



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE AGRONOMIA



**BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS
A PLANTAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)**

Por:

María Magdalena Hernández Perales

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniera Agroecóloga

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Marzo de 2012



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE AGRONOMIA



**BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS
A PLANTAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum L.*)**

Por:

María Magdalena Hernández Perales

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniera Agroecóloga

Asesor:

Dr. Ovidio Díaz Gómez

Revisores:

M.C. Carlos Villar Morales

Dr. José Marín Sánchez

Asesor externo:

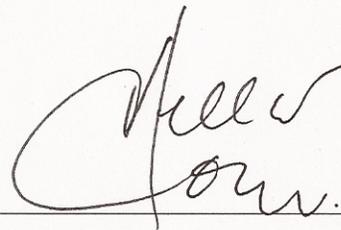
Dr. J. Sergio Casas Flores

El trabajo titulado “BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS A PLANTAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)” fue realizado por María Magdalena Hernández Perales como requisito parcial para obtener el título de “Ingeniera Agroecóloga” y fue revisado y aprobado por el suscrito comité de Tesis.

Dr. Ovidio Díaz Gómez
Asesor



M.C. Carlos Villar Morales
Revisor



Dr. José Marín Sánchez
Revisor



Ejido Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P., a los 6 días del mes de Marzo de 2012.

DEDICATORIA

A Dios gracias por permitirme continuar adelante, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y en los buenos, como lo es este preciso instante de mi vida.

A mis padres por haberme dado la vida y con sus sabias palabras lograron en Mí fortalecer las debilidades que tenía.

A mis hijos Milthon, Miriam Monserrat, Paula De Jesús y Carolina por apoyarme, por dar de su tiempo para la culminación de este proyecto.

A mis hermanos Reynaldo, Samuel, Ricardo y Milthon, que de una forma tan singular siempre me han apoyado, por el amor que es reciproco en cada uno de nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la UASLP, Facultad de Agronomía, por brindarme la oportunidad, el apoyo en el alcance de mis metas, a todos y cada uno de los trabajadores de todos los niveles, que con su apoyo y sonrisa en el peor de mis momentos me motivaron a continuar por esta travesía.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., bajo la codirección del Dr. J. Sergio Casas Flores.

A la Dirección externa, sustento y apoyo hasta el final del proyecto por ayudarme a alcanzar mis metas, el Dr. J. Sergio Casas Flores,

A mis maestros Dr. Ovidio Díaz Gómez, M.C. Carlos Villar Morales. Dr. José Marín Sánchez, por la dirección y revisión del presente trabajo y su apoyo.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FOMIX-Guanajuato: Gto-2008-C03-91748 otorgado al Dr. Alfredo Herrera Estrella del LANGEBIO-CINVESTAV-Irapuato.

Agradezco especialmente al Ingeniero Francisco Medina por las facilidades que proporcionó para realizar los experimentos en su Rancho Las Fincas, en el Valle de Villa de Arista, San Luis Potosí, México.

También agradezco al Ingeniero Juan Guillermo Moreno Chávez, coordinador de La Junta de Sanidad Vegetal del Altiplano Centro del Estado de San Luis Potosí, así como al personal de las mismas, Srita. Ma. Rosario Niño Carrizales, Dr. Miguel Ángel Silva, Ing. Hugo. A mis amigos Ing. Josefina Acosta, Socorro Molgado, Lic. Enrique Leyva Montañó, C.P. Antonio Chávez, M. C. Clara Teresa Monreal. Dr. Bernal Jácome. Secretaria Norma Arévalo, por apoyarme en esta ardua tarea por sus palabras que me alentaron cuando las necesitaba por su confianza que depositaron. A los Asesores que estuvieron conmigo en medio de la lluvia, del frío pasando por periodos de sed, hambre, por su apoyo en todas y cada una de las labores de campo

que realizamos, gracias por ayudarme a escribir, por su tolerancia y su paciencia, por ayudarme a alcanzar un sueño mas en mi vida.

Gracias al apoyo proporcionado por el Dr. Manuel Perez en Tabasco quien me envio Mi Acta de Nacimiento desde Villa Hermosa Tabasco, Jalpa de Mendez, asi como a cada uno de las personas que con su apoyo y comprensión me apoyaron sin dejar de mencionar al Ing. Salinas, MC. Andres Pasqualli. Ing. Cedillo.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	vi
INDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE APENDICE	xi
RESÚMEN	xii
SUMMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	3
Objetivos Específicos	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Características Botánicas de la Planta de Chile, <i>Capsicum annuum</i> (Linneo)	4
El Género <i>Trichoderma</i>	4
Mecanismos de Biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp.	5
Competencia	6
Competencia por nutrientes	7
Antibiosis	8
Crecimiento Quimiotrófico	9
Reconocimiento	9
Adhesión	9
Degradación de la pared celular.	10
Sinergismo	10
Biofertilización y Mecanismo de Defensa en Plantas	10
Modificación de la Rizósfera	11
MATERIALES Y METODOS	13
Ubicación del Área Experimental	13

Aislamiento de Microorganismos Benéficos de Plantas de Chile	13
Obtención e Identificación de Microorganismos	14
Antagonismo “in situ”	15
Confrontación de <i>Trichoderma</i> vs oomicetos y hongos fitopatógenos	15
Antibiosis para Determinar la Capacidad de los Hongos de Producir Metabolitos	15
Antibiosis de la Bacteria <i>Bacillus mojavensis</i> (Cohn).....	16
Cultivo Vegetal Utilizado	16
Identificación de Hongos del Suelo por Técnicas Moleculares	16
Aislamiento y obtención de cepas puras	16
Extracción de ADN de Hongos Filamentosos.....	17
Transformación de ADN.....	18
Minipreps por Lisis Alcalina.....	18
Digestión de ADN Plasmídico	19
Preparación del Inóculo de Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	19
Promoción del Crecimiento de las Cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en Almácigo	20
Evaluación de las Cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en Campo	21
Efecto de Metabolitos Secundarios en el Crecimiento de Plántulas de Chile	22
Análisis Estadístico del Efecto de las Distintas Cepas de <i>Trichoderma</i> en Campo	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Identificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	24
Antagonismo de Cepas de <i>Trichoderma</i> spp., vs Oomicetos y Hongos Fitopatógenos	25
Antibiosis de Metabolitos Producidos por <i>Trichoderma</i> spp. Vs Hongos y Oomicetos fitopatógenos	27
Identificación de Patógenos	29
Formulación de <i>Trichoderma</i> spp., para Aplicación en Almácigo y Campo	29
Promoción del Crecimiento de Cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en Plántulas de Chile en Almácigo	30
Ensayos de Protección de Cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en Campo.....	32

