostró el sustrato juega un papel importante en la capacidad antagónica de estas cepas, además una nueva inoculación pudo representar una alta población de *Trichoderma* spp. y al ser el suelo un sistema autorregulable se propició una competencia interespecífica donde se disminuyeron tales poblaciones dando paso al desarrollo de la enfermedad.

La inoculación del oomiceto en el suelo afectó la relación de la raíz/parte aérea ya que previo a ésta no se habían detectado diferencias; no obstante la inoculación de S3A3, TJIM II y TP1S1 permitió que la biomasa de ambas partes de la planta fuera proporcional; esto puede explicar porque las plantas tratadas con este tipo de cepas disminuyó en mayor grado la enfermedad, pues además de su acción antagónica en suelo, la oferta de nutrientes extraídos por la raíz fue proporcional a la demanda requerida por la parte aérea.

Por otro lado se observó que no sólo son importantes las poblaciones del antagonista en el suelo, si no también si éste se encuentra en la raíz, ya que ese es el sitio primario donde atacará

P. capsici; este fenómeno se observó con S3A3, ya que obtuvo menores poblaciones que la mayoría cepas en la fase de suelo, pero a la vez colonizó con mayor frecuencia las raíces, lo que pudo explicar por qué además de aumentar la biomasa controló de mejor forma la enfermedad. Este fenómeno fue parecido al observado con TP1S1, T4(3) y TJIM II, pero a diferencia de S3A3 también tuvieron altas poblaciones en el suelo.

En resumen las cepas que fueron consistentemente mejores tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones de invernadero fueron la S3A3 y TP1S1 (ambas cepas nativas), ya que conforman una acción dual, es decir, son promotoras de crecimiento y al mismo tiempo los mejores antagonistas que influyeron significativamente en el control de la enfermedad. Por otra parte, debido a que la estrategia de inoculación en el suelo influyó de manera negativa en la mayoría de cepas se recomienda realizar una sola inoculación en la fase de vivero o almácigo.

IX. CONCLUSIÓN

En condiciones *in vitro* las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas tienen similares mecanismos de antagonismo contra *Phytophthora capsici*.

Las cepas nativas asociadas a la rizósfera inducen mayor biomasa en plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo, aunque la capacidad de sobrevivencia de las mismas en el sustrato (peat moss perlita expandida 75:25 v/v) es menor que las cepas de suelos no productores.

Las cepas nativas S3A3 y TP1S1 tienen potencial para controlar de forma eficiente la marchitez causada por *Phytophthora capsici* en suelo y plantas de chile (cv. criollo) de Tetela de Ocampo.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos no productores de chile tienen mayor capacidad de sobrevivencia en suelos de Tetela de Ocampo que las nativas asociadas a esta rizósfera y las cepas no nativas.

X. LITERATURA CITADA

- Agamez Ramos E.Y., Zapata Navarro R.I, Oviedo Zumaqué L.E. y Barrera Violeth J.L. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista colombiana de biotecnología*.10 (2). 22-34.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A Rey, M.J., de la Cruz, J., Monte, E., and Llobell, A. 2001. An antifungal Exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1 from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Enviromental Microbiology*. 67: 5833-5839.
- Alexopulus C., Mims C. and Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. Jonh Wiley y sons Inc USA.
- Avelar, M. JJ. 1989. Intentos de control de la marchitez del chile ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* L. en la región de Valsequillo, Puebla, México. Tesis de Maestría en ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillo, Edo de México. 66 p.
- Babadoost, M. 2005. *Phytophthora* blight of cucurbits. The Plant Health Instructor. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/oomycetes/pages/phytophthora.aspx>. Citado 21/09/2014.
- Baker K.F. & Cook R.J. 1982, Biological control of plant pathogens. *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 28-43
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. *Burgess Publishing Company*. Minneapolis, MN, USA. 241 p.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1982. Ilustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess publishing. Mineapolis, Minesota USA 241p.
- Bautista, C. J. 2008. Supresividad a *Phytophthora capsici* con complejidad ascendente de antagonistas en sustratos de germinación de los cultivos. Tesis doctoral. Colegio de posgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- Benítez S. y González L. 2003. *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Trichoderma harzianum*. Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología Clínica y Aplicada. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. 23 p.

