

MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE *Trichoderma asperellum*, Y SU EFECTO SOBRE *Phytophthora capsici* EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE CHILE PIMIENTO (*Capsicum annuum*)

YANIS LICET MUÑOZ GONZÁLEZ

TESIS

Presentada como requisito para

Obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro



Saltillo, Coahuila, México, Marzo de 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**“MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE *Trichoderma asperellum*, Y
SU EFECTO SOBRE *Phytophthora capsici* EN EL DESARROLLO DE
PLANTAS DE CHILE PIMIENTO (*Capsicum annuum*)”**

T E S I S

YANIS LICET MUÑOZ GONZÁLEZ

**Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
COMITÉ PARTICULAR**

Asesor Principal:




Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor:




Dr. Gabriel Galegos Morales

Asesor:



Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Posgrado
Saltillo, Coahuila, México, Marzo de 2015

COMPENDIO

MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE *Trichoderma asperellum*, Y SU EFECTO SOBRE *Phytophthora capsici* EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE CHILE PIMIENTO (*Capsicum annuum*)

POR:

YANIS LICET MUÑOZ GONZALEZ

MAESTRA EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE DE 2014

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo –Asesor-

Palabras clave: Extractos; Microencapsulados, control biológico; Antagonista.

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en producción de chile, este cultivo se ve afectado por varias enfermedades, una de ellas es ocasionada por *Phytophthora capsici*, causando pérdidas de un 60 hasta un 100%. Actualmente, las medidas utilizadas para el control de enfermedades del suelo es a base productos químicos. Sin embargo, el uso inadecuado de estos ha tenido grandes consecuencias. Debido a esta problemática y ante la necesidad de encontrar alternativas amigables con los ecosistemas, el trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad antagonista de *Trichoderma* y la obtención de microencapsulados con extractos (MCE) para analizar su efectividad biológica contra *P. capsici* y su posible acción promotora de

crecimiento y desarrollo en plantas de chile. Para determinar la actividad antagónica se utilizarón cuatro cepas de *Trichoderma* spp. (T10, T31, T11 y T4). Sobre *P. capsici* bajo condiciones “*in vitro*”, las cuales fueron evaluadas por la escala de Bell *et al.*, (1982), días a contacto y porcentaje de inhibición. Posteriormente se midió el efecto del extracto de las dos mejores cepas de *T. asperellum* (T10 y T31) a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial de *P. capsici*. En seguida se realizó la microencapsulación del extracto de *T. asperellum*; estos MCE fueron aplicados a las macetas al momento del trasplante de plantas de chile pimiento cv. California Wonder; enseguida a los 8 ddt las plantas fueron inoculadas con zoosporas de *P. capsici*. Las variables analizadas fueron: incidencia y severidad de la enfermedad, contenido de clorofila, altura de plantas, área foliar, longitud de raíz, biomasa seca aérea y radicular. Los resultados obtenidos *in vitro* revelaron que las cepas T10 y T31 inhibieron significativamente la actividad fúngica de *P. capsici* agente causal de la marchitez del chile y los MCE de *T. asperellum* (T10 y T31) en casa sombra mostraron biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir significativamente la actividad infectiva de *P. capsici*; además las microcápsulas con extractos (MCE) estimularon el desarrollo de plantas. Se concluye que los MCE de *T. asperellum* son eficaces agentes de biocontrol contra patógenos del suelo, también tienen actividad de biofertilizante, ya que estimularon notablemente el crecimiento y rendimiento de plantas de chile en comparación con los tratamientos testigo.

ABSTRACT

MICROENCAPSULATION *Trichoderma asperellum* EXTRACTS AND ITS EFFECT ON *Phytophthora capsici* IN DEVELOPMENT OF PLANTS CHILE PEPPER (*Capsicum annum*)

BY:

YANIS LICET MUNOZ GONZALEZ

MASTER OF SCIENCE IN
AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Saltillo, Coahuila, DECEMBER 2014

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo -Adviser-

Keywords: Extracts, microencapsulates, biological control, antagonist.

Mexico ranks second worldwide in pepper production. This crop is affected by various diseases, one of which is caused by *Phytophthora capsici*, causing losses of 60 to 100%. Currently, the measures used to control soil diseases is based on chemicals. However, improper use of these has had major consequences. Due to this problem and the need to find friendly alternatives to ecosystems, research is conducted to determine the antagonistic activity of

Trichoderma and obtaining microencapsulated extracts (MCE) to analyze its biological effectiveness against *P. capsici* and its possible promoting action of growth and development in pepper plants. To determine the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. four strains were used, (T10, T31, T11 and T4) on *P. capsici*, under conditions "in vitro", which were evaluated by the scale of Bell et al., (1982), days to contact and percent inhibition. Subsequently, the effect of the extract of the two main strains of *T. asperellum* (T10 and T31) at different concentrations on the mycelial growth of *P. capsici* was measured. Then microencapsulation extract of *T. asperellum* was performed; these MCE were applied to the pots at transplanting time to chile pepper plants cv. California Wonder; then at 8 days after transplant (ddt) the plants were inoculated with zoospores of *P. capsici*. The variables analyzed were: incidence and severity of the disease, chlorophyll content, plant height, leaf area, root length, aerial and root dry biomass. The results obtained in vitro revealed that the T10 and T31 strains significantly inhibited fungal activity of *P. capsici*, causal agent of wilt chile and MCE of *T. asperellum* (T10 and T31) showed biocontrol in greenhouse shade cloth since reduced the incidence and severity of the disease to significantly inhibit the infectious activity of *P. capsici*; besides microcapsules with extracts (MCE) stimulated the development of plants. We concluded that MCE of *T. asperellum* are effective biocontrol agents against soil pathogens, also have activity biofertilizer, as they greatly stimulated the growth and yield of pepper plants compared to control treatments.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro: mi alma Terra Mater, quien me abrió las puertas una vez más y me brindó la oportunidad de realizar otro sueño. Hoy reafirmo que no me equivoque en haberla elegida, simplemente porque siempre estaré orgullosa de ella.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo: por haberme aceptado como su alumna y haberme ayudado en todo momento a ser mejor investigadora. Por esos momentos que me hizo sufrir y por otros tantos que me hizo reír. Quiero que sepa que le agradezco que siempre exija lo mejor de mí.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales: por su disposición y amabilidad cada vez que me acerque a él, por compartir sus conocimientos y por su colaboración a la investigación.

Al Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar: por aceptarme en su laboratorio y permitirme aprender y trabajar en dicha área, también por su valiosa participación en este proyecto y los conocimientos aportados.

A la Dra. Marcela Hernández: quien siempre estuvo atenta en ver que no me faltara nada para la culminación de este trabajo, por haberme brindado su amistad, por sus consejos y comentarios al trabajo.

Al CONACYT

Por el apoyo económico para la realización del postgrado.

POR SIEMPRE BUITRES...SIEMPRE BUITRES DE LA NARRO!!

DEDICATORIA

A Dios: definitivamente porque siempre me ha acompañado en los momentos de triunfos y fracasos y que a pesar de las adversidades siempre me da los medios necesarios para encontrar una salida, gracias por nunca dejarme sentirme sola.

A mis Padres

Livia Antonieta González Juárez: por darme la vida y ser mi guía, la luz que siempre me ilumina, por tus sacrificios y tu motivación constante, por tus sabios consejos que a pesar de la distancia en corazón siempre estuvimos juntas, y por enseñarme que todo en la vida se logra con esfuerzos. Fuiste y eres cómplice de cada sueño, gracias mami por enseñarme que el amor es la fuerza más grande que existe y sobre todo por tu ejemplo de cómo ser una gran mujer. Te amo Mami! (Tu pequeña).

Elmer Muñoz Díaz: Gracias por tus consejos y a enseñarme a nunca rendirme ante los problemas, a valirme por mí misma, a ser fuerte, formando una mujer de bien, Papi te amo!.

A mis hermanas y hermanos

Les agradezco todo su apoyo incondicional que me han brindado en todo momento y siempre han estado a mi lado, han compartido todo esos secretos y aventuras que solo se pueden vivir entre hermanos y que han estado siempre alerta ante cualquier problema que se me pueda presentar, porque me han demostrado su amor inigualable, y espero que sigamos así de unidos, los amo.

A mis amigos

A las grandes amistades que no se deterioran al paso de los años, gracias por abrirme las puertas de su corazón, por compartir alegrías y tristezas, por los corajes que hemos pasado juntos y no nos separan, les deseo lo mejor de todo corazón y que sigan luchando por sus sueños, los llevo en mi corazón: Roberto Morales, Diana Sifuentes, Beto Coutiño, Elizabeth Ramírez, Melchor Padilla, Armando Hernández, Juanita Cruz, Ing. Julio Charles, Marco Villanueva, Adrián Hernández, Ing. Jose Luis, Lucero y Ana (las gemes), Lic. Pedro Morales, Jimmy.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
El Cultivo del Chile y su Importancia.....	5
Condiciones que favorecen al cultivo.....	6
Daños Causados por Enfermedades.....	7
Importancia económica de <i>Phytophthora capsici</i>	8
Etiología.....	9
Epidemiología.....	10
Sintomatología.....	10
Mecanismos empleados por <i>Trichoderma</i> en el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos.....	11
Antagonismo.....	12
Competencia.....	13
Competencia por Nutrientes.....	13
Micoparasitismo.....	14
Antibiosis.....	15
Inducción de resistencia.....	17
Usos de <i>Trichoderma</i> spp.....	18
La Microencapsulación.....	20
Artículo 1 Efecto de la actividad antagonista de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Phytophthora capsici</i> bajo condiciones “ <i>in vitro</i> ”.....	22
Artículo 2 Biocontrol de <i>Phytophthora capsici</i> en el cultivo de pimiento con microcapsulas conteniendo extractos de <i>Trichoderma asperellum</i>	41
CONCLUSIÓN	62
LITERATURA CITADA	63

INTRODUCCIÓN

La producción de chile a nivel mundial se localiza principalmente en China, México, Turquía, España, Estados Unidos, Nigeria e Indonesia (SNITT, 2003). En México durante el ciclo agrícola de 2011, se sembró una superficie total de 152,742.37 ha de chile verde, de las cuales se obtuvieron 2, 131,739.73 ton (SIAP, 2011). Con facilidad podría pensarse que México es el principal productor mundial, ya que posee la mayor variedad genética del género *Capsicum*, sin embargo no es así, ocupa el segundo lugar después de China debido a los bajos rendimientos que registra que oscilan alrededor de 10 ton/ha (SNITT, 2003). La disminución de la producción es consecuencia de diversos factores, entre los que destacan los climáticos, edáficos, plagas y enfermedades. Una de las enfermedades más comunes por el daño causado a esta hortaliza son los hongos y stramenopilas habitantes del suelo que subsisten en las plantas vivas, y que pueden dañar las raíces y otras partes subterráneas de las plantas e inferir seriamente su desarrollo. Entre los patógenos del suelo que causan grandes pérdidas están: *Phytophthora*, *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, los que afectan una gran cantidad de cultivos como: chile, arroz, cacahuate, cafeto, cebolla, tomate, papa etc. (Agrios, 2005; Hernández, et al., 2005). De estos patógenos *P. capsici* puede llegar a causar pérdidas anuales de un 60 a 100% en el cultivo de chile (Guillen *et al.*, 2006).

El método de control más empleado contra la secadera del chile es el químico. Sin embargo, el uso inadecuado de estos fungicidas ha generado serios problemas de contaminación ambiental, toxicidad e inducido resistencia en los hongos. En la actualidad, la producción agropecuaria se enfoca hacia una agricultura sostenible, donde se optimicen los recursos naturales, se use la menor cantidad de productos químicos posible y se potencialice el empleo de productos microbianos y hasta donde sea alcanzable se realice una agricultura orgánica; donde los microorganismos jueguen un papel importante en este esquema de la producción. En particular, el uso de especies del género *Trichoderma* spp. ha merecido su atención y ha sido ampliamente documentado como agente de biocontrol, promotor de crecimiento y de inducción de resistencia de cultivos hacia enfermedades (García *et al.*, 2006).