Metabolitos Secundarios en el Crecimiento de Plántulas de Chile	35
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
LITERATURA CITADA	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tratamientos para la evaluación de cepas antagónicas en campo.....	22
2	Origen de aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ensayos duales o de confrontación de <i>Trichoderma</i> vs oomicetos y hongos fitopatógenos.....	26
2	Confrontaciones mostradas en la figura 1.....	27
3	Ensayos de antibiosis.....	28
4	<i>B. cinerea</i> (de Bary).....	29
5	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> spp., en plántulas de chile en condiciones de almacigo a) Peso fresco b) Peso seco.....	31
6	Efecto de las diferentes cepas en la protección de plantas de chile en campo en el muestreo	33
7	Efecto de las diferentes cepas en la protección de plantas de chile en campo en el muestreo II.	34
8	Efecto de las diferentes cepas en la protección de plantas de chile en campo en el muestreo III.....	35
9	Moléculas promotoras del crecimiento en diferentes diluciones (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) en plántulas de chile poblano para peso fresco.	36
10	Moléculas promotoras del crecimiento en diferentes diluciones (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) en plántulas de chile poblano para peso seco.	37

INDICE DE APENDICE

Apellido		Página
1	Organismos identificados por medio de secuenciación.....	47

RESÚMEN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos más importantes en México. Un factor muy importante que ha limitado la obtención de este cultivo es la enfermedad del damping off, compuesta por varios hongos fitopatógenos y oomicetos. El objetivo principal de este trabajo fue determinar cuáles de los microorganismos benéficos aislados de San Luis Potosí actúan como antagonistas del damping off, para reducir las pérdidas en el rendimiento de los cultivos de pimiento. Diecinueve cepas de *Trichoderma* spp., fueron aisladas en campo e invernadero, catorce cepas pertenecían a *Trichoderma harzianum*, tres a *T. citrinoviride* y dos a *Trichoderma piluliferum*. Con estas cepas de *Trichoderma* spp., realizamos ensayos para la actividad de antibiosis y de confrontación in vitro contra varios fitopatógenos que mostraron una actividad antagónica. Tres cepas de *T. harzianum* y uno de *T. citrinoviride* fueron utilizados para la caracterización adicional, debido a sus características determinadas “in vitro”. Los filtrados de cultivo de cepas de *Trichoderma* spp., promovieron el crecimiento y el desarrollo de plantas de pimiento. Cuatro cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum* (Th1), (Th2) y (Th22) and *T. citrinoviride*, Tc) fueron seleccionadas para ser probadas en el cultivo de pimiento en Arista, San Luis Potosí. Con el fin de seleccionar el mejor medio sólido para el crecimiento y generar suficiente inóculo para evaluar las cepas en campo, se realizaron distintas combinaciones de vermiculita con arroz o trigo. Las cuatro cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum* (Th1), (Th2), Th-22 y (*T. citrinoviride* Tc) mostraron resultados similares a los obtenidos con la cepa comercial *T. harzianum* (T-22). En los resultados de rendimiento se observaron diferencias, cuando se compararon nuestras cepas, con ensayos de plantas tratadas o con plantas tratadas con químicos. La búsqueda y el uso de microorganismos endógenos como *Trichoderma* spp., en el proyecto, es una alternativa para evitar el uso de fungicidas químicos para protección de los cultivos.

SUMMARY

Pepper (*Capsicum annum* L). is one of most important crops in Mexico. A very important factor that has limited yielding on this cultivar is the damping off, a disease that is composed by several phytopathogenic fungi and oomycetes. The main goal of this work was to isolated beneficial indigenous microorganisms from San Luis Potosí that antagonizes the damping off, to reduce losses on yield of peppers crops. Nineteen *Trichoderma* spp. strains were isolated at both, in the field and in the green house: Fourteen strains belonged to *Trichoderma harzianum*, three to *T. citrinoviride* and two of *T. piluliferum*. These *Trichoderma* spp. strains were tested for antibiosis activity and confronted in vitro against several phytopathogens, showing highly antagonistic activity. Three *T. harzianum* strains and one of *T. citrinoviride* were used for further characterization due to their characteristics determined in vitro. Culture filtrates of some *Trichoderma* strains promoted growth and development to pepper plants. Four *Trichoderma* strains (*T. harzianum* (Th1), (Th2) y (Th22) and *T. citrinoviride*, Tc) were selected to be tested in a pepper crop at Arista, San Luis Potosí. In order to select the best solid medium to growth and generate enough inoculums to test such strains at the field, a solid matrix conformed by wheat and vermiculite was performed. Under field conditions, four *Trichoderma* strains (*T. harzianum* (Th1), (Th2) y (Th22) and *T. citrinoviride*, Tc) showed similar results as the commercial one *T. harzianum* (T-22). However, improved yield results were observed, when compared our strains either with mock treated plants or with chemical treated plants. In conclusion, indigenous strains of beneficial microorganisms, can improve yield production in local crops when compared with chemical treatment or with commercial strains. The search and use of indigenous microorganisms in the field is a really good alternative to chemical fungicides to improve yield in crops.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades en los cultivos de hortalizas afectan la calidad e incrementan las pérdidas en las cosechas, lo que genera que los precios se incrementen en los mercados. Entre los factores que limitan el crecimiento y el desarrollo de los cultivos en México, se encuentran las plagas y enfermedades fúngicas, bacterianas y virales, que representan un grave problema en la producción de hortalizas.

En el caso de chile poblano en el Estado de San Luis Potosí, principalmente en el Altiplano Potosino, las enfermedades son el factor que afecta la producción agrícola, así como en toda la República Mexicana. Lo que ha llevado a la utilización indiscriminada de fertilizantes y plaguicidas químicos, para incrementar la productividad y combatir las enfermedades que se presentan durante el desarrollo vegetativo del cultivo. Dentro de los principales países productores de chile con mayor rendimiento se encuentran España 484,444 (Hectogramos / hectárea) Hg/Ha, Alemania 553,590 Hg/Ha, Austria 983,425 Hg/Ha y México 162,215 Hg/ha. Los países mencionados presentan un rendimiento muy alto en comparación con México, cuya producción durante el año 2010 fue de 2335,560 toneladas; China tiene una producción de 13,186.400 toneladas, en comparación con Reino Unido que tuvo una producción de 19,200 toneladas, se deduce que mejoró la producción probablemente debido al manejo de enfermedades en el cultivo, ya que ocasionaban pérdidas considerables en el rendimiento (FAOSTAT, 2010). La producción de chile verde en San Luis Potosí tuvo una superficie sembrada de 11,678.21 hectáreas, con 11,164.03 hectáreas cosechadas y una producción obtenida de 115,636.06 toneladas durante el ciclo primavera –verano, de acuerdo al censo agropecuario INEGI (2007). La importancia económica, y el impacto social positivo que representa para nuestro país este cultivo, radica en los diversos usos que se aplican para ser degustados por la Población, ya que es utilizado como principal condimento de la comida mexicana, sus múltiples aplicaciones en la industrialización de dulces, botanas, alimentos en