- Benitez T, Rincón A.M., Limón M.C. and Codón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Bell, D.K., Wells, H.D. and Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
- Bisset, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany* 70: 639-641.
- Boccas, B., y Laville, E. 1976. Les maladies a *Phytophthora* desagrumes. IRFA. Francia. Editions SETCO. 162 p.
- Bowers, J. H., Papavizas, G. C., and Johnston, S. A. 1990. Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Disease* 74:771-777.
- Cafe F. 1995 Effects of the frequency of furrow irrigation on root and fruit rots of squash caused by *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*. 79: 44-48.
- Camargo, H. 2005. Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza sativa*), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista *Trichoderma harzianum*.
- Campbell C.L., Madden L.V., 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Cano M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales actualidad & divulgación científica* 14(2): 15-31.
- Castillo, F., E., Gallegos, M., G, Hernández C., FD., Cepeda, Siller, M., y Zamora V., VM. 2001. Efectividad de actinomicetos aislados de rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Küh in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:203-207.
- Cherif, S.S., and Benhamou, C.S. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. Radicisly copersici. *Phytopathology* 80:1406-1414
- Chet I, Ibar J & Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. in: The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships (Wicklowsky DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag. Pp 165-192.

Claro, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) Ciudad de La Habana, Cuba.

Corrêa, Sueli; Mello, M.; Ávila, Zilá R.; Minaré Braúna, Leonardo; Pádua, Raquel R.; Gomes Diogo. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*.11 (1): 3-9.

De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín N. L. 515 p.

Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: Pp 1053.

Elad, Y., Chet I. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of microbiology*. 28: 719-725.

Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, I., Zuriel, S. y Chet, I 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant pathology* (oxford). 42: 324-332

Elías, O., L., Murillo, D, V.A., Avitia, T., MC. y Guigón L., C. 2005. Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium* spp. causantes de pudriciones radicales de chile. Memorias del XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Chihuahua, Chihuahua México. Resumen L-8.

Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México Estado de Puebla. H. Ayuntamiento de Tetela de Ocampo. Consultado el 21/04/2013 en <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM21puebla/municipios/21172a.html>

Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. 1995. *Phytophthora* diseases Worldwide. *The American Phytopathological Society*. APS Press. St Paul, MN, USA. Pp 562.

Erwin, D.C., Bartnicki G. S., and Tsao, P.H., eds. 1983. *Phytophthora*: Its biology, taxonomy, ecology and pathology. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. Pp. 392.

Ezziyyani, M., C. P. Sánchez, M. E. Requena, A. S. Ahmed y M. E. Candela 2005. “Ejemplo de la interacción pimiento-*Phytophthora capsici*, causante de la tristeza”. *Horticultura* Pp. 5-18.

- Ezziyyani, M., C. P. Sánchez; M. E. Requena; A. S. Ahmed y M. E. Candela 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento *Capsicum annum* L. *Anales de biología* 26:35-45.
- Faheem-Amin, R. VK., Mohiddin, F.A., Bath K.A. y Banday S. 2010. Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. *Journal of Phytotherapy* 2(10): 38-41.
- Falconí, C. y Yáñez M. 2007. Validación de biopesticidas para el control de la moliniasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador; Proyecto de Investigación PIC-051; Publicación Científico Técnica. 37 p.
- Farías, R. R., Godínez, R., Zamora, E. y Peña C., JJ. 1997. *Pseudomonas flourences* como agentes de control de bacterias patógenas de plantas. II Selección de cepas de *Pseudomonas* productoras de sideróforos. *Terra* 15:383-389.
- Farías, R. R., Godínez, R., Zamora, E. y Peña C., JJ. 1997. *Pseudomonas* fluorescentes como agentes de control de bacterias patógenas de plantas. II. Inoculación en planta. *Terra* 15:391-396.
- Fernández Herrera *et al.*, 2006, Manejo Biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 25:32.
- Fernández, H. E., Rojas-Martínez R.I., Guevara-Olvera L., Rivas-Dávila M.E., Valadez-Moctezuma E. y Zavaleta-Mejía E. 2012. Defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 42:96-107.
- Gallegly M y Hong C. 2008. *Phytophthora* identifying species by morphology and DNA fingerprints. *American Phytopathological society* USA. Pp. 168
- Gindrat, D. 1979. Biocontrol of plant diseases by inoculation of fresh wounds, seeds and soil. *in: Soil-borne plant pathogens*. Schippers, B. Gams, W. (eds.). Academic Press. New York. USA. Pp. 537-551.
- Guigón, L. C., Guerrero, P. V., Vargas, F. Carvajal M, E., Ávila Q. GD., Bravo, L. L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:87-96.