La agricultura orgánica ó ecológica ha adquirido gran importancia en las últimas décadas, caracterizándose por la no utilización de productos de síntesis química y por emplear sólo insumos naturales y prácticas agroecológicas. Así también, la producción actual de alimentos busca que estos se encuentren libres de residuos tóxicos que ponen en riesgo la salud humana, además de la mayor concientización de la necesidad de proteger al medio ambiente; aunado a ello el costo de producción agrícola se incrementa por la aplicación de fertilizantes cada vez más caros (Vázquez, 2009).

Durante la década pasada se ha impulsado en la agricultura el uso de polímeros naturales como agentes inoculantes de hongos promotores de

crecimiento. La microencapsulación con biopolímeros protege a los microorganismos de diferentes factores ambientales y permite a la célula continuar con su desarrollo y metabolismo; estos microorganismos son liberados gradualmente cuando el biopolímero es degradado por la humedad y el pH del suelo. El alginato producido por *Macrocystis pyrifera* es el más comúnmente utilizado para la encapsulación de células por su gran estabilidad. Además puede ser almacenado a temperatura ambiente por periodos prolongados y manipularse fácilmente (Yabur, *et al.*, 2006).

Debido a que la microencapsulación de microorganismos antagonistas ha demostrado su efectividad en el control de fitopatógenos de algunos cultivos; estos representan una alternativa viable a ser evaluada como formulación de agentes de control biológico para disminuir la incidencia y severidad de las enfermedades (Hernández, 2008). Dado a lo anterior, en esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antagonista de *Trichoderma* y la obtención de microencapsulados con extractos (MCE) para analizar su efectividad biológica contra *P. capsici*. y su posible acción promotora del crecimiento y desarrollo en plantas de Chile.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *P. capsici* bajo condiciones *in vitro*.
- Obtener microencapsulados que contengan extractos de *Trichoderma* y determinar su efecto sobre *P. capsici* y en plantas de pimiento cv. California Wonder

HIPÓTESIS

Los microencapsulados conteniendo extractos de *Trichoderma* puedan representar una opción para el control biológico de *P. capsici*, así como servir de agentes orgánicos promotores del crecimiento en plantas de pimiento cv. California Wonder.

REVISION DE LITERATURA

El Cultivo del Chile y su Importancia

En México el chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes y el de mayor consumo popular, especialmente en estado fresco, aunque también se consume procesado en forma de salsas, polvos y encurtidos. En nuestro país existe una gran diversidad de chiles de diferentes tipos en cuanto a forma, sabor, color y tamaño (Monreal, 2008). En México hay especies no presentes en otros lugares del mundo, por lo que es considerado centro de origen del género *Capsicum annum* (Baltazar, 1995).

Durante 2009, el volumen de producción mundial de chiles y pimientos superó 30 millones de ton, con los rendimientos más significativos en China y en México como segundo lugar, seguido por Turquía, Indonesia, España y EUA (Productores de Hortalizas, 2010). Nuestro país logró exportar en el año 2008 más de 225 mil ton (INEGI, 2008).

En la actualidad el consumo de chiles picosos es cada vez más generalizado en diferentes países. Para dar una idea de la magnitud que ha adquirido este cultivo, tan solo de 1994 al 2008 se tuvo un incremento en consumo de 41%. México es el país donde se tiene la mayor variabilidad de chiles, que

aportan diferentes colores, aromas y sabores que satisfacen la demanda de productos para consumo fresco, deshidratados y para proceso industrial (López, 2009).

México mantiene su liderazgo como exportador de chile, lo cual se sustenta en el hecho de que en el 2013, del total de la producción nacional, alrededor de 700 mil toneladas se destinaron al mercado exterior, con una generación de divisas por 720 millones de dólares. A este cultivo se dedican 12 mil productores, y en él se generan alrededor de 30 millones de jornales al año; aún así actualmente se requiere mejorar la competitividad para mantener y ganar espacios en los anaqueles y continuar en la preferencia de los consumidores, quienes son cada vez más exigentes (Ruiz, 2009).

Condiciones que Favorecen al Cultivo

El cultivo se adapta muy bien a altitudes de 0 hasta 2,300 msnm, se desarrolla bien a temperaturas de 15° a 30 °C, a temperaturas mayores la formación de frutos es mínima. La temperatura óptima del suelo para germinación es de 18–30 °C, la humedad relativa óptima es de 70 a 90%. El cultivo requiere precipitaciones pluviales de 600 a 1200 msnm. Las lluvias intensas durante la floración ocasiona la caída de flor por golpe de agua y mal desarrollo de frutos y durante la fructificación ocasiona pudriciones por algunos hongos, una sobredosis de agua induce al desarrollo de enfermedades fungosas en la planta (Orellana *et al.*, 2007).

Este cultivo es de días cortos, ya que su floración es mejor y más abundante, se exige un fotoperiodo de 12 a 15 h por día, en plántula es un cultivo tolerante a la sombra, en semillero la utilización de hasta un 55% de sombra aumenta el tamaño de las plantas lo que favorece la producción en el campo de mayor número de frutos de tamaño grande (Orellana et al., 2007).

Daños Causados por Enfermedades

En México, la producción del cultivo es afectada por diversos organismos patógenos causantes de siniestros parciales o totales, dentro de estos se encuentran hongos, bacterias, virus y nematodos cuyos daños pueden variar de acuerdo en la región donde se ubiquen (Avelar, 1989; Guigon *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2001). Como consecuencia, algunas regiones productoras importantes han disminuido la superficie de siembra o la producción se ha desplazado a nuevas áreas (Avelar, 1989).

Es reconocida la susceptibilidad de los diferentes tipos de chile a numerosas enfermedades que afectan la calidad y los rendimientos, llegando a causar cuantiosas pérdidas (Guigon *et al.*, 2001).

En México frecuentemente, se aíslan hongos y stramenopiles fitopatógenos como *Phytophthora capsici* (67%) y *Fusarium* spp. (42%), mientras que *Rhizoctonia solani* se aísla en una proporción muy baja. Diversos autores mencionan otras enfermedades como *Stemphylium solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Xanthomonas vesicatoria*, *Cercospora capsici*; nematodos como

Nacobbus aberrans y *Meloidogyne* spp.; virus como el rizado amarillo también conocido como enchinamiento, virus jaspeado de tabaco, virus mosaico del tabaco, virus mosaico del pepino los cuales son transmitidos por mosquita blanca y pulgón verde; y el virus permanente el cual es transmitido por el pulgón saltador o Paratrioza. (Rico *et al.*, 2001; Rico, 2002; Álvarez y Delgadillo, 2004; Gonzales *et al.*, 2004; Agrícola Nayarit, 2005; Guillen *et al.*, 2006; INIFAP, 2010).

Importancia económica de *Phytophthora capsici*

Este fitopatógeno, fue encontrado por primera vez en Nuevo México, E.U.A., atacando el cultivo de chile. En México fue descrito por Galindo en 1956, atacando plantaciones de chile en los campos de la Escuela de Agricultura de Chapingo, México y en los años siguientes se encontró en calabaza y calabacita en la misma región (Romero, 1988).

P. capsici es el principal causante de la marchitez del chile de plantas en etapas de prefloración y en estado de maduración del fruto; a nivel nacional se le ha asociado como el patógeno responsable de la disminución de los rendimientos, ocasionando pérdidas considerables bajo condiciones de lluvias frecuentes. Algunos componentes de esta interacción planta-patógeno se ha identificado, como la capciseina, una elicítina producida por *P. capsici* y enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas en *capsicum annum*, sin embargo, poco se conoce de las bases moleculares de la patogenicidad de este hongo (Bailey *et al.*, 2001).

Etiología

El ciclo biológico de este patógeno inicia con la germinación de las oosporas mediante un tubo germinativo que termina en un esporangio después de haber pasado su periodo de reposo (Ramírez *et al.*, 1980). El micelio es completamente desarrollado, con hifas cenocíticas y robustas. Los esporangios son ratificados y generalmente ovoides, piriformes, limoniformes, elipsoides, esféricos o irregularmente elongados, con papilas prominentes, simples y apicales, algunas veces con más de tres y variablemente dispuesta; su germinación normalmente es por zoosporas y bajo condiciones especiales por tubos germinativos. El tamaño del esporangio es extremadamente variable midiendo de 35 a 85 μ . Es una especie con oogonios esféricos, terminales, anteridios claviformes, terminales, anfígenos, oosporas lisas y apleróticas (Alexopoulos *et al.*, 1996). También produce clamidiosporas esféricas como estructuras de resistencia a las condiciones adversas (Nuez *et al.*, 2003).

La enfermedad se caracteriza por la presencia de zoosporas de tipo A1 y A2 capaces de nadar en agua y responsables en buena medida de la diseminación e infección del alga, o pueden existir dos micelios compatibles (A1 y A2) y aparearse para formar las oosporas, o continuar con el ciclo asexual formando esporangios en los tejidos infectados para luego liberar zoosporas y continuar con el ciclo siguiente, dentro del cual el agua de riego juega un papel importante, además de ser capaz de diseminar el inoculo en el campo, su exceso favorece el desarrollo de la enfermedad, siendo los ataques más graves en riego

rodado que riego por goteo, siendo este una posible vía de entrada del fitopatógeno en el campo (Gómez *et al.*, 2000).

Epidemiología

P. capsici puede sobrevivir en el suelo por medio de clamidiosporas (esporas de conservación que dan origen a las infecciones primarias) o sobre restos vegetales. En efecto, el alga puede vivir saprofiticamente sobre los restos descompuestos de la planta; con los riesgos sucesivos, produce esporangios que, distribuidas por el agua van diseminando la enfermedad (Nuez *et al.*, 2003). *P. capsici* es un patógeno sumamente agresivo a una temperatura óptima de 25 a 28 °C y alta humedad, ya que puede destruir campos enteros de chile, calabaza, pepino, tomate, etc., en un tiempo corto, debido a su gran velocidad de crecimiento y abundante esporulación (Pérez *et al.*, 2004).

Sintomatología

P. capsici puede provocar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. La podredumbre del cuello y la subsiguiente marchitez rápida son los síntomas más característicos. En el cuello de la planta enferma puede observarse una zona anular deprimida color negruzco que afecta primero los tejidos corticales y posteriormente a los vasculares. Esta lesión se desarrolla tanto en sentido ascendente como descendente a partir del punto de

infección y termina produciendo la asfixia de la planta. Este fenómeno también ha sido señalado produciéndose de una forma rápida de modo que las hojas se quedan colgando, pero conservando inicialmente su color verde. Infecciones a partir de puntos más altos en la planta suelen ser menos frecuentes. En estos casos se produce por salpicaduras de gotas de agua portadoras de zoosporas que pueden germinar sobre tallos, hojas y frutos, en estos a través de la inserción pedúncular o heridas (Nuez *et al.*, 2003).

Mecanismos Empleados por *Trichoderma* en el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos.

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas y patógenos interactúan con una amplia variedad de organismos. Estas interacciones pueden afectar significativamente la salud de las plantas de varias formas. Para comprender los mecanismos de control biológico, es útil apreciar las diferentes formas en que los organismos interactúan (Pal y McSpadden, 2006). Las poblaciones de dos especies pueden interaccionar de dos maneras básicas, que corresponden a combinaciones neutras, positivas y negativas (Odum *et al.*, 2008). Desde la perspectiva de la planta, el control biológico puede ser considerado como un resultado neto positivo, procedente de una variedad de interacciones específicas y no específicas (Pal y McSpadden, 2006).

Por su tipo de asociación los microorganismos presentan diferentes interacciones. Los tipos de interacciones entre dos especies son: a) amensalismo, en el cual una población es inhibida y la otra no se ve afectada; b) comensalismo,

en el cual una población se beneficia y la otra no se ve afectada; c) protocooperación (llamada también cooperación facultativa), en la cual ambas poblaciones se benefician por su asociación, aunque sus relaciones no son obligatorias; d) mutualismo, en el cual el desarrollo y crecimiento de ambas poblaciones se ve beneficiado, y ninguna de ellas puede sobrevivir en condiciones naturales sin la otra; e) Neutralismo, en el cual ninguna población es afectada por asociación con otra (Odum *et al.*, 2008), en contraste, el antagonismo entre organismos resulta en una forma negativa para uno u otro (Pal y McSpadden, 2006), f) Competencia del tipo de interferencia directa, en la cual ambas poblaciones se inhiben de manera activa una a la otra; g) competencia del tipo de uso de recursos, en la cual cada población afecta adversamente a la otra de manera indirecta en la lucha por recursos de poca abundancia; h) parasitismo y depredación, en la cual una población afecta adversamente a la otra por ataque directo (Odum *et al.*, 2008).