conservas, y se distribuye ampliamente por todo el territorio Mexicano. El cultivo de chile forma parte de las hortalizas del consumo primario en la población mexicana, contiene un aporte energético así como antioxidantes, potasio, haciéndolo diurético, favoreciendo la digestión de los alimentos y estimulando el metabolismo del organismo (Inforural, 2010). Existen además, fitopatógenos como *Phytophthora* spp., (Bary Heinrich), *Rhizoctonia solani* (J.G.Kuhn), *Sclerotium rolfsii* (Welch), *Pythium* spp., (Pringsheim), *Fusarium oxysporum* (Schitdl), que afecta a diferentes cultivos como la caña de azúcar, café, tabaco, hortalizas y plantas ornamentales (Siannah, *et al.*, 2001).

En el Estado de San Luis Potosí, en la región de Villa de Arista, Moctezuma, Bocas y Venado, se identifican patógenos que tienen un precedente en la agricultura, debido a su ubicuidad en los suelos, que se manifiestan como devastadoras pérdidas en las cosechas. se ha identificado por medio de la sintomatología del cultivo tres enfermedades: “cáncer bacteriano”, provocado por *Clavibacter michiganensis* (Smith) subsp. *Michiganensis* tizón temprano, causado por *Alternaria solani* (Cooke) y la fitoplasmosis cuyo agente causal es *Fitoplasma* spp., transmitido por el insecto *Paratrioza cockrelli* (Monreal, 2005). A nivel mundial, la mayor cantidad de trabajos de investigación se ha realizado sobre *Phytophthora infestans* (Mont) y *P.cinnamomi* (Rands). Este último es el hongo fitopatógeno del suelo más estudiado por manifestarse en diversos cultivos hortícolas.

Las enfermedades mencionadas causan serios problemas económicos a los agricultores, así como problemas de salud a los consumidores por la acumulación de contaminantes químicos utilizados en el control de estos patógenos. En la actualidad, debido a un mal manejo en el control químico, la utilización de fungicidas está creando resistencia en los fitopatógenos, además de contaminación en los suelos por su permanencia en los mismos, de ahí que se ha hecho imprescindible el control biológico de los patógenos con microorganismos antagonistas para el manejo de las enfermedades en plantas, evitando así se siga degradando y perdiendo la fertilidad y disposición de los nutrientes en el suelo (Casas, 2010), comunicación personal.

Objetivo

Evaluar la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp., contra fitopatógenos del cultivo de chile en campo.

Objetivos Específicos

1. Aislar e identificar molecularmente hongos del género *Trichoderma* spp., benéficos a plantas de chile.
2. Determinar la actividad mico-parasítica y/o antagónica de las cepas aisladas en campo.
3. Determinar el mejor sustrato para la producción de conidias de *Trichoderma* spp.
4. Evaluar la capacidad protectora de los organismos aislados contra enfermedades del cultivo de chile en campo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Características Botánicas de la Planta de Chile, *Capsicum annuum* (Linneo)

Es una planta anual, tallo lleno de ramas, puede medir 10 cm a 4 m de altura, sus flores son blancas. Sus frutos pueden variar de forma, tamaño y color rojo y verde, dependiendo del grado de madurez en el que se encuentre (Nee, 1986).

Puede tolerar la mayoría de los climas, y es más productiva en zonas cálidas y climas secos. El Chile es un fruto de sabor picante y pertenece a la familia de las solanáceas. Es originario de América tropical, Sur de los Estados Unidos, casi todo México, Centroamérica las Antillas, y norte de Sudamérica (Nee, 1986).

Taxonomía del Chile *Capsicum annuum*, reino *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida* Subclase: *Asteridae*, Orden: *Solanales* (Nee, 1986).

El Género *Trichoderma*

Respecto a la biología de *Trichoderma* spp., pertenece al Super reino Eucariota, Reino fungí, Filum ascomycota, Subfilum, Pezizomycotina, Género *Trichoderma*, Especie *Trichoderma koningii* (Cruz, 2007).

Trichoderma spp., se reproduce asexualmente, es un hongo heterótrofo, aerobio, se puede reproducir en diferentes sustratos que pueden contener almidón como fuente de carbono (Cruz, 2007), con conidióforos aéreos, erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos, débil o fuertemente verticilados, los que terminan en fiálides simples o en racimos de 2 - 4 fiálides, donde nacen fialosporas lisas, verdes, esféricas a levemente ovoides, agrupadas en racimos. Las colonias en cultivos usualmente son de rápido crecimiento, flocosas, suaves, blancas a verdes (Humeres, 2004).

Sus estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas. Es saprofito del suelo y de la madera siendo de rápido crecimiento (Humeres, 2004).

La mayoría de las especies de este género son fotosensibles, esporulando rápidamente sobre sustratos naturales o artificiales en patrones anulares concéntricos en respuesta a la alternancia diaria de luz y oscuridad, con producción de conidias durante el periodo luminoso (Chávez *et al.*, 2009).

Trichoderma spp., tiene efecto antagónico sobre los microorganismos que se encuentran en el suelo, por lo cual se empleó en esta investigación como un controlador biológico y antagonista natural de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* (Schitdl), *Fusarium roseum* (Link), *Rhizoctonia solani* (J.G.Kuhn), *Phytophthora* spp., (Bary) y *Alternaria* spp., (Cooke), entre otros hongos (Infante *et al.*, 2009).

Mecanismos de Biocontrol de *Trichoderma* spp.

A la fecha se ha usado el biocontrol por diferentes agentes en el manejo de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* causantes de la marchitez en diferentes hospedantes. Pérez *et al.* (2009), mencionan la eficacia de *Trichoderma harzianum* (Rifai) cepa A34 en el control de *Fusarium* spp., en frijol y claveles, además de otras especies de hongos que se han encontrado en tomate y tabaco.

Trichoderma spp., y *Cladosporium* (Link.), particularmente *Trichoderma harzianum*, han sido descritos como controladores biológicos del moho gris (Salas *et al.*, 2006). Han resultado eficaces para el control de *Botrytis cinérea* (de Bary), Así mismo, se ha reportado una reducción de la infección en tomate hasta de 100% utilizando *T. harzianum* y *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) (Salas y Sánchez, 2006).