- Gómez, D. N., Carreón, A. Y. y Fernández, P. P. 2008. Reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici* Leonian causante de la pudrición de raíz en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Biológicas* 10:100-108.
- González, M. M., Torres, P. I. y Guzmán, M. H. 2002. Patógenos involucrados en la marchitez del chile. Proceedings of the 16th International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas. México.
- González C., Maruri G., González A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) *Revista Científica UDO Agrícola*. 5 (1). Pp. 45-47.
- González M. A., Mas D. S.M., Cabeza P. D. y Campos S. M. 2000. Influencia de la luz solar en el crecimiento y esporulación del biofungicida *Trichoderma viride*. *Tecnología química* 20(1): 92-96.
- Griffith, G.H. and Shaw, D.S. 1998. Polymorphism in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial haplotips are detected after PCR Amplification of DNA from pure cultures or from Host lesions. *Aplied of Enveronmental Microbiology*. 64(10): 4007-4014.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2:43-56.
- Harman GE. 2004 Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*. 84:377-393.
- Hausbeck, M. K. y Lamour, K. H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease* 88:1292-1303.
- Hermosa, M., Grondona I., Turriaga, E., Díaz Miguez, J., Castro, C., Monte, E. and García Acha, I. 2000. Molecular Characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Enviromeltal Microbiology*. 65(5): 1890-1898.
- Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis. In: Harman, G.E. & Kubicek, C.P. (Eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. Pp. 173–184.

- Jiménez C, Sanabria de Albarracín N, Altuna G, Alcano M. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Facultad Agronómica. 28: 1-10.
- Lewis, J. Barkadale, T. Papavizas, G. 1990. Greenhouse and field studies on the biological control of tomato fruit rot caused by *Rhizoctonia solani*. *Crop Protection*. 9:8-14.
- Kannwischer M. E. and Mitchell D. J. 1978. The Influence of a Fungicide on the Epidemiology of Black Shank of Tobacco. *Phytopathology*. 68: 1760-1765.
- Martínez M., 2001. Libro de agricultura orgánica. Bogotá. Pp. 20, 186, 191, 192.
- Michel A, A.C. 2008. Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes Causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.) Revista Mexicana de Fitopatología. 27: 18-25.
- Michel, A. AC., Otero, S. MA., Martínez, R. M., Ariza, F. R., Barrios, A. y Rebolledo D. O. 2008. Control *in vitro* de enfermedades fungosas en *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances de Investigación Agropecuaria*. 12 (3): 55-68.
- Michel, A. AC., Otero, S. MA., Martínez, R. M., Ariza, F. R., Barrios, A. y Alarcón, C. N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 17(3): 89-107.
- Michel, A. AC., Rebolledo, D. O., Lezama, G. R., Ochoa, M. M. E., Mesina, E. JC. y Samuels, G. J. 2001. Especies de *Trichoderma* en Suelos Cultivados con Mango Afectados por Escoba de Bruja y su potencial Inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(2) 154-160.
- Morán B., Aguilar R., Corona T., Zavaleta M. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33 (4) 21 – 26
- Matarese F., Sarrocco S., Gruber S., Seidl-Seiboth V. y Vannacci. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*. 158: 98-106.