Antagonismo

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 predación, siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógenos el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo, los antagonistas producen antibióticos, actúan en

competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento, desarrollo y resistencia a fungicidas, y por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Ahmad y Baker, 1987; Klein y Eveleigh, 1998).

Competencia por Nutrientes

La competencia entre *Trichoderma* y otros microorganismos es por nitrógeno, fosfatos, carbohidratos, polisacáridos (almidón, laminarina, pectinas) y biopolímeros (celulosa, quitina) (Vera *et al.*, 2002; Stefanova *et al.*, 2009).

Ciertas especies de *Trichoderma* se han manipulado, para hacerlas más competitivas en la rizosfera, lo que ha sido observado en mutantes-UV y por fusión de protoplasmas de *Trichoderma harzianum*. Estas cepas han mostrando una mejor capacidad de biocontrol en comparación con las cepas de tipo silvestre o cepas padres (Guazzone *et al.*, 2010).

Micoparasitismo

El micoparasitismo es el ataque de un hongo a otro, es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales incluyendo reconocimiento, ataque y subsecuentemente penetración y muerte del hospedero, esto tiene especial relevancia cuando la presa es un patógeno de plantas, proporcionando una estrategia para el control biológico de fitopatógenos (Mohiddin *et al.*, 2010; Kubicek *et al.*, 2011).

En el primer paso del micoparasitismo, *Trichoderma* detecta al hongo hospedero y crece hacia él; la teledetección es al menos parcialmente debido a la expresión secuencial de enzimas degradadoras de pared celular en su mayoría quitinasas, glucanasas y proteasas (Inbar y chet, 1995; Harman *et al.*, 2004), en seguida ocurre una difusión de estas enzimas, así como la liberación de oligómeros de la pared celular del hongo hospedero y estos a su vez inducen la expresión de endoquitinasas fungitóxicas (Mach *et al.*, 1999; Brunner *et al.*, 2003), que se difunden y comienzan el ataque contra el hongo de destino antes de que realmente se haga el contacto (Viterbo *et al.*, 2002). Observaciones hechas por Singh *et al.*, (2005) consideran que el reconocimiento del micoparásito (*T. harzianum* y *T. viride*) a la superficie del hospedero (*M. phaseolina*) puede ser más probable debido a la interacción con lectinocarbohidratos.

Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* se fija al hospedero y puede enrollarse alrededor de él, enseguida los apresorios se forman sobre la superficie del hospedero (Harman *et al.*, 2004). Al final, ocurre la muerte

de la presa, como resultado de las acciones sinérgicas de metabolitos secundarios antifúngicos y enzimas hidrolíticas (amilasas, celulasas, proteasas, poligalacturonasas, glucanasas, esterases, quitinasas, entre otras) que son secretadas por la pared celular de *Hypocrea* / *Trichoderma* spp. Estos compuestos desintegran y perforan la pared celular del patógeno, ocurriendo la entrada directa de hifas de *Trichoderma* en el lumen del hongo blanco (Elad *et al.*, 1982; Reithner *et al.*, 2011; Druzhinina *et al.*, 2011; Anita *et al.*, 2012; Gruper y Seidl, 2012). Los genes que codifican las enzimas parecen útiles para producir plantas transgénicas resistentes a enfermedades y las enzimas mismas son beneficios para el control biológico y otros procesos (Harman, 2006).

Antibiosis

La antibiosis es la producción de metabolitos o antibióticos fúngicos, estos son toxinas que pueden ser nocivas para otros microorganismos a bajas concentraciones (Pal y McSpadden, 2006). Dichos metabolitos no solo actúan de forma directa contra los fitopatógenos, sino también de forma indirecta desempeñando un papel esencial en las respuestas de defensa de las plantas (Brotman *et al.*, 2010). Los metabolitos secundarios son en general divididos en varios grupos característicos; policétidos, terpenos, fenoles, alcaloides, que reflejan su origen y biosíntesis (Sivasithamparam y Ghisalberti, 2009).

Trichoderma spp. son una fuente rica de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (Ajith y Lakshmidivi, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012), generalmente los metabolitos volátiles inhiben el crecimiento de otros hongos sin hacer contacto

físico, por ejemplo se ha detectado, una lactona volátil con aroma a coco, probablemente 6 pentil- α -pirona (6PAP) que inhibe el crecimiento de *Phytophthora nicotianae*. Este metabolito volátil causo a nivel celular vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis. La 6 pentil- α -pirona (6PAP) producido por *Trichoderma* spp., inhibe el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* y reduce su capacidad reproductiva (Hernández *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2004; Osorio *et al.*, 2011; Stefanova *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios producidos por cepas comerciales de *Trichoderma harzianum* (T22 y T39) tienen diferentes actividades contra patógenos, lo que sugiere que los compuestos individuales puede tener modos específicos de acción. La T22 antraquinona mostró una actividad débil o nula contra los patógenos ensayados, en contraste la T39 butenolide y harzianopyridona mostraron actividad fuerte contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* incluso a bajas concentraciones. La T22 azaphilona era activo contra todos los patógenos de plantas ensayadas, mientras que la T39 butenolide era activo contra *G. graminis* var. *tritici* y *R. solani*, pero no contra *P. ultimum* (Vinale *et al.*, 2006).

El filtrado del cultivo del antagonista mostró la presencia de varios compuestos tales como N-phenylethylenediamine, el fenol, 2-(2-benzoxazolilo), ácido ftálico, dialilamina, 1, 2, 4, 5-tetrazina,3,6-bis(1-metiletil), propanal, 2-metiloxima, N-(2-propinil)-2,2-dimethylaziridine. El cromatograma de análisis de GC-MS determinó que el ácido ftálico, dialilamina y 1, 2, 4, 5-tetrazine3,6-bis (1-metiletil)

obtenido en el tiempo de retención de 20, 21 y 23, respectivamente mostró picos más altos. Estos metabolitos secundarios tal vez sirven al antagonista en la función de supervivencia al competir contra el patógeno. La secuenciación reciente del genoma de *T. virens* reveló que alberga más de 500 genes relacionados con el metabolismo secundario, muchos de ellos están en grupos. Sin embargo, hasta la fecha sólo unos pocos metabolitos se han caracterizado, en particular gliotoxina, gliotoxina dimetoxi, gliovirin, ácido heptelídico, viridin, viridiol y un peptaibol 18-mer (Mukherjee y Kenerley, 2010).

Inducción de resistencia

Se ha observado que *Trichoderma* coloniza las raíces de las plantas e inducen resistencia sistémica (Harman *et al.*, 2004). Estas especies son capaces de modificar beneficiosamente la respuesta de más de 10 diferentes dicotiledóneas y monocotiledóneas, que incluyen gramíneas, solanáceas y cucurbitáceas contra la infección causada por hongos (*R. solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., etc), bacterias (*Xanthomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, etc), e incluso virus (virus del mosaico del pepino) (Woo *et al.*, 2006).

Raíces tratadas con *Trichoderma* revelan la penetración del micoparásito, restringido principalmente a la epidermis y la corteza exterior. La colonización de *Trichoderma* dio como resultado el fortalecimiento de las paredes de las células epidérmicas y corticales y la deposición de las barreras recién formadas, estas

reacciones del huésped típicas se encuentran más allá de los sitios de penetración del hongo (Mukherjee *et al.*, 2008).

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en presencia de compuestos orgánicos volátiles (COVS) de *T. viride* eran más altas, más grandes, florecieron antes, y tenían más raíces laterales, que las no tratadas. También había aumentado la biomasa total (45%) y la concentración de clorofila (58%). Análisis de *T. viride* revelaron 51 COVS de los cuales alcohol isobutílico, alcohol isopentilo, y 3-metilbutanal eran más abundantes. Concluyeron en que los COVS emitidos por *T. viride* tiene efectos en la promoción del crecimiento de *A. thaliana* en ausencia de contacto físico directo (Hung *et al.*, 2013).

Especies de *Trichoderma* producen tricotecenos, especialmente *trichodermina* y *harzianum*, estos desempeñan una función importante en la sensibilización de la planta contra patógenos fúngicos, induciendo la expresión de genes de defensa pertenecientes a la vía del ácido salicílico y jasmonatos (Malmierca *et al.*, 2012).

Usos de *Trichoderma* spp.

En el ámbito agrícola *Trichoderma* es ampliamente utilizado como un biofungicida de hongos fitopatógenos de la raíz. En el mercado existe una gran cantidad de cepas capaces de controlar una gran variedad de especies de hongos, estas cepas pertenecen principalmente a las especies *T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens* (Mohiddin *et al.*, 2010). En general los formulados comerciales a base de la biomasa de *Trichoderma* spp. son derivadas de la

fermentación líquida y sólida. Los microencapsulados (MICS) de *Trichoderma* muestran un mejor efecto antifúngico que los formulados líquidos, además los MIC'S promueven el crecimiento y aumentan la tasa fotosintética de las plantas de Chile (Sriram *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2012).

Recientes investigaciones en la construcción y análisis de la función de *Trichoderma* transformado con genes de *Metarhizium* contra insectos, han reportado un incremento en la actividad de quitinasas y proteasas dando como resultado la disminución de crecimiento del gusano de seda y larvas del barrenador de maíz en un 23% (Chen y Li, 2010). Por otra parte varios aislamientos de *Trichoderma* revelan actividad nematocida contra *Meloidogyne* spp. teniendo como modo de acción, actividades enzimáticas, parasitismo directo, antibiosis y la resistencia inducida (Spiegel y Sharon, 2010).

También se ha logrado la modificación genética de cepas de *Trichoderma reesei*, para obtener Xilitol utilizando paja de cebada como materia prima. El Xilitol, es un edulcorante derivado de la D-xilosa, es actualmente muy demandado por las industrias (Dashtban *et al.*, 2013). Así mismo, se ha demostrado que *Trichoderma viride* es un adsorbente adecuado para la eliminación de plomo (Prasad *et al.*, 2013), cromo y cadmio de efluentes y suelos contaminados (Singh *et al.*, 2012).

La Microencapsulación

La microencapsulación de organismos ha sido considerada como una alternativa de inmovilización de células, a fin de que éstas puedan ejercer sus funciones en forma gradual. Algunas propiedades típicas de la microencapsulación han sido estudiadas, entre las que se puede señalar el contenido de microorganismos, tamaño de partícula y tiempo de germinación. Los microencapsulados se preparan mediante el método de coservación-separación de fases, utilizando una etapa intermedia de emulsión múltiple. Estas condiciones de preparación son adecuadas para no producir cambios en las propiedades biológicas generales del sistema. Debido a la protección que le otorga la matriz del hidrogel (Bashan et al., 2002).

Esta técnica puede ser considerada como una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de otros deterioros. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas. Dentro del término de microencapsulación, se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación, por ejemplo, la farmacéutica hace una distinción entre microcápsulas y microesferas dependiendo de cómo se encuentre distribuido el material encapsulado dentro de la partícula (Yoon y Kinam, 2004).

Diversos experimentos basados en polímeros han sido evaluados durante la década pasada, estos polímeros han demostrado ser portadores potenciales de bacterias siendo esta una gran ventaja práctica. La microencapsulación de células vivas las protegen contra diversos factores ambientales, además al ser incorporados al suelo son liberados gradualmente cuando el polímero es degradado (Hernández *et al.*, 2008; Yabur *et al.*, 2006).

Este tipo de formulaciones presenta muchas ventajas, ya que pueden almacenarse secas a temperatura ambiente por períodos prolongados, pueden ser manipulados fácilmente, ofrecen una calidad constante y un mejor ambiente de acuerdo con las necesidades específicas de las bacterias o del cultivo. Estos inóculos pueden ser mejorados con nutrientes y mejorar la sobrevivencia de la bacteria, especialmente con bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP). El alginato es el material comúnmente usado en la encapsulación de microorganismos para varios propósitos industriales (Hernández *et al.*, 2010).