Pérez *et al.* (2009) encontraron que *T. harzianum* induce altos niveles de enzimas líticas (1-3 β glucanasa, quitinasa, celulasas y proteasas) sobre las células de las

paredes de los patógenos *R. solani* (J.G.Kuhn), *P. aphanidermatum* (Edson) y *Fusarium oxysporum* (Schitdl).

Trichoderma spp., se alimenta de los fitopatógenos de dos maneras: indirecta y directamente. Los microorganismos presentes en el suelo le proporcionan una fuente de carbono y nitrógeno, entre otros nutrientes que puede degradar por el mico-parasitismo, la antibiosis y desactivación de las enzimas de los patógenos. Los mecanismos de competencia por espacio y nutrientes, el mico-parasitismo, la antibiosis y desactivación de las enzimas tienen acción directa sobre los hongos fitopatógenos (Infante *et al.*, 2009).

Trichoderma favorece la tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo de los sistemas radiculares, solubilización, absorción de nutrientes inorgánicos y resistencia inducida. Estos tres últimos tienen acción indirecta ya que su función es licitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta. Los mecanismos directos, se refieren básicamente a que los metabolitos producidos por los hongos o bacterias, son capaces de estimular el crecimiento radicular, lo cual ocurre de manera independiente al resto de la población microbiana edáfica e incluso independiente del soporte edáfico, es decir, no ejerce su efecto por modificación del sustrato (Sarabia *et al.*, 2010).

Competencia

Esta competencia se da principalmente en la rizósfera de la planta donde se ubican otros hongos que aportan alimento a *Trichoderma* spp. Por esta razón se llega a la conclusión que *Trichoderma* spp., es altamente competitivo, ya que inhiben el crecimiento de otros microorganismos que afectan a las poblaciones de organismos presentes en el suelo. En algunos casos provoca fungistasis, la cual se define como la incapacidad de germinación de esporas de hongos que viven en el suelo por los exudados de la raíz de las plantas (Agrios, 2009). La mayoría de los hongos entran a las plantas a través de los estomas; si se mantienen abiertos durante el día, con el

agua se pueden propagar los patógenos con facilidad debido a que las esporas germinan sobre las hojas (Agrios, 2007).

El biocontrol por competencia también se da en la rizósfera por especies de *Trichoderma* spp., que inhiben el crecimiento de hongos endógenos por la producción de sideroforos capturando el hierro que le sirve de estimulador para crecer a otros hongos (Barrios, 2006). *T. harzianum*, ha mostrado control para *Fusarium oxysporum* al capturar más rápidamente los nutrientes de la rizósfera y colonizarla, a esta actividad se le llama competencia por espacio, siendo más efectivo el biocontrol cuando la concentración de nutrientes disminuye como lo menciona Barrios (2006).

Competencia por nutrientes

Se debe a la disponibilidad de nitrógeno y carbohidratos (azúcares, polisacáridos, almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas así como micro elementos). Existe una competencia por el oxígeno por su gran versatilidad de adaptación a los suelos, lo cual favorece su rápido crecimiento.

Puede haber competencia en el sustrato que se encuentre estéril libre de patógenos, para colonizarlo, como se ha visto en la colonización de los sustratos de trigo, vermiculita y arroz, en ese momento se presenta velocidad de crecimiento si existe una aplicación uniforme del inóculo. *Trichoderma* spp., no compite por nutrientes del suelo con la planta, se alimenta de los patógenos que se encuentra en el suelo. Entre otros elementos traza requeridos para que se alimente *Trichoderma* spp., podemos mencionar hierro, zinc, cobre, molibdeno y manganeso, algunas vitaminas con igualdad de importancia para su crecimiento, como tiamina (B6), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), rivo flavina (B2), cianocobalmina (B12) y ácido aminobenzoico (Cruz, 2007).

El hongo *T. harzianum* parasita el micelio de *Rhizoctonia* (J. G. Kuhn), *Sclerotium* (Fuckel) y *Fusarium* (Schitdl), inhibe el crecimiento de muchos otros

hongos (Agrios, 2009), proporciona una alternativa en el biocontrol con la finalidad de obtener mayores rendimientos, estos beneficios no se consiguen con un fungicida convencional sin afectar la salud de quien los consume.

Se da la competencia directa por espacio o por nutrientes, lo percibimos en la práctica al ver a *Trichoderma* spp., colonizando el Agar (PDA). Debido a la producción de metabolitos antibióticos, se da el parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos, ya que actúan como hiperparásitos competitivos (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Antibiosis

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción de moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas (Michel *et al.*, 2004).

Actúan antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo. Algunos de los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp., son gliotoxina, viridina, pacibasina, trichodermina, furanona, trichorziaminas, 6 pentil_pirona, que tienen efectos antagónicos sobre *Rhizoctonia solani*. Entre los metabolitos volátiles que produce *Trichoderma* spp., se encuentra el 6PAP (6-pentyl- α -pyrona), que es el más conocido y estudiado (Michel *et al.*, 2004).

Infante *et al.* (2009), señalan que *T. harzianum* (Rifai) produce numerosos antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina. Entre mayor sea la cantidad de productos metabolitos, el poder antagónico se incrementa (Michel *et al.*, 2005). *Trichoderma harzianum* es la especie más estudiada y con el más amplio espectro de control en diferentes condiciones ambientales (Michel, 2001).

Micoparasitismo de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp., por medio de micoparasitismo se alimenta de hongos patógenos que se encuentran en el suelo, y que van causando daño en el desarrollo de la raíz, las hifas de *Trichoderma* spp., actúan por control directo por medio del contacto o enrollamiento de los fitopatógenos presentes.

Crecimiento Quimiotrófico

Donde los exudados del patógeno atraen a *Trichoderma* spp., existe quimiótropismo positivo, es decir crecimiento directo hacia un estímulo químico. En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* spp., puede detectarlo a distancia (Infante *et al.*, 2009).

Reconocimiento

Es un evento que precede al proceso antagonista. El reconocimiento es a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Infante *et al.*, 2009) y que corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de hongos parasitados.

Adhesión

Una vez que *Trichoderma* spp., ha reconocido al patógeno, las hifas de *Trichoderma* lo envuelven y se adhiere al hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios cubriéndolo totalmente, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran, mediado por procesos enzimáticos (Infante *et al.*, 2009); la adherencia de las hifas de *Trichoderma* spp., ocurre gracias a la

Asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

Degradación de la pared celular.