- Noveriza Rita y Tricita H. Quimio. 2004. Mycoflora of black pepper rhizosphere in the Philippines and their *in vitro* antagonism against *Phytophthora capsici* L. *Indonesian journal of Agricultural Science*. 5(1) 1-10.
- Osorio, H. E., Hernández, C. FD., Gallegos, M. G., Rodríguez H. R. y Castillo R. F. 2011. In-vitro behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research*. 6(19) 4594-4600.
- Papavizas, G. C., Lewis J. A. y Abd E. TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Papavizas G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Reviews Phytopathology*. 23: 23-54
- Pérez, C. Nilda. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural del II Curso de Control Biológico, SMCB UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah., México. Pp 296.
- Ramos S. R.U., Gutiérrez S. J.G., Rodríguez G. R., Salcedo M. S.M., Hernández L. C.E., Luna O. H.A., Jiménez B. J.F., Fraire V. S. y Almeyda 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.
- Ramírez V.J. y Romero C. S. 1980. Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo. agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia* 39: 9-18.
- Raven. P.H., Evert R.F. and Eichhom S.e 1999. Biology of plants. Sixth Edition. New York .WH freeman and campany. Pp. 370.
- Redondo, J.E. 1989. Mecanismos de infección y patología de las plantas de chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agociencia* 77:123-137.
- Restrepo A., Jaramillo V., y Cotes T. 2009. Efecto de dos microorganismos y un consorcio de micorrizas en combinación con viruta de pino sobre el control de sarna polvosa (*Spongospora subterranea*) en papa. *Revista Facultad Nacional Agrícola Medellín* 62(2): 5047-5054.
- Reyes J., Pineda J. y Sanabria M.E. 2007. Efectividad de filtrados de hongos presentes en frutos de maíz (*Zea mays* L.) sobre *Fusarium moniliforme*. *Agroecología*. 2: 47-53.

- Rico, G. L., Medina, R. S., Muñoz, S. CI., Guevara, O. L., Guevara, G. RG., Guerrero, A. BZ., Torres, P. I., Rodríguez, G. R., González, C. MM. 2004. "Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR ". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 1(1) 1-6.
- Rifa, M. A. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116: 1-56.
- Ristaino, J.B., and Gumpertz, M.L. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Reviews Phytopathology*. 38: 541-576.
- Ristaino, J.B. and Johnston, S.A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease*. 83:1080-1089.
- Romero, O., Tello I. Damián MA., Villareal O., Aragón A. and Parraguirre C. 2013. Identification and Evaluation of soils in Tetela de Ocampo, Puebla. *International Research Journal of Biological Sciences* 2(4): pp 1-7.
- Ruano, R. D., del Moral, N. L. y López H. CJ. 2003. Estudio de temperaturas de crecimiento *in vitro* en aislados de *Trichoderma* spp. y de *Rosellinia necatrix*. evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate). Pp. 525-529.
- Shashidhara S. M., Lokesh S., Lingaraju S. y Palakshappa M. G. 2008. *In vitro* Evaluation of Microbial Antagonists, Botanicals and Fungicides Against *Phytophthora capsici*. *Journal of Agricultural Sciences*. 21(4): 527-531
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. In: Proceedings 6th International Congress on Soils Culture. Wageningen, The Netherlands. Pp. 633-650.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. 2013. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved October 20, 2013, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- Stefanova M., Leiva A., Larriganaga L. y Coronado M. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*.16:509-516.

- Solache H. E., Rodríguez A. G., Naranjo B. A.E., Díaz C. M. y Fernández P. S.P. 2010. Técnicas de purificación de aislamientos de *Phytophthora* contaminados por bacterias. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 12(1): 61-64.
- Steel, R. GD., Torrie, J. H. y Dickey D. A. 1997. Principles and procedures of statistics a biometric approach. 3rd ed. McGraw-Hill Series in probability and statistics. 666 p.
- Tanada Y y Kaya H. K. 2001. Insect pathology. Academic Press, New York. *Revista Entomología*; 14:197-270.
- Tuset, J. J. 1983. La “gomosis” y “podredumbre del cuello de la raíz” de nuestros agrios. I. Aspectos biológicos y patológicos. *Levante Agrícola* 246: 90-96.
- Trujillo F. E., Zavaleta M. E., Rojas M. R.I. y J. Lara V. M.M. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia A *Phytophthora capsici* inducido *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). *Nematropica* 35(1): 37-44.
- Tsao P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. (8) 157-186
- Uzunovic, A. and Webber, J. F. 1998. Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in fresh cut pine biiets. *European Journal of Forestal Pathology* 28: 323-334.
- Vázquez, M.M. *et al*; 2000, Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*. 15:261-272.
- Valencia, A. JC. y Castro, C. BL. 2004. Estudio de algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* spp. antagonicos a *Rosellinia bunodes*. *Cenicafé*. 55 (1): 16-28.
- Vincent, J. M. 1947. Distortion of fungal hypha in the presence of some inhibitors. *Nature*.159: 850.
- Villanueva, S. O., Abato Z. M. y Escaloma, A. M. 2005. Efecto antagonico de rizobacterias nativas del género *Pseudomonas* sobre *Phytophthora parasítica* in vitro. Memorias del XXXII Congreso Nacional de la sociedad Mexicana de Fitopatología. Chihuahua, Chihuahua, México. Resumen C-7

Waterhouse, M. G. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers* 92:22.

Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1061-1070.

Zadoks, J. C., and Schein, R.D. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press. New York, USA. 427 p.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Resumen del análisis de varianza de la tasa de desarrollo de cepas de *Trichoderma* spp.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	8	<.0001	<.0001
Error	27		
Cepa	8	<.0001	<.0001

ANEXO 2. Resumen del análisis de varianza de la esporulación de cepas de *Trichoderma* spp.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	8	<.0001	<.0001
Error	27		
Cepa	8	<.0001	<.0001

ANEXO 3. Resumen del análisis de varianza de la regresión entre el logaritmo natural del número de esporas de las cepas de *Trichoderma* spp. y la tasa de desarrollo del micelio.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F
Modelo	1	<.0001
Error	34	

ANEXO 4. Resumen del análisis de varianza del porcentaje de inhibición ejercido por cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora capsici* (PC-A).

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	8	<.0121	<.16
Error	27		
Cepa	8	<.0121	<.16

ANEXO 5. Resumen del análisis de varianza del porcentaje de inhibición ejercido por cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora capsici* (PC-B).

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	8	<.4764	<.0133
Error	27		
Cepa	8	<.4764	<.0133

ANEXO 6. Resumen del análisis de varianza del porcentaje de inhibición ejercido por cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora capsici* (PC-C).

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	8	<.1221	<.5922
Error	27		
Cepa	8	<.1221	<.0133

ANEXO 7. Resumen del análisis de varianza del halo de inhibición de *Phytophthora capsici* (PC-A) ejercido por filtrados de *Trichoderma* spp. Bioensayo 1.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	80	<.0001	<.0001
Error	243		
Sustrato	2	<.0001	<.0001
Cepa	8	<.0001	<.0001
Dilución	2	<.0001	<.0001
Sustrato*cepa	16	<.0001	<.0001
Sustrato*dilución	4	<.0001	<.0001
Cepa*dilución	16	<.0001	<.0001
Sustrato*Cepa*dilución	32	<.0001	<.0001

ANEXO 8. Resumen del análisis de varianza de la dinámica de poblaciones de *Trichoderma* spp. en el sustrato de plantas de chile en fase vivero, con diferente número de reinoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	35	<.1221	<.1221
Error	108		
Número de inoculaciones	3	<.0001	<.0001
Cepa	8	<.0001	<.0001
Número de inoculación*cepa	24	<.0001	<.0001

ANEXO 9. Resumen del análisis de varianza del peso seco de la raíz de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en etapa de vivero.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (18 *Dds y 15 *Dd1)		P > F (33 *Dds y 15 *Dd2)		P > F (45 *Dds y 15 *Dd3)		P > F (60 *Dds y 15 *Dd4)	
		Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
Modelo	9	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0015	<.0015
Error	30								
Cepa	8	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0015	<.0015

*Dds = Días después de la siembra de chile (*Capsicum annuum* L.)

*Dd1 = Días después de la primera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd2 = Días después de la segunda inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd3 = Días después de la tercera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd4 = Días después de la cuarta inoculación de *Trichoderma* spp.

Bio = Bioensayo.

ANEXO 10. Resumen del análisis de varianza del peso seco de la parte aérea de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en etapa de vivero.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (18 *Dds y 15 *Dd1)		P > F (33 *Dds y 15 *Dd2)		P > F (45 *Dds y 15 *Dd3)		P > F (60 *Dds y 15 *Dd4)	
		Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
Modelo	9	<.0052	<.0015	<.0001	<.0015	<.0001	<.0015	<.0015	<.0015
Error	30								
Cepa	8	<.0052	<.0015	<.0001	<.0015	<.0001	<.0015	<.0015	<.0015

*Dds = Días después de la siembra de chile (*Capsicum annuum* L.)

*Dd1 = Días después de la primera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd2 = Días después de la segunda inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd3 = Días después de la tercera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd4 = Días después de la cuarta inoculación de *Trichoderma* spp.

Bio = Bioensayo.