Título principal: **Efecto de la actividad antagonista de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici* bajo condiciones “*in vitro*”.**

Effect of the antagonist activity of *Trichoderma* on *Phytophthora capsici* “*in vitro*” conditions.

2-Autores: Muñoz-González YL¹, FD Hernández-Castillo¹, M Hernández-Suárez¹, G Gallegos-Morales¹, RH Lira-Saldivar².

3- Direcciones institucionales: ¹ Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coah., México. CP. 25315.

² Departamento de Agroplasticultura, Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coah., México. CP. 25100.

4-Título corto: Actividad antagonista de *Trichoderma* sobre *P. capsici*.

5-Número total de figuras o cuadros: Contiene dos cuadros.

6-Dirección de correspondencia y e-mail del autor principal: Address
Correspondence to: Dr. F. Daniel Hernández-Castillo, e-mail:
fdanielhc@hotmail.com

7-No hay notas de pie de página

8-El procesador de palabras usado para preparar el manuscrito: Word.

Resumen. Uno de los problemas fitosanitarios más severos que enfrentan los productores de diversos tipos de chile en México y muchas partes del mundo es la marchitez de las plantas causada principalmente por *P. capsici*, los cuales se combaten principalmente con agroquímicos sintéticos, provocando con ello un severo impacto ambiental, toxicidad a los humanos y un incremento a los costos de producción. Con base en esta problemática y ante la necesidad de encontrar opciones más amigables con los ecosistemas, se realizó este trabajo de investigación con el objetivo de determinar la actividad antagónica de cuatro cepas de *Trichoderma* (T10, T31, T11 y T4). Sobre *P. capsici* bajo condiciones “*in vitro*”, las cuales fueron determinadas por la escala de Bell et al., (1982), días a contacto y porcentaje de inhibición. Posteriormente se midió el efecto del extracto de las dos mejores cepas (T10 y T31) a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial de *P. capsici*. Los resultados obtenidos revelaron que las cepas inhibieron significativamente la actividad fúngica de *P. capsici* agente causal de la marchitez del chile; las cepas T10 y T31 de *T. asperellum* alcanzaron hasta el 95.32 y 88.33 % de inhibición en los cultivos duales, y hasta el 96.65% empleando los extractos de la cepa T10 siendo esta última la mejor contra el alga fitopatógena, en comparación de las demás cepas.

Palabras claves: Antagonismo, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma*, extractos.

Abstract. One of the most severe phytosanitary problems faced by producers of various types of chile in Mexico and many areas of the world is the wilting of plants mainly caused by *P. capsici*, which are mainly fought with synthetic chemicals, thereby causing severe environmental impact, human toxicity and an increase in production costs. Based on this problem and the need to find more friendly options ecosystems, this research to determine the antagonistic activity of four strains of *Trichoderma* (T10, T31, T11 and T4) was performed, on *P. capsici* under conditions "in vitro", which were determined by the scale of Bell et al., (1982), contact days and percentage inhibition. Subsequently, the effect of the extract of the best two strains (T10 and T31) at different concentrations on the mycelial growth of *P. capsici* was measured. The results revealed that strains significantly inhibited fungal activity of *P. capsici*, causal agent for chile wilt; T10 and T31 of *T. asperellum* strains reached 95.32 and 88.33% inhibition in dual cultures, and up to 96.65% using extracts of strain T10, resulting this one the best against phytopathogenic alga, compared to the other strains.

Key words: Antagonism, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma*, extracts.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura en México está relacionado con la presencia de plagas y enfermedades en los cultivos. En nuestro país, como en otras regiones del mundo, una limitante importante en la producción de chile son las pudriciones de raíz (Perveen, 2012).

Muchos de los hongos habitantes del suelo subsisten en las plantas vivas y causan grandes pérdidas a diversos cultivos. Estos pueden dañar las raíces y otras partes subterráneas de las plantas e interferir seriamente en su desarrollo. Los patógenos del suelo que causan grandes pérdidas como: *Phytophthora capsici*, *Fusarium*, *Pytium* y *Rhizoctonia*, afectan una gran cantidad de cultivos entre los que encuentra el chile (Agrios, 2005). *P. capsici* puede llegar a causar pérdidas en la producción de chile de un 60% hasta un 100% cada año (Guillen *et al.*, 2006). Actualmente, una de las principales medidas para el control de las enfermedades del suelo es mediante el empleo de productos químicos, sin embargo, el uso indiscriminado de estos a tenido grandes consecuencias ya que se han encontrado aislamientos de hongos resistentes a fungicidas, como es el caso del ingrediente activo metalaxil en patógenos como *Phytophthora infestans* (Riveros *et al.*, 2003)

La incorporación de agentes de control biológico (antagonista) al suelo como *Trichoderma spp.*, tiene la ventaja de que este hongo presenta un amplio rango de actividad e induce la supresión de *Phytophthora capsici*, *Fusarium*

oxysporum y *Pythium ultimum*, entre otros (Arzate, *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007; Ezzayani *et al.*, 2004; Djonovic *et al.*, 2006). El amplio espectro de *Trichoderma* como antagonista de fitopatógenos es debido a sus distintos mecanismos de acción entre los que se encuentra el micoparasitismo, competencia (por espacio y nutrientes), la producción de metabolitos secundarios o enzimas (glucanasas, quitinasas) o la inducción de resistencia sistémica en plantas (Howell, 2003; Harman, 2006; Michel *et al.*, Mohiddin *et al.*, 2010; 2005; Tondje *et al.*, 2007). En las últimas décadas, la agricultura orgánica o ecológica ha adquirido gran importancia, ya que la producción actual de alimentos busca que estos se encuentren libres de residuos tóxicos que ponen en riesgo la salud humana, además de la cada vez mayor concientización de proteger al medio ambiente. Aunado a lo anterior, el costo de producción agrícola se incrementa por la aplicación de fertilizantes cada vez más caros.

La producción orgánica se caracteriza por la no utilización de productos de síntesis química, y por el empleo de insumos naturales y de prácticas agroecológicas (Harman, 2004; Vázquez, 2009). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *P. capsici* bajo condiciones “*in vitro*”, en la búsqueda de una alternativa biológica para el control de la pudrición de la raíz de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas de *Trichoderma*. Se emplearon cuatro cepas de *Trichoderma* aisladas de suelo de diferentes regiones agrícolas de México y conservadas en la colección de hongos en el laboratorio de fitopatología de la Universidad. La identificación de las especies de *Trichoderma* se realizó por amplificación y secuenciación del gen ribosomal 18S; éstas fueron *T. harzianum* (T4) y *T. asperellum* (T10, T11 y T31) (Osorio *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2011).

Incremento de microorganismos. Los microorganismos bajo estudio fueron incrementados en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), transfiriendo una porción de micelio de 5 mm de diámetro con medio PDA de *Trichoderma* y de *P. capsici*, encubándolos a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante dos días para *Trichoderma* y cinco días para *P. capsici*.

Determinación del antagonismo de *Trichoderma* sobre *P. capsici*. Se utilizó la técnica de Cherif (1990), cuantificando el porcentaje de inhibición entre el hongo antagonista y el fitopatógeno. En cajas Petri con PDA se depositó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo del fitopatógeno de cinco días de edad y en el otro extremo se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro con *Trichoderma* spp. Las cajas Petri se incubaron a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se observaron cada 24 h para cuantificar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el fitopatógeno. El antagonismo se clasificó según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) donde: Clase 1, *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo; Clase 2, *Trichoderma*

sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; Clase 3, *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ninguno domina al otro; Clase 4, el patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión por *Trichoderma*; Clase 5, el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del medio. El porcentaje de inhibición se determinó con la fórmula $PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$, donde: R1 es el radio mayor (radio del patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista) (Ezziyani *et al.*, 2004). El número de tratamientos para esta prueba correspondió a las cuatro cepas de *Trichoderma* spp. distribuidos bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9.1, las medias fueron comparadas con la prueba Tukey al 0.001 de significancia.

Efecto del extracto crudo de *T. asperellum* (T10 y T31) sobre el crecimiento micelial de *P. capsici*. Para la obtención de los extractos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados con medio de cultivo líquido a base de papa fresca-dextrosa más 20 g de sacarosa. Los matraces con 150 ml de medio se inocularon con cuatro discos de micelio y PDA de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* tomado del margen del crecimiento vigoroso del hongo de dos días de edad, y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante doce días. Después de este tiempo el sobrenadante de crecimiento se filtró primero en papel Watman No. 1, el filtrado se centrifugó a 15 000 rpm por 20 min,

y enseguida el sobrenadante se esterilizó una vez pasándolo por filtro milipore de 0.20 μm . Posteriormente, el extracto estéril se mantuvo en refrigeración a 4° C hasta su utilización. Para determinar la actividad de los extractos de *Trichoderma* sobre *P. capsici*, se prepararon cinco concentraciones: 100, 75, 50, 25 y 0 %, utilizando como solvente agua destilada estéril. De las concentraciones preparadas se colocaron 1000 μl en cajas de Petri vacías, enseguida se vertió el medio de cultivo PDA sin solidificar, las cajas se agitaron suavemente en forma circular por 10 ocasiones. Para cada concentración se establecieron cinco repeticiones y un testigo. Las cajas se dejaron en observación por 24 h. para verificar que no hubiese crecimiento del antagonista o de algún contaminante. Posteriormente se inocularon colocando en el centro un explante de 5 mm de diámetro de *P. capsici* de cinco días de edad, y se incubaron a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que el testigo llenó la caja Petri (ocho días). Se midió el crecimiento del hongo con un Vernier digital cada 24 h y se determinó el porcentaje de inhibición de *P. capsici* con la fórmula anteriormente mencionada. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×5 con 4 repeticiones. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9.1, las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey al 0.001 de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Determinación del antagonismo de *Trichoderma* sobre *P. capsici*. Los días a contacto entre las cepas de *Trichoderma* y *P. capsici* ocurre en dos días para las cepas T10 y T31 de *T. asperellum*; de acuerdo a la escala de Bell las dos cepas se ubican en la Clase 1, donde *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno. En las cepas T11 de *T. asperellum* y T4 de *T. harzianum* los días a contacto con *P. capsici* fue de tres días, ubicándose en la Clase 3 de Bell, esto es, *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ninguno domina al otro. El porcentaje de inhibición de crecimiento de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre *P. capsici* obtenidos cuando se desarrollaron en cultivos duales vario de 95.32 a 47.67% (cepa T10 y T11 de *T. asperellum* respectivamente) (cuadro 1). El resultado indica que el porcentaje de inhibición obtenido del crecimiento de *P. capsici* por las cuatro cepas de *Trichoderma* fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.001$), esto sugiere que la capacidad antagonista de *Trichoderma* es variable entre las cepas de la misma especie y entre especies. El efecto inhibitorio de las cepas puede ser atribuido a la capacidad que tiene cada una de ellas de producir enzimas como β -1,3-glucanasas, quitinasas, proteasas y celulasas, o por la producción de compuestos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden el crecimiento del patógeno; entre estos metabolitos se cita el ácido harzianico, la alamenticina, la tricholina y el 6-pentil-a-pirona, entre otros (Mohiddin *et al.*, 2010; Osorio *et al.*, 2011;). Los días a contacto reportados para *T. harzianum* contra *Sclerotium rolsfi*

oscilaron entre 2 y 3 días, mientras que para *Fusarium oxysporum* fue de hasta 5 días (Michel *et al.*, 2005). Para algunas cepas de *T. asperellum* (TC74, T341 y T359), el grado de inhibición del crecimiento de *R. solani* y *B. cinerea* inducida por *T. asperellum* varió de 44 a 64 % (Guigón *et al.*, 2010), mientras que en nuestro trabajo las cepas T10 y T31 de *T. asperellum* alcanzan una inhibición del 95.32 y 88.37 %, mostrando una mejor actividad antagonista contra *P. capsici*, que la reportada en la literatura para otros fitopatógenos.