La actividad lítica de *Trichoderma* spp., degrada las paredes celulares de los hospedantes y posibilita la penetración a la pared celular de los patógenos por los puntos de contacto donde se produce la lisis, y aparecen orificios, utilizando las enzimas de *Trichoderma* para entrar en contacto con el o los hospedantes (González *et al.*, 2011).

Sinergismo

Botero (1999) afirma que el sinergismo es la facultad que tienen dos clases de organismos para producir mayores efectos cuando están asociados que cuando lo hacen por separado.

Vilches (2002) refiere que las enzimas por sus diferentes especificidades y modos de acción actúan en sinergismo para poder hidrolizarse. Las especies de hongos celulolíticos más estudiadas pertenecen al género *Trichoderma viride* (Pers) debido a que son los mejores productores de celulasas extracelulares, por lo que la mayoría de estudios concernientes a la naturaleza, en sus diferentes aplicaciones y modos de acción y aspectos en general de las celulasas han sido realizados usando este microorganismo.

Biofertilización y Mecanismo de Defensa en Plantas

Los biofertilizantes se utilizan como inoculantes del suelo en la agricultura, mejorando la disponibilidad de los nutrientes, absorción y solubilización de los minerales aplicados, fija el nitrógeno fosforo y potasio entre otros macro elementos,

dando paso al mecanismo de defensa en las plantas, lo que origina penetración del agua y estructura del suelo. Estos elementos mejoran la fertilidad en el desarrollo de los cultivos estimulando la elongación vegetal y a su vez controla los fitopatógenos (Hernández *et al.*, 2001).

Modificación de la Rizósfera

La modificación en la rizósfera se debe a diferentes factores abióticos como la temperatura, humedad, pH (óptimo para el crecimiento de microorganismos de 5.6), y que las enzimas se encuentren activas. Si se le añaden microorganismos benéficos como *Trichoderma* spp., se evitara el sobrecrecimiento de patógenos dañinos que se encuentren disponibles en la rizósfera (Barrios, 2006)

En el ambiente idóneo para el desarrollo de *Trichoderma* spp., su hábitat está constituido de materia orgánica, su comportamiento es totalmente saprofito, lo que le brinda la propiedad de tener ventajas antagónicas ante la presencia de otros patógenos que se encuentran en el suelo, generando como resultado la competencia por los nutrientes, así como el espacio para reproducirse en forma masiva, ya que les son propicias un alto rango de temperaturas para su reproducción. Por lo que son tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Cruz, 2007).

Algunas cepas de *Trichoderma* al estar presentes en la raíz del cultivo desprenden compuestos capaces de inducir local o sistémicamente respuestas favorables en los cultivos y reduce las enfermedades producidas por contacto con los patógenos que se encuentran en el suelo o que llegan por la acción del viento (Tovar, 2008).

Uno de los principales microorganismos que presenta una actividad muy dinámica en el suelo, capaz de lograr el suministro de nutrientes, adición de fitohormonas y antagonistas de hongos fitopatógenos es *Trichoderma harzianum* (Rifai), del cual se hace mención del efecto que ha presentado como estimulador de crecimiento en múltiples cultivos ocasionado por la actividad biocontroladora de patógenos. (Hinojosa *et al.*, 2009).

Se ha reportado la producción de ácido 3 indol acético (AIA), sustancia que actúa como hormona vegetal favoreciendo el desarrollo del sistema radical entre otros beneficios (Hinojosa *et al.*, 2009). Pueden aumentar la tolerancia de las plantas a limitaciones ambientales y controlar biológicamente a los patógenos, reduciendo la necesidad de fertilizantes y plaguicidas (Minchala, 2007).

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del Área Experimental

El presente trabajo se realizó en el Valle de Villa de Arista, San Luis Potosí. La zona de trabajo se encuentra localizada en la parte norte de la capital del estado, zona centro, con las siguientes coordenadas 100°51' de longitud oeste y 22°39' de latitud norte, con una altitud de 1,610 msnm. Sus límites son al norte, al este y al sur con Villa Hidalgo, al oeste con Moctezuma y al suroeste con San Luis Potosí, su distancia aproximada a la capital es de 97 km.

Se usó un lote comercial de chile poblano muy susceptible a la enfermedad pudrición de la raíz provocada por oomicetos como *Phytophthora capsici* (de Bary), hongos como *Rhizoctonia solani* (J.G.Kuhn), *Fusarium* spp., (Schitdl), en el municipio de Moctezuma, San Luis Potosí. Este municipio se encuentra en las inmediaciones de lo que se conoce como el Valle de Arista, la cual es considerada como una zona importante en la producción de chile a nivel nacional. Su clima es semi cálido; y la flora es matorral macrofilo espinoso, desértico, izotal, nopalero y pastizal. La vegetación se compone de gobernadora, mezquite, huizache, hojasen, castela, corolaria, lechuguilla, maguey, guapilla, zotal, guayule y candelilla. Los suelos dominantes son calcisol y leptosol, de textura franco a franco arcilloso, con drenaje deficiente, permeabilidad moderada y con actividad pecuaria (INEGI, 2009).

Aislamiento de Microorganismos Benéficos de Plantas de Chile

Con la finalidad de obtener organismos benéficos a los cultivos de chile, se buscaron y recolectaron en zonas prácticamente devastadas por las enfermedades (en invernadero y en campo) plantas de chile y tomate que presentaban una apariencia sana y robusta, creciendo en zonas con plantas muy enfermas, lo cual en principio sugiere que presentan condiciones en la rizósfera de crecimiento diferentes a las

Plantas que las rodean. También se recolectaron plantas con síntomas de enfermedad con la finalidad de aislar a los fitopatógenos y posteriormente realizar los ensayos de confrontación in vitro y de protección en invernadero. Las muestras fueron recolectadas en diferentes fechas (2008-2009) en invernaderos de Villa de Arista durante el primer periodo de ejecución del presente proyecto. En invernadero se colectaron entre los meses de Diciembre-Marzo 2008-2009 y las de campo entre los meses de Marzo-Junio (2010). Posterior a la colecta del material biológico, las raíces fueron separadas y cortadas en fragmentos, para después colocarlas en cajas de Petri con medios para hongos o bacterias, sobre los cuales fueron aislados los microorganismos que crecieron. Posteriormente estos fueron crecidos en medio líquido para el caso de bacterias, y los hongos fueron crecidos en medio sólido PDA con un celofán. El DNA fue extraído y utilizado para realizar PCR con oligonucleótidos específicos para bacterias (rDNA 16S) y para hongos respectivamente (rDNA 18S). Los fragmentos o amplicones resultantes fueron clonados y secuenciados.