ANEXO 11. Resumen del análisis de varianza del área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS) de la marchitez de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Puebla., tratadas con *Trichoderma* spp. e inoculadas con *Phytophthora capsici*. en experimentos con suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	21	<.0001	<.0001
Error	242		
Cepa	21	<.0001	<.0001

ANEXO 12. Resumen del análisis de varianza del área bajo la curva del número acumulado de las plantas muertas de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Puebla., tratadas con *Trichoderma* spp. e inoculadas con *Phytophthora capsici*. en experimentos con suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F
Modelo	21	<.0001
Error	22	
Cepa	21	<.0001

ANEXO 13. Resumen del análisis de varianza del número de raíces con *Trichoderma* spp. en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo Puebla., inoculadas con *Phytophthora capsici*. en suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	21	<.0001	<.0001
Error	66		
Cepa	21	<.0001	<.0001

ANEXO 14. Resumen del análisis de las unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* spp. de la etapa de suelo, en la rizósfera de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo preinoculadas con cepas de *Trichoderma* spp. en fase de vivero, a 48 días después del trasplante y 45 días de la reinoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. e inoculadas con *Phytophthora capsici* en suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	21	<.0001	<.0001
Error	126		
Cepa	21	<.0001	<.0001
Reinoculación de <i>Trichoderma</i> spp.		.0004	.0004
Cepa*Reinoculación de <i>Trichoderma</i> spp.		.0277	.0277

ANEXO 15. Resumen del análisis de varianza del peso seco de la raíz de plantas de chile cv. Criollo de Tetela de Ocampo con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y con *Phytophthora capsici* en suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (18 *Ddt y 15 *Dd1)		P > F (33 *Ddt y 15 *Dd2)		P > F (45 *Ddt y 15 *Dd3)	
		Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
Modelo	9	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Error	30						
Cepa	8	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

*Ddt = Días después del trasplante de chile (*Capsicum annuum* L.)

*Dd1 = Días después de la primera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd2 = Días después de la segunda inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd3 = Días después de la tercera inoculación de *Trichoderma* spp.
 Bio = Bioensayo.

ANEXO 16. Resumen del análisis de varianza del peso seco de la parte aérea de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y con *Phytophthora capsici* en suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (18 *Ddt y 15 *Dd1)		P > F (33 *Ddt y 15 *Dd2)		P > F (45 *Ddt y 15 *Dd3)	
		Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
Modelo	9	<.0001	<.0001	<.0001	<.0004	<.0004	<.0004
Error	30						
Cepa	8	<.0001	<.0001	<.0001	<.0004	<.0004	<.0004

*Ddt = Días después del trasplante de chile (*Capsicum annuum* L.)

*Dd1 = Días después de la primera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd2 = Días después de la segunda inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd3 = Días después de la tercera inoculación de *Trichoderma* spp.

ANEXO 17. Resumen del análisis de varianza del peso seco de raíz / parte aérea, de plantas de chile cv. criollo de Tetela de Ocampo con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. e inoculadas con *Phytophthora capsici* en suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (18 *Ddt y 15 *Dd1)		P > F (33 *Ddt y 15 *Dd2)		P > F (45 *Ddt y 15 *Dd3)	
		Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
Modelo	9	<.0007	<.0007	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Error	30						
Cepa	8	<.0007	<.0007	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

*Ddt = Días después del trasplante de chile (*Capsicum annuum* L.)

*Dd1 = Días después de la primera inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd2 = Días después de la segunda inoculación de *Trichoderma* spp.

*Dd3 = Días después de la tercera inoculación de *Trichoderma* spp.

Bio = Bioensayo.

ANEXO 18. Resumen del análisis de varianza del área foliar de plantas sanas de chile (*Capsicum annuum* L.) cv. criollo de Tetela de Ocampo, a 48 días después del trasplante y 45 días de la reinoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. e inoculadas con *Phytophthora capsici* en suelo.

Fuente de variación	Grados de libertad	P > F (Bioensayo 1)	P > F (Bioensayo 2)
Modelo	21	<.0001	<.0001
Error	242		
Cepa	21	<.0001	<.0001

ANEXO 19. Confrontación dual de cepas de *Trichoderma* spp. reaisladas de suelo contra aislados de la cepa original en medio de cultivo extracto de malta agar. R= cepa de *Trichoderma* spp. reaislada de suelo al final del experimento (48 días después del trasplante y 45 días de la reinoculación con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en suelo).