Efecto del extracto crudo de *T. asperellum* (T10 y T31) sobre el crecimiento micelial de *P. capsici*. La inhibición del crecimiento del patógeno por el extracto de *T. asperellum* fue altamente significativa ($P \leq 0.001$) entre las dos cepas y entre las diferentes concentraciones estudiadas (cuadro 2). La inhibición mas alta se alcanzó con la concentración del extracto al 100 % ($P \leq 0.001$) con la cepa T10 de *T. asperellum* (96.65 %), esta cepa siempre mostro una mayor inhibición del crecimiento de *P. capsici* que la cepa T31 en todas las concentraciones estudiadas ($P \leq 0.001$). De acuerdo a lo reportado por diversos autores y considerando que los filtrados de *T. viride* y *T. harzianum* contra *Fusarium oxysporum* a la concentración de 50% solo inhibieron el 25.56 % y 17.43 %, y que los filtrados de *T. asperellum* al 50% sobre *F. verticilloides* a las dosis de 500 μ l y 1000 μ l no mostraron diferencias estadísticas y que solo inhibieron el 28.88% y 28.72% (Castro, 2011; Perveen y Bokhari, 2012), se puede considerar que las dos cepas de *T. asperellum* (T10 y T31) empleadas en la presente investigación muestran un adecuado nivel de inhibición del crecimiento de *P. capsici*, dado que

aún a la concentración mas baja (25 %) se obtuvo un 49.42 y 44.88 % de inhibición del patógeno.

CONCLUSIÓN

Las cepas de *Trichoderma asperellum* T10 y T31 utilizadas en esta investigación mostraron una adecuada efectividad antagonista contra el alga fitopatógena *Phytophthora capsici* causante de la pudrición de chile. Esto sugiere que pueden ser evaluadas para ser empleadas en el control biológico dentro de un manejo sustentable de la marchitez del chile.

REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 2005. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. 838p.
- Arzate, V.J., Michel, A.A.C., Dominguez, M.V.M. y Santos, E.O.A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *mycosphereella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del platano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 24 (2) 98-104.
- Bell, D. K., Well, H. D. and Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Journal of Phytopathology, 73 : 379-382.
- Castro, del A. E. 2011. Interacción de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Sin. *F. moniliforme* Sheld.) en diferentes materiales de maíz y evaluación *in vitro* con *Trichoderma* spp. como biocontrol. Tesis profesional. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México, P.31.
- Cherif, M., and Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. of *Fusarium oxysporum* f.sp radices-lycopercisi. Phytopatology 80:1406-1414.
- Correa, S., Mello., Ávila, Z.R., Minaré, B. L., Pádua, R.R. y Gomez, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. Para el control biológico de *Sclerotium Rolfsii* Sacc. Fitosanidad 11:3-8
- Djonovié, S., Pozo, M.M., and Kenerley, C.M. 2006. Tvbn3, a beta-1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol.72(12):6661-70.
- Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Sid, A. A., Emilia, R. A. y Maria, E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología, 26: 35-45.

- Guigón, L. C., Guerrero, P.V., Vargas, A. F., Carvajal, M. E., Ávila, Q. G.D., Bravo, L. L., Ruocco, M. L., 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 fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología, 28: 87-96.
- Guillen, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E. y Reyes, V. M. A. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Phytophthora capsici* Leonian, y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. Revista Mexicana de Fitopatología. 24:105-114.
- Harman, E.G.2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. Nature reviews, *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Journal Microbiology, 2:43-56.
- Hernández, C. F.D., Berlanga, P. A. M., Gallegos, M. G., Cepeda, S. M., Rodríguez, H. R., Castillo, F. 2011. *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6: 410-417.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the Biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: (1)4-10.
- Michel, A.A.C., reyes, De la C, A., Otero, S.M.A., Rebolledo, D.O., y Lezema, G.R. 2005. Potencial antagonico *Trichoderma* spp. Sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr.f. sp. Lycopersici (Sacc). Zinder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in vitro en invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 23:286-293.

- Mohiddin, F.A., Khan, M.R., Khan, S.M., Bhat, B.H. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. *Journal Plant Pathology*, 9: 92-102.
- Osorio, H. E., Hernández, C. F. D., 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*, 6:4594-4600.
- Perveen, K. Bokhari, N. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. *African Journal of Microbiology Research*, 6:3348-3353.
- Riveros, B.F., Sotomayor, R., Rivera, V., Secor, G., y Espinoza, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (montagne) de bary a metalaxil en cultivo de papas en el norte de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 63(2):117-124
- SAS System Copyright. 2002. Version 9.1 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. All Rights Reserved.
- Tondje, P.R. Roberts, D.P., Bon, M.C., Widmer.T., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fonten, D., and Hebbar., K.P. 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* wich potencial for suppression of black pod disease of cacao in cameroon. *Biological control* 43:202-212
- Vázquez, V. J. J. 2009. Determinación *in vitro* de las propiedades fungicidas de los acidos fúlvicos en *Fusarium moniliforme* (Sheldon) y *Trichoderma harzianum* (Rifai). Tesis de Licenciatura, Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 37 p.

Cuadro 1: Efecto de *Trichoderma spp* en la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* y clases de antagonistas de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, 1982.

Tratamientos	Inhibición del crecimiento (%)	Días a contacto	Escala de Bell
<i>T. asperellum</i> (T10)	95.32 a	2	1
<i>T. asperellum</i> (T31)	88.37 b	2	1
<i>T. harzianum</i> (T4)	57.50 c	3	3
<i>T. asperellum</i> (T11)	47.61 d	3	3
DHS ^{0.05}	3.891		
ANOVA ≤	<.001		
CV (%)	3.92		

DHS= Diferencia Honestamente Significativa; ANOVA=Análisis de Varianza; CV=Coefficiente de Variación.

Table 1: Effect of two species of *Trichoderma* in inhibiting mycelial growth of *Phytophthora capsici*, contact days, and antagonists classes according to the scale of Bell *et al.*, 1982.

Treatments	Inhibition of growth (%)	Days to contact	Scale of Bell
<i>T. asperellum</i> (T10)	95.32 a	2	1
<i>T. asperellum</i> (T31)	88.37 b	2	1
<i>T. harzianum</i> (T4)	57.50 c	3	3
<i>T. asperellum</i> (T11)	47.61 d	3	3
DHS ^{0.05}	3.891		
ANOVA ≤	<.001		
CV (%)	3.92		

Honestly Significant Difference = DHS; ANOVA = analysis of variance; CV = Coefficient of Variation.

Cuadro 2: Inhibición del crecimiento micelial de *P. capsici* con extracto crudo de *T. asperellum* (T10, T31), a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75, 100/ppm).

Tratamientos	Concentraciones (ppm)	Inhibición (%)
<i>T. asperellum</i> (T10)	100	96.65 a
<i>T. asperellum</i> (31)	100	75.88 b
<i>T. asperellum</i> (T10)	75	79.86 c
<i>T. asperellum</i> (31)	75	57.66 d
<i>T. asperellum</i> (T10)	50	56.38 e
<i>T. asperellum</i> (31)	50	52.88 f
<i>T. asperellum</i> (T10)	25	49.42 g
<i>T. asperellum</i> (31)	25	44.88 h
Testigo	0	0 i
DHS ^{0.05}	3.049	
ANOVA ≤	<.001	
CV (%)	2.33	

DHS= Diferencia Honestamente Significativa; ANOVA=Análisis de Varianza; CV=Coficiente de Variación.

Table 2: Inhibition of mycelial growth of *P. capsici* with crude extract of *T. asperellum* (T10, T31) at different concentrations (0, 25, 50, 75, 100 ppm).

Treatments	Concentrations (ppm)	Inhibition (%)
<i>T. asperellum</i> (T10)	100	96.65 a
<i>T. asperellum</i> (31)	100	75.88 b
<i>T. asperellum</i> (T10)	75	79.86 c
<i>T. asperellum</i> (31)	75	57.66 d
<i>T. asperellum</i> (T10)	50	56.38 e
<i>T. asperellum</i> (31)	50	52.88 f
<i>T. asperellum</i> (T10)	25	49.42 g
<i>T. asperellum</i> (31)	25	44.88 h
Testigo	0	0 i
DHS ^{0.05}	3.049	
ANOVA ≤	<.001	
CV (%)	2.33	

Honestly Significant Difference = DHS; ANOVA = analysis of variance; CV = Coefficient of Variation.

Biocontrol de *Phytophthora capsici* en el cultivo de pimiento con microcapsulas conteniendo extractos de *Trichoderma asperellum*.

Biocontrol of *Phytophthora capsici* in pepper crops with microcapsules containing extracts from *Trichoderma asperellum*.

2-Autores: Muñoz-González YL¹, FD Hernández-Castillo¹, G Gallegos-Morales¹, RH Lira-Saldivar².

3- Direcciones institucionales: ¹ Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coah., México. CP. 25315.

² Departamento de Agroplasticultura, Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coah., México. CP. 25100.

4-Título corto: Extractos de *Trichoderma asperellum* microencapsulados

5-Número total de figuras o tablas: contiene una figura y tres cuadros

6-Dirección de correspondencia y e-mail del autor principal: Address
Correspondence to: Dr. F. Daniel Hernández-Castillo, e-mail:
fdanielhc@hotmail.com

7-No hay notas de pie de página

8-El procesador de palabras usado para preparar el manuscrito: Word.

Resumen. Uno de los principales problemas fitosanitarios que enfrentan los productores de chile en México y en diferentes partes del mundo, es la marchitez causada por *Phytophthora capsici*, las cuales se combaten principalmente con agroquímicos sintéticos provocando con ello un severo impacto ambiental, toxicidad a los humanos y un incremento a los costos de producción. En base a esta problemática y ante la necesidad de buscar alternativas amigables con el medio ambiente se planteó el siguiente objetivo: analizar en condiciones de casa sombra el efecto de los microencapsulados con extractos de *Trichoderma asperellum* como biocontrol contra *P. capsici*, así como determinar su efecto en el desarrollo de plantas de chile pimiento cv. California Wonder. El extracto de dos cepas de *T. asperellum* (T10 y T31) se microencapsularon (MCE), estas microcapsulas fueron incorporadas en el fondo de la cavidad de la maceta para después colocar los cepellones de las plántulas. Posteriormente a los 8 ddt se realizó la inoculación de *P. capsici*. Las variables analizadas fueron: incidencia y severidad de la enfermedad, contenido de clorofila, altura de plantas, área foliar, longitud de raíz, biomasa seca aérea y radicular. Los resultados mostraron biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir significativamente la actividad infectiva del fitopatógeno, además los MCE estimularon el crecimiento de plantas. Con base en los resultados obtenidos se concluye que las microcápsulas conteniendo extractos de *T. asperellum* pueden ser un eficaz agente de biocontrol contra patógenos del suelo y pueden tener

actividad biofertilizadora, ya que estimularon notablemente el desarrollo de plantas de chile pimienta en comparación con los tratamientos testigo.

Palabras clave: Control biológico, Extracto, microencapsulados, patógeno.

Abstract. One of the main phytosanitary problems faced by producers of chile in Mexico and around the world, is the wilt caused by *Phytophthora capsici*, which was mainly fought with synthetic agrochemicals thereby causing severe environmental impact, toxicity to humans and an increase in production costs. Based on this problem and the need to seek friendly alternatives for environment, it raised the following objective: to analyze in shade house conditions the effect of microencapsulates with extracts from *Trichoderma asperellum* as biocontrol against *P. capsici*, as well as determine their effect on plant development chili pepper cv. California Wonder. The extract of two strains of *T. asperellum* (T10 and T31) were microencapsulated (MCE), these microcapsules were incorporated into the cavity bottom of the pot and then placed the seedling root balls. Subsequently 8 days after transplant (dat) the inoculation of *P. capsici* was performed. The variables analyzed were: incidence and severity of the disease, chlorophyll content, plant height, leaf area, root length, aerial and root dry biomass. The results showed biocontrol since reduced the incidence and severity of the disease to significantly inhibit the infective activity of the pathogen, the MCE also stimulated the growth of plants. Based on the results obtained it is concluded that the microcapsules containing *T. asperellum* extracts can be an effective biocontrol

agent against soil pathogens and may have biofertilizer activity as markedly stimulated the development of chili pepper plants compared to control treatments.