Obtención e Identificación de Microorganismos

Se obtuvieron cepas nativas de *Trichoderma* spp., *T. citrinoviride* (Tc) provenientes de San Felipe Guanajuato, *T. harzianum* (Th1) proveniente de Villa de Arista S.L.P., *Hypocrea lixii* (anamorfo de *T. harzianum*) proveniente del Altiplano Potosino, *T. harzianum* (22) Th22 cepa comercial y *Trichoderma piluliferum* proveniente de Rioverde, S.L.P. Se seleccionaron estos aislamientos de las cepas por su capacidad infectiva y rápido crecimiento. También se utilizaron como control las cepas de referencia, *T. virens* (Tv29.8), *T. atroviride* (IMI206040) y las cepas comerciales Th22 (*T. harzianum*) (PHC) y TvG-42 (*T.virens*) (PHC)-Root Mate.

Antagonismo “in situ”

Se evaluó el antagonismo de cepas y especies de *Trichoderma* spp., mediante experimentos de confrontación y en base a su capacidad para sobrecrecer a los aislados de los hongos fitopatógenos. Los aislamientos probados fueron: T, *harzianum* (Th1), *T. harzianum* (22), cepa comercial TvG-42 (*T. virens*) y T-22 (*T. harzianum*), en cultivos duales, contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* (J.G.Kuhn) (Rs), *Fusarium oxysporum* (Schtdl) (Fo), *Phytophthora capsici* (de Bary) (Pc) y *Sclerotium cepivorum* (Fuckel) (Sc), en cajas Petri con agar PDA.

Para estos ensayos, se colocó en un extremo de la caja petri al fitopatógeno y en el lado opuesto a las cepas o especies de *Trichoderma* spp. Cada tratamiento se realizó inoculando por triplicado las cajas, posteriormente se colocaron a una temperatura de 28 °C, con luz, para favorecer el crecimiento de las esporas, observándolas diariamente por 7 días.

Confrontación de *Trichoderma* vs oomicetos y hongos fitopatógenos

Los hongos aislados de suelo, como *T. harzianum* (1) (Th1), *T. citrinoviride* (Tc) y los de nuestra colección de cepas de referencia *T. atroviride* IMI206040 (Ta) y *T. virens* Tv29.8 (Tv), fueron confrontados contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (Schtdl) (Fo), *Phytophthora capsici* (de Bary) (Pc), *Rhizoctonia solani* (J.G. Kuhn) (Rs) y *Sclerotium cepivorum* (Fuckel) (Sc) en cultivos duales por 72 h a 25 °C en medio PDA.

Antibiosis para Determinar la Capacidad de los Hongos de Producir

Metabolitos

Se realizaron dos tipos de ensayos, en el primero se creció a las diferentes cepas de *T. virens* (Tv29.8), *T. atroviride* (IMI206040), *T. citrinoviride* (Tc), y *T. harzianum* (Rifai) (Th1) en medio PDA y un control sin *Trichoderma* (T = PDA)

Cubierto con una membrana de celofán, una vez que este creció sobre 75% de la superficie se retiró por medio de la membrana y se inoculó sobre el medio al fitopatógeno. Se comparó el crecimiento del fitopatógeno con su crecimiento en cajas control conteniendo PDA. *Fusarium oxysporum* (Schitdl) (Fo), *Sclerotium cepivorum* (Fuckel) (Sc), *Phytophthora capsici* 4 (de Bary) (Pc4), *Phytophthora capsici* (Pc) y *Rhizoctonia solani* (J.G. Kuhn) (Rs).

Antibiosis de la Bacteria *Bacillus mojavensis* (Cohn)

B. Mojavensis (Cohn) fue crecida sobre medio PDA cubierto por un celofán durante 7 días a 28 °C, posteriormente la bacteria fue removida con el celofán y se inocularon las cajas con *Botritis cinerea* (de Bary) y *T. citrinoviride* (Pers) por 48 h a 28 °C, como control se crecieron a ambos hongos sobre cajas con PDA sin haber crecido previamente a la bacteria.

Cultivo Vegetal Utilizado

Para realizar las pruebas de antagonismo “in vivo”, el ensayo de protección se desarrolló en plántulas de Chile poblano (*Capsicum annuum* L.) variedad ancho huizache.

Identificación de Hongos del Suelo por Técnicas Moleculares

Aislamiento y obtención de cepas puras

Con el fin de conocer los patógenos que se encontraban en el suelo previo al trasplante del cultivo de chile, se elaboró un muestreo de suelo completamente al azar. Esta información fue útil también para conocer la efectividad y viabilidad de la

Aplicación de las cepas de *Trichoderma* spp., en el control de las enfermedades que se podrían manifestar en el transcurso del cultivo. Se tomaron 5 muestras de diferentes puntos del terreno a trasplantar, se mezclaron y se obtuvo una muestra final. A partir de ella se aislaron los hongos por el método de dilución y siembra en extensión. Para ello se realizaron diluciones base 10 de 10^1 a 10^3 , las cuales se sembraron en el medio de Papa Dextrosa Agar (PDA); utilizando alícuotas de 100 μ l. Estas se incubaron a 28 ° C, se presentó crecimiento fúngico a las 24 hrs y las colonias se desarrollaron cubriendo toda la superficie de la caja Petri en 4 días. A partir de estas colonias se tomó el inóculo para obtener las cepas puras y proceder a la identificación por técnicas moleculares.

Extracción de ADN de Hongos Filamentosos

El micelio obtenido se maceró en mortero hasta obtener un polvo fino, posteriormente se transfirió a tubos eppendorff, los tubos de todos los patógenos se mantuvieron en nitrógeno líquido, se agregó 380 μ l de buffer de extracción a cada tubo, se mezcló en vortex hasta obtener una solución homogénea, se adicionó 20 μ l de fenol cloroformo isoamilico, se agitó por 10 minutos en vortex, se colocó en centrifugación a (12000 rpm) por 30 minutos, se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo, se adicionó un volumen igual de cloroformo, se mezcló en vortex por 3 minutos y se centrifugó 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionó 300 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión, se centrifugó nuevamente por 5 minutos a (1200 a 1300 rpm).

Se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla en Termoblock. Se redisolvió la pastilla en 50 μ l de agua desionizada estéril, se agregó 2 μ l de RNAsa (1mg /ml), se incubó 1 hora a 37°C, se extrajo con fenol cloroformo (se mezcló en vortex) por 10 minutos. Se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se tomó la fase acuosa y se extrajo con fenol cloroformo, se dejó precipitar y se agregó 10 μ l de etanol frio, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos. Se desecho el sobrenadante y se lavo la

Pastilla 2 veces con 500 µl de ETOH al 70 %, se centrifugó 2 minutos, se dejó secar la pastilla en Speed Vac y se redisolvió en 30 µl de agua desionizada estéril.