Keywords: Biological Control, extract, microencapsulates, pathogen.

INTRODUCCIÓN

La sintomatología de la enfermedad conocida como marchitez del chile provoca la muerte prematura de las plantas, siendo causada principalmente por una obstrucción de los haces vasculares, ocurriendo la infección en las raíces o en la base del tallo, donde aparece una mancha marrón que posteriormente se ennegrece. Por lo general; esta enfermedad del chile (*capsicum annuum* L.) es causada por la actividad patógena de uno o varios hongos principalmente *Phytophthora capsici* , *Fusarium oxysporum* y *Rizoctonia solani*, entre otros agentes infecciosos. El primer síntoma de la enfermedad es un marchitamiento de las hojas sin cambios en su color, las cuales finalmente quedan colgadas de los peciolo. Las raíces y tallos afectados muestran una pudrición suave, acuosa e inodora, los tallos continúan erguidos con las hojas colgantes y cuando hay frutos estos se secan y se arrugan (González *et al.*, 2002).

Esta enfermedad se encuentra presente en todo el mundo (Yu *et al.*, 2010); en México se considera que es la más importante en este cultivo. Su presencia se ha reportado en todas las zonas productoras de chile, particularmente en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (García *et al.*, 2000; Guijón y González 2001). En condiciones favorables, la enfermedad puede causar pérdidas económicas desastrosas, habiendo lugares con daños de hasta el 100%. En entidades como Aguascalientes

y San Luis Potosí, la superficie total de siembra de chile se ha reducido en un 60% por causa de este problema (Rodriguez *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2002).

Se ha intentado controlar la enfermedad mediante diversas opciones que incluyen practicas agronómicas, uso de variedades resistentes y agroquímicos sintéticos, principalmente fungicidas, los cuales resultan ser muy dañinos para la salud humana y los ecosistemas, sin que con esto se pueda eliminar el problema (Hernandez *et al.*, 2011).

Durante la década pasada se ha impulsado en la agricultura el uso de polímeros naturales como agentes inoculantes de hongos y bacterias promotoras de crecimiento. La microencapsulación con biopolímeros protege a los microorganismos de diferentes factores ambientales y permite a la célula continuar con su desarrollo y metabolismo; estos microorganismos son liberados gradualmente cuando el biopolímero es degradado por la humedad y el pH del suelo. El alginato producido por *Macrocystis pyrifera* es el más utilizado para la encapsulación de células por su gran estabilidad. Puede ser almacenado a temperatura ambiente por periodos prolongados y manipularse fácilmente (Yabur, *et al.*, 2006). La microencapsulación de microorganismos ha demostrado su efectividad en el control de fitopatógenos de algunos cultivos, por lo que representan una alternativa viable para ser evaluados como alternativa de control biológico para reducir la utilización de productos químicos y disminuir la incidencia y severidad de las enfermedades (Hernández *et al.*, 2011). Considerando lo antes señalado, el objetivo de este trabajo fué: analizar en condiciones de una casa

sombra el efecto de los extractos microencapsulados de *Trichoderma asperellum* como biocontrol contra *P. capsici*, así como determinar su efecto en el desarrollo de plantas de chile pimiento cv. California Wonder.

MATERIALES Y METODOS

Obtención del extracto de *Trichoderma asperellum*. Para la obtención de los extractos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados con medio de cultivo líquido a base de papa fresca-dextrosa más 20 g de sacarosa. Los matraces con 150 ml de medio se inocularon con cuatro discos de micelio y PDA de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* tomado del margen del crecimiento vigoroso del hongo de dos días de edad, y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante doce días. Después de este tiempo el sobrenadante de crecimiento se filtró primero en papel Watman No. 1, el filtrado se centrifugó a 15 000 rpm por 20 min, y enseguida el sobrenadante se esterilizó una vez pasándolo por filtro milipore de 0.20 μm . Posteriormente, el extracto estéril se mantuvo en refrigeración a 4° C.

Preparación de los microencapsulados con extractos (MCE). La obtención de las microcápsulas se realizó empleando el método originalmente diseñado por Carrillo y Bashan (1997).

Para la formulación de las microcapsulas con extractos (MCE) se utilizarán 20 ml del extracto de *Trichoderma asperellum* (T10 y T31), el que se mezcló con 80 ml de alginato de sodio al 2% previamente esterilizado, y se dejó en agitación por 15 min para obtener una mezcla homogénea, se vació al contenedor del

microencapsulador y se inició la aspersión de la mezcla sobre una charola conteniendo Cloruro de Calcio (CaCl_2) al 2%. Al hacer contacto la mezcla con el CaCl_2 , se formaron instantáneamente las microcápsulas. Después se separaron los MCE de la solución utilizando papel filtro, se lavaron con solución salina al 0.85%, se retiró la solución salina con agua destilada y se colocaron en cajas conteniendo en el fondo papel filtro estéril, se secaron a 40°C por 72 h, posteriormente se colocaron en frascos y se almacenaron a temperatura ambiente.

Producción de la plántula. Las semillas de chile pimiento variedad California Wonder fueron lavadas con agua potable en un recipiente, se decantó el agua, y se adicionó una solución de tween 20 al 2 %, manteniéndolos en agitación durante 10 min, el tween se decantó, y se le adicionó una solución de NaClO_3 al 3% con agitación durante 5 min, se adicionó una solución de 100 ml de Tiosulfato de Sodio Pentahidratado al 2% para neutralizar el efecto de cloro manteniéndolas en agitación constante durante 5 min, se decantó el Tiosulfato de Sodio Pentahidratado al 2% y se lavaron las semillas 5 veces con agua destilada estéril. Finalmente se colocaron sobre papel absorbente hasta que secaron. Posteriormente, las semillas se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades, con sustrato peat-moss y perlita a una relación 1:1.

Inoculación de los microencapsulados con extractos (MCE) en plántula e inoculación del patógeno. El trasplante se realizó a los 30 días después de la siembra, estas se colocaron en bolsas de polietileno de 5 kg utilizando como

sustrato Peat-moss y perlita (1:1). Las macetas se colocaron bajo condiciones de casa sombra a una temperatura promedio de 24-26 °C, se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar con ocho repeticiones y cinco tratamientos, en los que se incluyeron microencapsulados con extractos (MCE) de *Trichoderma asperellum* de dos cepas (T10 y T31), caldo de papa (CP), también se incluyó como testigo químico (TQ) metalaxil a la dosis recomendada comercialmente y un testigo absoluto (TA). La aplicación de los MCE a las macetas se realizó al trasplante incorporando 1 g de microcapsulas en el fondo de la cavidad de la maceta para después colocar los cepellones de las plántulas. Posteriormente a los 8 días después del trasplante (ddt) se realizó la inoculación de *P. capsici*, colocando 1 µl de la suspensión de zoosporas de *P. capsici* a una concentración 1×10^7 zoosporas/ml a las raíces de las plantas.

Parámetros evaluados en plantas. A los 75 días después del trasplante (ddt) cuando el testigo presentó la enfermedad se midieron los parámetros: incidencia y severidad de la enfermedad causada por *P. capsici*; el contenido de clorofila con el medidor portátil marca Minolta SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development), altura de planta, área foliar, longitud de raíz, biomasa seca de parte aérea, y de raíz. Para la incidencia y severidad se observaron las plantas para detectar el número de plantas sanas o enfermas; considerándose enfermas aquellas que mostraban síntomas típicos de tallos con lesiones marrones o necróticas o marchites. La incidencia se expresó como porcentaje de las plantas enfermas; la determinación de la severidad del daño se realizó mediante la escala reportada

por Engelhard (1986) la cual establece una escala de 0-5 donde: 0, ningún síntoma visible en la hoja; 1, Clorosis o decoloración vascular en una o más hojas; 2, Clorosis o decoloración vascular o ambas, más daño en hojas o vástago o ambos; 3, Síntoma de la hoja marchita; 4, Síntoma de hoja marchita y reducido crecimiento de la planta; 5, Muerte de la planta. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9.1, las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey al 0.001 de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de los Microencapsulados con extractos (MCE) en Incidencia y Severidad. La incidencia de la enfermedad causada por *P. capsici* en las plantas que fueron inoculadas en la raíz fue inexistente en los tratamientos con MCE de *Trichoderma* (Cuadro 1), siendo estadísticamente inferior ($p \leq 0.001$) la incidencia observada en el testigo químico (TQ), caldo de papa (CP) y testigo absoluto (TA) los que alcanzaron un 75 y 100% de incidencia respectivamente. El índice de severidad alcanzado fue 0 para MCE de *T. asperellum*, de 2 para los tratamientos con CP y TQ, y de 5 para el testigo absoluto (planta muerta). Estos resultados evidencian la protección adecuada que proporcionan los extractos microencapsulados de las cepas de *T. asperellum* empleadas en estos bioensayos. Bajo esta perspectiva se confirma lo observado por Ezziyyani *et al.* (2004) donde utilizó filtrado de *Trichoderma harzianum* en plantas de Chile pimiento, y fue capaz de reducir hasta un 65% de la marchitez causada por *Phytophthora capsici*. (Sid *et al.*, 2000) menciona que el control de la marchitez se ha intentado mediante diversas alternativas culturales, genéticas, químicas y más recientemente empleando agentes biológicos.

Contenido de clorofila en plantas de pimiento. Los valores obtenidos en los tratamientos con los MCE fueron de 66.40 y 64.43 unidades SPAD (T10 y T31), mientras que para el testigo se obtuvieron 15.55 unidades SPAD. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos, la prueba de Tukey ($p \leq 0.001$) indica que los tratamientos microencapsulados con extractos MCE de *T.*

asperellum incrementan el contenido de clorofila en un 77.41% en relación al testigo (Figura 1). En este sentido Cedillo *et al.*, (2010) microencapsuló esporas de *Trichoderma asperellum* y *Bacillus subtilis* para el control de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de chile, reportando una lectura de donde únicamente alcanzo un 24.87%, sin embargo, en esta investigación se evidencia un mayor incremento de clorofila con el empleo de microencapsulados con extractos de *T. asperellum* comparados. Un mayor valor en la lectura de clorofila ha sido relacionado con un mayor contenido de nitrógeno en plantas de maíz (Anderson y Johnson, 1995) mostrándose un verde intenso en el color de hojas (Rodríguez *et al.*, 1998). Lo anterior puede sugerir que las plantas inoculadas con los MCE presentan un mejor estado nutricional que las plantas no tratadas, reflejando este resultado en un incremento de la clorofila.

Efecto de los Microencapsulados en altura de planta, área foliar y longitud de raíz. Los tratamientos aplicados mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.001$) en las variables altura, área foliar y longitud de raíz (Cuadro 2). En cuanto altura de plantas los MCE de la cepa T10 mostró ser mas eficaz para estimular crecimiento ($p \leq 0.001$), ya que reportó la mayor altura de planta (40 cm), mientras que el TA obtuvo el valor mas bajo con 23.50, aunque fue estadísticamente igual que el TQ y CP. Para el área foliar el mejor tratamiento fueron los microencapsulados con extractos de la cepa T10 (1030.37 cm^2), seguido de los MCE de la cepa T31 (654.38 cm^2), el tratamiento mas bajo fue el TA con alcanzar tan solo 93.97 cm^2 de área foliar. Para longitud de raíz los tratamientos que mejor estimularon su

desarrollo fueron los microencapsulados con extractos de T10 y T31 ($p \leq 0.001$) alcanzando 34.87 y 33.87 cm respectivamente y tan solo 8.37 cm obtenidos en TA.