Transformación de ADN

Se descongelaron las células calcio competente en hielo por 10 minutos (un tubo para cada muestra + un control), se agregó 1 µl de ADN (vector) o 5 microlitros DNA (ligación). Se incubó el tubo en hielo un tiempo de 1 a 15 minutos. Se incubó el tubo en baño María a 42 ° C por un tiempo de 45 a 60 segundos. Se incubó los tubos en hielo durante 5 minutos, se adicionó 450 µl de LB (Agar Miller) en campana.

Se incubó a 37 °C, durante 45 minutos con agitación constante, se preparó cajas petri con Agar LB y Carbanicilina antibiótico, se les agregó 15 µl de Xgal + 40 µl de Iptg. + 40 µl de LB., se plaquearon las cajas dejándolas secar unos minutos, se incubó toda la noche a 37 °C.

NOTA: Las colonias blancas se picaron con un palillo, se estrió cada una de las colonias por separado en una caja con carbanicilina y se colocó el palillo dentro de un tubo que contenía 3 ml de caldo LB con 3 µl de antibiótico. Se dejó incubar a 37°C con agitación constante durante toda la noche.

Minipreps por Lisis Alcalina

Se centrifugó el cultivo bacteriano por 2 minutos a 8000 rpm, se añadió 100 µl de sol I, se suspendió en vortex, se agregó 10 µl de RNAsa, se incubó por 20 minutos a 37 °C, se añadió 200 µl de solución II, se mezcló por inversión (SOL II se preparó al momento de usarlo). Se añadió 150 µl de solución, se mezcló por inversión, se dejó reposar por 3 min en hielo.

Se centrifugó por 2.5 minutos a 13000 rpm, se añadió 900 µl de etanol absoluto y 45 µl de acetato de sodio 3M, se mezcló por inversión, nuevamente se dejó reposar

Por 3 minutos en hielo, se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió 500 µl de etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente, se suspendió en 50 µl de TE (Tris EDTA) a pH 8.0 y se dejó almacenado a -20 °C. La solución I se esterilizó y mantuvo a 4 °C Tris HCL 25 mM a un pH 8.0, se agregó EDTA a 10mM con un pH 8.0, se agregó glucosa 50mM (PM:198.2) Agua. La solución II se preparó al momento de usarla, con NaOH 0.2 Normal, se agregó SDS al 1 % más agua estéril la Solución III, se mezcló y almacenó a temperatura ambiente. La solución quedó a 3M de acetato de potasio, se le añadió ácido acético glacial 11.3ml Agua estéril 28.8 ml y se ajustó el pH a 4.8

Digestión de ADN Plasmídico

El reactivo de la muestra fue de 1µl, se obtuvo el producto de las clonas de 4 µl, se añadió buffer adecuado a la enzima de 1.5 µl, mas una enzima ECO RI 0.5 µl, y se adicionó agua mili Q 8 µl, obteniendo un total de la mezcla de 15 µl, posteriormente se procedió con el protocolo de secuenciación.

Preparación del Inóculo de Aislamientos de *Trichoderma* spp.

Para evaluar el crecimiento de cada una de las distintas cepas de *Trichoderma harzianum* (1) y *T. harzianum* (22), cepas comerciales G-42 (*T. virens*) y T-22 (*T. harzianum*), fueron crecidas por 7-10 días en medio PDA bajo luz blanca para favorecer la conidiación. Después se colectaron las conidias de cada hongo con agua destilada estéril. Se cuantificaron las conidias en la cámara de Neubauer, para inocularlas con una concentración de 1×10^6 , posteriormente se realizaron pruebas de esporulación en distintas cantidades de vermiculita combinada con arroz o trigo.

Se realizaron 4 combinaciones; primera 20 gramos de arroz y 15 gramos de vermiculita, segunda 10 gramos de arroz con 30 gramos de vermiculita, tercer

Combinación 5 gramos de arroz, con 35 gramos de vermiculita y la última 196 gramos de arroz y 107.5 gramos de vermiculita. Con 2 repeticiones para cada uno de los ensayos, se inocularon los tubos en campana, se colocaron en incubadora (lumistel) a (25 - 28 °C). Se revisó diariamente el crecimiento de los hongos en los sustratos. Considerando los datos anteriores, se prepararon 6 bolsas con 196 gramos de arroz, 107.5 gramos de vermiculita, combinando ambos materiales. Se esterilizaron 2 veces en autoclave por 15 minutos a 120 °C, se inocularon las bolsas con el contenido en campana, volviendo a sellar, se colocaron en incubadora bioclimática (lumistel) a 25 -- 28 °C. Las bolsas inoculadas fueron monitoreadas diariamente para detectar problemas de contaminación, y al mismo tiempo fueron mezcladas para favorecer el crecimiento homogéneo durante 14 días.

Promoción del Crecimiento de las Cepas de *Trichoderma* spp., en Almacigo

El trabajo se inició con una inoculación en almacigo de plántulas de Chile, aproximadamente 30 días después de haberse sembrado, posteriormente se realizó una segunda aplicación, 8 días previo al trasplante en campo. Los inóculos obtenidos de las distintas cepas de *Trichoderma* spp., se aplicaron en los almacigos en forma directa al voleo. Se pretendía que el sustrato de vermiculita y arroz quedara bien distribuido, sobre el almacigo como primera aplicación. Posteriormente se adicionó el químico Biorend al almacigo para favorecer el crecimiento de *Trichodermas* spp., en una relación de 1 litro de Biorend por 200 litros de agua.

Al momento del trasplante se tomaron muestras vegetales de los almacigos para los distintos tratamientos y se determinó la biomasa de las plántulas. Se tomaron 10 plantas por tratamiento, se llevaron al laboratorio para su procesamiento, el cual, consistió en lavar perfectamente la raíz para posteriormente pesar la planta en una balanza analítica y determinar el peso fresco. Inmediatamente después se introdujeron en bolsas de papel de estraza y se colocaron en una estufa a 70 °C por 72h. Transcurrido este tiempo se tomaron las muestras de la estufa y se procedió a pesarlas nuevamente para determinar el peso seco.