Efecto de biomasa seca de parte aérea y raíz. La biomasa fue claramente estimulada con los MCE de *Trichoderma asperellum* (Cuadro 3). Las cepas T10 y T31 reportaron los máximos valores (4.42 y 3.66 gr) esto representa el 83.23 y 80% en biomasa seca de parte aérea, siendo estadísticamente superiores ($p < 0.01$) al resto de los tratamientos. Del mismo modo la biomasa seca de raíz resulto mayor en los tratamientos con MCE de *Trichoderma* alcanzando 14.02 y 11.55 gr (T10 y T31), mientras que el testigo solo peso 1.94 gr, esto representa un 86.17y 83.21% mas de biomasa en comparación con el testigo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Jaimes *et al.*, (2010) donde los tratamientos con MCE de *Trichoderma* produjeron significativamente raíces mas largas (85.6%), además del mayor peso seco de parte aérea superando 28.9% al testigo. Asi mismo Hernández *et al.* (2011) señala que los tratamientos MIC's con *Bacillus* produjeron mas bioamasa seca de la parte aérea y de raíz en un 86 y 27.90 % mas en comparación con los testigos.

Las microcápsulas de extractos de *T. asperellum* además de funcionar como agentes de control biológico de *P. capsici* también promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas así como la disponibilidad de fosforo y nitrógeno y la síntesis de reguladores de crecimiento como acido indolacetico, giberilinas y citocininas (García *et al.*, 2001) nuestros resultados indican un mejor desarrollo de

las plantas de pimiento confirmando el efecto positivo de los MCE de *T. asperellum* al incrementar de manera sustancial la altura, área foliar y longitud de raíz de las plantas de chile, estos resultados también han sido señalados por Jaimes et al. (2010) con plantas de chile inoculadas con MIC's de *T. asperellum* contra *F. oxysporum* al comparar con plantas no tratadas y donde alcanzaron 65% más de altura de planta y 49.5% de longitud de raíz. Por otra parte Fernandez, (2008) comprueba la viabilidad de las MIC's de *Trichoderma* con semillas de cebolla y concluye que existe un efecto de promoción de crecimiento en el cultivo por parte de los microorganismos. Esto se puede atribuir a que las microcapsulas tienen como resultado una liberación controlada de los microorganismos beneficios, a través de la degradación del polímero por otros microorganismos, humedad y pH de suelo (Hernandez *et al.*, 2011); así mismo, los MIC's también proporcionan una mayor vida de anaquel en comparación con las presentaciones líquidas (Gómez et al., 2008), comparando presentaciones sólidas, como polvo mojable y gránulos dispersables, en donde almacenando a 18 °C, duraron viables 2 años, mientras que los extractos sin formular mantuvieron sus metabolitos hasta los tres meses. Los resultados de los diferentes experimentos con *Trichoderma*, proporcionan una herramienta para mejorar la cosecha del cultivo tanto en calidad como en cantidad (Galeano et al., 2008).

CONCLUSIÓN

Los extractos de *Trichoderma asperellum* microencapsulados mostraron estimular el crecimiento de plantas, producción de biomasa; además ejercieron un claro biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir la actividad infectiva de *P. capsici*. Estos resultados sugieren que las microcápsulas conteniendo extractos metabólicos pueden ser un eficaz agente de biocontrol contra patógenos del suelo y pueden tener actividad biofertilizadora en comparación con los tratamientos testigo. Sería recomendable que estos resultados sean validados en campo para corroborar la efectividad mostrada en este trabajo.

REFERENCIAS

- Arvizu, H. D. L., Hernández, C. G. y Rodríguez, M. Y. E. 2002. Parámetros que afectan la conversión del ácido alginico en alginato de sodio. *Revista Ciencias Marinas*. 28: 27-36
- Fernández, A. O. 2008. Microencapsulación de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* en semilla de cebolla y su efecto en el desarrollo y producción del cultivo. Tesis de licenciatura. Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 48 p.
- Galeano, M., Fernández, P., Lorente, M.J., Téllez, M. M., y Belda, J. E. 2008. Efectos de la aplicación de la T-22 de *Trichoderma harzianum* (TRIANUM) en cultivos hortícolas en España. Memoria del X congreso Mundial de *Trichoderma Gliocladium*. Universidad Nacional de Costa Rica. P 33
- García, R. S., Juárez C., Carrillo, J. A., Allende, R., Marquéz I. y Muy, M. D. 2000. Marchitez bacteriana en chile bell causada por *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. *Revista Meicana de Fitopatología* 18: 120-124
- González, M. M., I. Torres y H. Guzmán 2002. Patógenos involucrados con la marchitez del chile. Internacional Pepper Conference. Tampico, Tapms., México (16)
- Gomez, M.I., Villsmizar, L. F., Díaz, A., Garzon, C., Moreno, C. A., y Cotes, A. M. 2008. Desarrollo y escalamiento de la producción de dos bioplagicidas a base de *Trichoderma* sp. Th003 para control de fitopatógenos. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Cundinamarca. Colombia. Memorias del X congreso Mundial de *Trichoderma* y *Gliocladium* p. 16
- Guigón, C. y González, P.A. 2001. Estudio regional de las enfermedades de chile (*capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56

- Carrillo A. y Bashan Y. 1997. Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria. In: Ogoshi A Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) growth-promoting rhizobacteria - present status and future prospects Plant. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.pp 460-463.
- Engelhard, A. 1986. Greenhouse evaluation of soil-applied fungicides for *Fusarium* wilt of chrysanthemum. In: Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. Hickey, K.D. (Ed.) pp. 30-31
- Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Sid, A. A., Emilia, R. A. y Maria, E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología, 26: 35-45
- Hernández S. M., Hernández, C. F.D., Lira, S. R. H., Gallegos, M. G. 2011. Biocontrol of Soil Fungi in Tomato with Microencapsulates Containing *Bacillus subtilis*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6:189-195
- Jaimes, C. H. J., Jaimes, C. J. R, Hernández, C. F. D., Hernández, S. M., Díaz, G. D., y Espínola, A. F. 2010 a. Inhibición de crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* mart con microencapsulación y solución de *Trichoderma asperellum* y *Bacillus subtilis*. Resumen XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico, Uruapan, Michoacán, México. 577 p.
- Morales, G., Redondo, E. y Covarrubias, J. 2002. Detección y localización de *Phytophthora capsici* en semilla de chile. Revista Meicana de Fitopatología 20:94-97
- Rodríguez, V. M., Luna, J. J., Valle, P., Tiscareño, M. y Ruíz, J.A. 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* y análisis de distribución espacial en el Centro-Norte de México mediante un sistema de información geográfica. Revista Mexicana de Fitopatología 22:72-81
- SAS System Copyright. 2002. Version 9.1 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. All Rights Reserved.

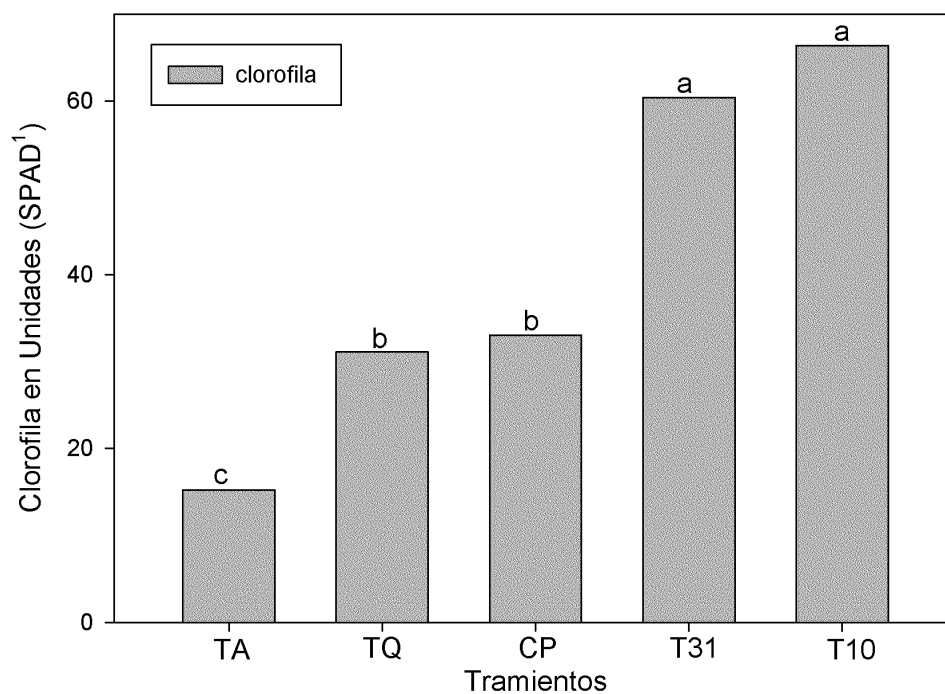
Yabur, R., Bashan, and Hernandez, C. G. 2006. Alginate from the macroalgae *Sargas sumsinicola* as a novel source for microbialim mobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. Journal of Applied Physiology 19: 43-53

Cuadro 1: Efecto de microencapsulados de extractos de *Trichoderma asperellum* sobre la incidencia de pudrición de raíz y severidad de la enfermedad en plantas de pimiento.

Tratamientos	Incidencia a (%)	Severidad Escala Engelhard (1986)
<i>T. asperellum</i> (T10) + <i>P. capsici</i>	0 c	0
<i>T. asperellum</i> T31) + <i>P. capsici</i>	0 c	0
Caldo de papa + <i>P. capsici</i>	75 b	2
Testigo químico + <i>P. capsici</i>	75 b	2
Testigo absoluto	100 a	5
CV (%)	2.68	

CV= Coeficiente de Variación; valores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$)

Figura 1: Contenido de clorofila en plantas de pimiento expresada en unidades SPAD, tratadas con microencapsulados de extractos de *Trichoderma asperellum*



TA= testigo absoluto; TQ= testigo químico; CP= caldo de papa; T31= *T. asperellum*; T10= *T. asperellum*.
Valores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$)

Cuadro 2 : Altura de planta, área foliar y longitud de raíz de plantas de pimiento cv. California Wonder sometidas a tratamientos microencapsulados de extractos de *Trichoderma asperellum*

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Área Foliar (cm ² planta ⁻¹)	Longitud de raíz (cm)
<i>T. asperellum</i> (T10) + <i>P. capsici</i>	40.0 a	1030.37 a	34.87 a
<i>T. asperellum</i> T31) + <i>P. capsici</i>	39.12 b	654.38 b	33.87 a
Caldo de papa + <i>P. capsici</i>	23.12 c	461.64 c	17.12 b
Testigo químico + <i>P. capsici</i>	26.62 c	384.61 d	14.12 cd
Testigo absoluto	23.50 c	93.97 e	8.37 d
CV (%)	8.82	8.21	18.66

CV= Coeficiente de Variación; valores con las mismas letras son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $p \leq 0.01$)

Cuadro 3: Peso seco parte aérea y raíz (gr) de plantas de pimiento cv. California Wonder sometidas a tratamientos de extractos microencapsulados de *Trichoderma asperellum*

Tratamientos	Peso seco raíz (g órgano ⁻¹)	Peso seco aéreo (g planta ⁻¹)
<i>T. asperellum</i> (T10) + <i>P. capsici</i>	4.42 a	14.02 a
<i>T. asperellum</i> T31) + <i>P. capsici</i>	3.66 b	11.55 b
Caldo de papa + <i>P. capsici</i>	3.21 cb	9.54 c
Testigo químico + <i>P. capsici</i>	2.85 d	9.39 c
Testigo absoluto	0.74 e	1.94 d
CV (%)	11.81	7.32

CV= Coeficiente de Variación; valores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$)

CONCLUSIONES

- Las dos especies de *Trichoderma* ensayadas en cultivos duales, poseen actividad antagónica contra *P. capsici*.
- Todas las concentraciones de extracto de *Trichoderma asperellum* T10 y T31, inhiben el crecimiento micelial de *P. capsici* en diferentes grados.
- Los MCE de *Trichoderma asperellum* mostraron estimular el desarrollo de las plantas de chile, además ejercieron un claro biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir la actividad infectiva de *P. capsici*.

LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C.J. 1996 Introduccion a la Micología. Trad de la 2 ed. Inglesa por A.P.L. Digilio. Buenos Aires , EUDEBA. 615 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Ed. Elsevier Academic Press. 5a ed. California, EUA, 523 p.
- Ahmad, J. S. and Baker, R. 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. Journal of Phytopathology 77:358-362.
- Ajith, P.S. and Lakshmidivi, N. 2010. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on Bell peppers. Journal of Nature and Science 8:265-260.
- Anita, S., Ponmurugan, P. and Ganesh B., R. 2012. Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of *Phomopsis* canker disease. African Journal of Biotechnology 11:10350-10357.
- Agrícola Nayarit. 2005. Chile Serrano Guía para la asistencia técnica agrícola de Nayarit. Gobierno del Estado de Nayarit. 22 p.
- Álvarez, Z. R. y Delgadillo, S. F. 2004. Enfermedades el Tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón, Coahuila. 99 p.

- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 35:359-368.
- Brotman, Y., Liseć, J., Willmitzer, L., Chet, I. and Viterbo, A. 2010. Analyzing the transcriptome and metabolome of *Arabidopsis* inoculated with *Trichoderma* and the pathogen *Pseudomonas syringae*, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, p. 24
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito M., Zeilinger, S. and Kubicek, C.P. 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Journal Current Genetic* 43:289-295.
- Baltazar, M. B. 1995. Diversidad genética del cultivo del chile (*Capsicum annuum*) determinada por isoenzimas y rfp's. Tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestres en su área de distribución. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad Del Colegio De Postgraduados. 26 p.
- Baylei, A.M., Muñoz, S.C.I., Martínez, H.,P. and Manriquez, E.M. 2001. Detection of additional gene products induced by the interaction between *Phytophthora capsici* and its host *capsicum anuum*, and the identification of an elicitor-coding gene. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:23-31
- Chen, J. and Li, Y. 2010. Construction and function analysis of *Trichoderma* transformant with *Metarhizium* genes against insects in: *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Books of Abstracts. Technion, Haifa, Israel, 27 p.
- Cruz, A. A., Mendoza, Z. C., y Romero, C. 2000. Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el sureste del estado de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6:25.32.

- Dashtban, M., Kepka, G. and Qin, W. 2013. Xilitol Production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. *Journal Applied Biochemistry Biotechnology* 169:554–569.
- De la Garza, J. L. 1996. *Fitopatología General*. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía, Marín N. L. 116 p.
- Druzhinina, I. S., Seidl, S. V., Herrera, E. A., Horwitz, B., Kenerley, C. M., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. and Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Journal Microbiology Nature Reviews* 9:749-759.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. 1982. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Journal of Phytopathology* 73:85-88.
- Eveleigh D.E., Demain A. L. and Solomon, N. 1986. *Trichoderma* Biology of industrial microorganisms. *Biotech Ser.* 16:489-500
- García, R., García, R., Zambrano, C. y Gutiérrez, L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum*, proveniente de la región Andina Venezolana. *Revista FitoSanidad* 10:115-121.
- Guigon, L. C. y González, G. P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del Chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.
- Gómez, G.V. 2000. Principales enfermedades que afectan al cultivo del pimiento. *Rev. Vida Rural.* 107:1-7
- González, P. E., Yáñez, M. M., Santiago, S. V. y Montero, A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzano, el Verde, Puebla. *Revista Agrociencia* 38: 653-661.

- Guillen, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E. y Reyes, V. M. A. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Phytophthora capsici* Leonian, y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24:105-114.
- Guazzone, N., Hill, R., Steyaert, J., Harman, G.E. and Stewart, A. 2010. Distribution of rhizosphere competence within the genus *Trichoderma*, in: *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Books of Abstracts. Technion, Haifa, Israel, P. 33
- Gruper, S. and Seidl, S. V. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Journal of Microbiology* 158:26-34.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Symposium, the nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp. *Journal of Phytopathology* 96: 190-194.
- Harman G. E. 2004. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84:377-393
- Hernández, C. F.D., Castillo, R. F., Hernández, S., Jasso, de R. D., Gallegos, M. G. Rodríguez, H. R., and Aguilar, G. C. N. 2012. Antifungal activity of microencapsulated *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* against soil pathogens on pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings. II International Conference on Antimicrobial Research, p. Lishoa Portugal. p 544.
- Hernández, C. F. D., De la Garza, R. R., Gallegos, M. G., Padrón, C. E., Sánchez, A.A. y Lira, S. R. H. 2005. Efectividad biológica de bacterias rizosféricas esporuladas sobre el complejo de Hongos de la marchitez del Chile. *International Journal Experimental Botany*. 74: 171-180.
- Hernández S. M., Hernández, C. F.D., Lira, S. R. H., Gallegos, M. G. 2011. Biocontrol of Soil Fungi in Tomato with Microencapsulates Containing

Bacillus subtilis. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6:189-195

Hung, R., Lee, S. and Bennet, J. W. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. Journal of Fungal Ecology 6:19-26.

Hernández, C. F.D., Berlanga, P. A. M., Gallegos, M. G., Cepeda, S. M., Rodríguez, H. R., Castillo, F. 2011. *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6: 410-417.

INEGI, 2008. Anuario Estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos. Consultado el 23 de Febrero de 2011. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/biblioteca/Default.asp?accion=1&upc=702825001799

INIFAP, 2010. Tecnología de producción para el cultivo de chile serrano en la zona media de San Luis Potosí .Tecnología No. 20. Campo San Luis. Consultado el 12 de Marzo de 2011. Disponible en <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php?id=5>.

Inbar, J. and Chet, I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Journal of Microbiology, 141:2823-2829.

Klein, D. and Eveleigh, D.E.1998. Ecology of *Trichoderma*. in: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London. p. 57

Kubicek, C.P., Herrera, E. A., Seidl, S. V., Martinez A. D. y Druzhinina. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Journal Genome Biology, 12:40.

- Lagunas, L. J., Zavaleta, M. E., Osada K. S., Aranda O. S., Luna R. I. y Vaquera-Huerta, H. 2004. *Bacillus firmus* como agente de control *Phytophthora capsici* Leo. En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Revista Mexicana de Fitopatología 19:57-65
- López, Y., Pineda, J., Hernández, A. y Dilcia, U. 2009. Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. Universidad Centro Occidental de Venezuela. Bioagro 22: 37-42.
- Mach, L.R., Peterbauer, K. C., Payer K., Jaksits, S., Sheridan., Woo., Zeilinger, S., Kullnig C. M., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. Journal Applied and Environmental Microbiology 65:1858-1863.
- Malmierca, M. G., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Hermosa, R., Monte, E. and Gutiérrez, S. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. Journal Applied and Environmental Microbiology 78:4856–4868.
- Michel, A., Otero, S., Rebolledo, D. y Lezama, G. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentil- α -pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 14-21.
- Mohiddin, F.A., Khan, M.R., Khan, S.M., Bhat, B.H. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites. Journal Plant Pathology 9: 92-102.
- Mukherjee, P. K. and Kenerley, C. M. 2010. Secondary metabolism and its regulation in *Trichoderma virens*, in: *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Books of Abstracts. Technion, Haifa, Israel. p. 15
- Mukherjee, P.K., Nautiyal, C.S. and Mukhopadhyay, A.N. 2008. Molecular mechanisms of biocontrol by *Trichoderma* spp. in: Nautiyal, C.S. and Dion,

- P. 2008. Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Ed. Springer. Québec, Canada. p. 250
- Monreal, V. C. T. 2008. Diagnostico de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en jitomate y chile mediante técnicas moleculares. Revista Claridades Agropecuarias N° 73. 60 p.
- Mendoza, R. 2006. Sistemática e historia del ají *Capsicum* Tourn. Revista Científica Universalia. 11: 81-87
- Nuez F., Gil Ortega R., y Costa J.203. El cultivo de pimiento, chiles ajies. Ediciones Mundi-Prensa. España. 606 p.
- Odum, P.E. y Barret, W. G. 2008. Fundamentos de Ecología. México D.F. p. 283.
- Orellana, B. E. F., Escobar, B. J. C., Morales, de B. A. J. y Méndez, de S. I. S. 2007. Guía técnica cultivo de chile dulce. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, La Libertad el Salvador. 51 p.
- Osorio, H. E., Hernández, C. F. D., 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, 6:4594-4600.
- Pal, K. K. and McSpadden B. G., 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor 10:1094.
- Prasad, A. S., Varatharaju, G., Anushri, C. and Dhivyasree¹, S. 2013. Biosorption of Lead by *Pleurotus florida* and *Trichoderma viride*. Journal British Biotechnology, 3:66-78.
- Pérez, M., Duran, O. L. J., Ramírez, M. R., Sánchez, P. J. R. y Olalde, P. V. 2004. Sensibilidad *in vitro* de Aislados del Hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas. Memorias Convención mundial del chile. León, Guanajuato. Resumen. pp 144-150.

Pozo, O. 1981. Descripción de tipos y cultivos de chile *Capsicum* spp. en México. Folleto Tec. # 77 INIA-SARH. 55p.

Productores de Hortalizas. 2010. Plagas y Enfermedades de Chiles y pimientos. Suplemento especial del mes de marzo de la Revista Comercial Productores de Hortalizas. 24p.

Reithner, B., Schuhmacher, R., Stoppache, r N., Pucher, M., Brunner, K., Zeilinger, S. 2011. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. Fungal Genet Biol. 44:1123–1133.

Rico, G. L., Guerrero, A. B., López, V, A., Muñoz, S.C.I., Guevara, O. L., Guevara, G. R.G., Torres, P. I. y González, C. M. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Memoria XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Querétaro, Querétaro, México. Resumen 134 p.

Rico, G. L. 2002. Búsqueda de resistencia natural en plantas de chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz, Tesis de Maestría en ciencias. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Gto. México. p 91.

Ruiz, C. M., Calleros, G. V., Estrella, H. A., y Portugal, O. V. 2001, Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. Manejo Integrado de Plagas. 59: 10 - 14.

Ruiz, F.M.2009. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Séptima convención mundial de chile. Realizada en Aguascalientes, Ags. 74 p

Ramírez, V.J., y Romero, C., S. 1980. Supervivencia de *Phytophthora capsici* L.agente causal de la marchitez del chile Agrociencia. 39 p.

- Romero, C.S., 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347 p.
- SIAP 2011. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México.
- SNITT, 2003. Caracterización e identificación de las demandas de investigación y transferencia de tecnología del sistema producto chile verde. Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica para el desarrollo rural sustentable. B. C. S. México, P.19.
- Stefanova, M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado F. 2009. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad Agronomía Luz 16:509-516.
- Singh, G., Nema, R., Khare, S., Singh, D., Jain, P., Pradhan A., and Gupta A. 2012. Tolerance and biodegradation capacity of *Trichoderma viride* with special reference to heavy metals (Cr, Cd). Indo American Journal of Pharmaceutical Research 2:1007-1014.
- Singh, T., Saikia, R., and Arora, D. 2005. Partial purification of lectin from mycoparasitic species of *Trichoderma*. Journal Plant Pathology 21:301-309.
- Spiegel, Y. and Sharon, E. 2010. *Trichoderma* as a biocontrol agent against plant-parasitic nematodes: Veni, vidi...vici, in: *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Books of Abstracts. Technion, Haifa, Israel, p. 26
- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti E.L. 2009. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*, in: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London, p. 141
- Sriram, S., Savitha, M.J., Rajeshwari, R., and Ramanujam, B. 2010. Comparison of solid state and liquid fermentation derived formulations of *Trichoderma harzianum* with special reference to shelf-life, in: *Trichoderma* Molecular

Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Books of Abstracts. Technion, Haifa, Israel, p. 61

- Vera, D. F., Pérez, H. y Valencia, H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana* 7: 33-40.
- Viterbo, A., Montero M., Ramot O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. and Chet, I. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Journal Current Genetics* 42:114-122.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., and Sivasithamparam K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Journal of Microbiology* 43:143–148.
- Vázquez, V. J. J. 2009. Determinación *in vitro* de las propiedades fungicidas de los ácidos fúlvicos en *Fusarium moniliforme* (Sheldon) y *Trichoderma harzianum* (Rifai). Tesis de Licenciatura, Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 37 p.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Journal of Phytopathology*, 96:181-185.
- Yabur, R., Bashan, and Hernandez, C. G. 2006. Alginate from the macroalgae *Sargas sumsinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Physiology* 19: 43-53.
- Yoon, Y. and Kinam, P. 2004. A new microencapsulation method using an ultrasonic atomizer based on interfacial solvent exchange. *Journal of Controlled Release* 100:379-388.