Evaluación de las Cepas de *Trichoderma* spp., en Campo

Para evaluar las cepas de *Trichoderma* spp, se hizo un diseño de bloques completamente al azar con 8 tratamientos y 4 repeticiones (Cuadro 2). Se usaron 8 surcos de aproximadamente 90 m de largo por 1.30 m entre surcos, con un aproximado de 300 plantas por surco en cada unidad experimental. Para la aplicación de los tratamientos, se adicionaron 18 litros de agua a una mochila con la cepa correspondiente, disolviendo el sustrato con las manos, y pasándose por un colador, para posteriormente aplicarlas por el sistema de riego a los distintos surcos; la mochila se conectaba a una toma de agua que alimentaba los 8 surcos correspondientes al número y cepa de referencia de cada bloque. Las conidias de las distintas cepas fueron ajustadas a una dosis de 1 gramo/litro y a una concentración de 1×10^7 UFC/gramo,

Como se recomienda por los proveedores de las cepas comerciales *T. harzianum* (T-22) y *T. virens* (TvG-42) aplicadas por el sistema de riego.

Como se indica en el Cuadro.1 Th1 *T. harzianum*, (TvG-42 *T. Virens* y IMI206040 (Ta) *T. atroviride* cepas comerciales de Referencia), Th22 *T. harzianum*, Tc *Trichoderma citrinoviride*, Tp *Trichoderma pipluliferum*.

Durante el desarrollo del cultivo se hicieron 3 aplicaciones de las cepas en campo. Estas aplicaciones se realizaron aproximadamente cada 30 días. Previo a cada tratamiento se contabilizó el número total de plantas por surco. Posteriormente, se cuantificaron plantas vivas y muertas por surco, para determinar el porcentaje de plantas afectadas por las enfermedades.

Cuadro 1. Tratamientos para la evaluación de cepas antagónicas en campo.

Tratamiento	Nomenclatura	Nombre científico
1	Th1	<i>T. harzianum</i>
2	TvG-42	<i>T. virens</i>
3	IMI206040 (Ta)	<i>T. atroviride</i>
4	Th22	<i>T. harzianum</i>
5	Tc	<i>T. citrinoviride.</i>
6	Tp	<i>T. piluliferum</i>
7	Químico	Clorotalonil+Metalaxil
8	Testigo	

Efecto de Metabolitos Secundarios en el Crecimiento de Plántulas de Chile

Se evaluó *in vitro* el efecto de los filtrados de cultivos en medio líquido (purificación parcial de las moléculas promotoras del crecimiento) en medio mínimo de *T. harzianum* (1) y *T. citrinoviride* en plántulas de chile, empleando como control positivo filtrados de *Aspergillus ustus* (Micheli) (Au). Las diluciones en el caso de las cepas de *Trichoderma* spp., como de *A. ustus* fueron de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 complementado con medio mínimo para plantas (MS). El experimento consistió en poner a crecer en MS líquido las diferentes cepas por 15 días a 28 ± 1 °C, sin agitación. Después de este tiempo se procedió a filtrar los medios para dejarlos libres de células. Para lo cual se utilizaron dispositivos con filtros de $0.45\mu\text{m}$ de tamaño de poro. Una vez que se tenía el medio libre de células se prepararon cajas Petri con las respectivas diluciones. En estas cajas se colocaron 4 semillas de chile germinadas con una radícula de aproximadamente 0.5 cm. Se dejaron crecer en estas cajas por 25 días al cabo de los cuales se procedió a pesarlas para determinar el peso fresco. Se colocaron en una estufa a 70 °C durante 72 h y se determinó el peso seco.

Con los datos de peso fresco y peso seco se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.5$).

Análisis Estadístico del Efecto de las Distintas Cepas de *Trichoderma* en Campo

Con los conteos de plantas muertas en campo se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.5$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de *Trichoderma* spp.

Dentro de las cepas aisladas de este trabajo se identificaron 14 de *Trichoderma harzianum* (anamorfo de *Hypocrea lixii*), 3 de *Trichoderma citrinoviride* y 2 de *Trichoderma piluliferum* (Cuadro 3). También se identificó una bacteria que inhibe el crecimiento de hongos, *Bacillus mojavensis*. Adicionalmente, se aislaron e identificaron hongos fitopatógenos como *Fusarium oxisporum* (Schitdl), *Phytophthora capsici* (de Bary), *Rhizoctonia solani* (J.G.Kuhn) y *Alternaria solani* (Cooke) entre otros.

Cuadro 2. Origen de aislados de *Trichoderma* spp.

Cepa	Invernadero	Campo	Origen
<i>Trichoderma harzianum</i>		8	Arista, SLP
<i>Trichoderma harzianum</i>	3		Arista, SLP
<i>Trichoderma harzianum</i>		3	Cd. Fernández, SLP
<i>Trichoderma citrinoviride</i>		3	San Felipe, Gto
<i>Trichoderma piluliferum</i>		2	Río Verde, SLP
TOTAL	3	16	19

En invernadero los cuidados contra plagas y enfermedades son más intensivos, por lo que se considera que la aplicación de fungicidas influyó de manera dañina en la presencia de organismos benéficos, motivo por el cual solo pudimos obtener 3

aislados de un invernadero de Villa de Arista en el cual se trabaja con suelo y no con sustrato comercial.

Antagonismo de Cepas de *Trichoderma* spp., vs Oomicetos y Hongos

Fitopatógenos

Se realizaron ensayos de confrontación de las diferentes cepas de referencia contra los hongos fitopatógenos, tales como *Fusarium oxisporum* (Schitdl), *Phytophthora capsici* (de Bary), *Sclerotium cepivorum* (Fuckel) y *Rhizoctonia solani* (J.G. Kuhn). En la Figura 1 se muestran resultados representativos de los experimentos de ensayos duales o de confrontación. Se observa que en general se presenta un patrón de sobrecrecimiento semejante o menor al de las cepas de referencia *T. atroviride* IMI206040 (Culture Collection No: IMI 206040; ATCC 20476) y *T. virens* Tv29.8 (Baek y Kenerley, 1998), entre ellas, dos de *T. harzianum* (1) (este trabajo) y una tercera de *T. citrinoviride* (este trabajo) resultaron más eficientes para determinar su capacidad de sobrecrecer, o inhibir el crecimiento de los fitopatógenos y formar la característica línea de lisis en la zona donde inicia la interacción de *Trichoderma* spp., con el hongo confrontado. En la Figura 2 se observa un acercamiento de *T. harzianum* (1) y *T. citrinoviride* vs *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*, dos de los principales causantes de la pudrición de la raíz en Chile. El resto de las cepas también fueron ensayadas para cultivos duales, pero ninguna resultó tan eficiente como las mostradas en la Figura 1.

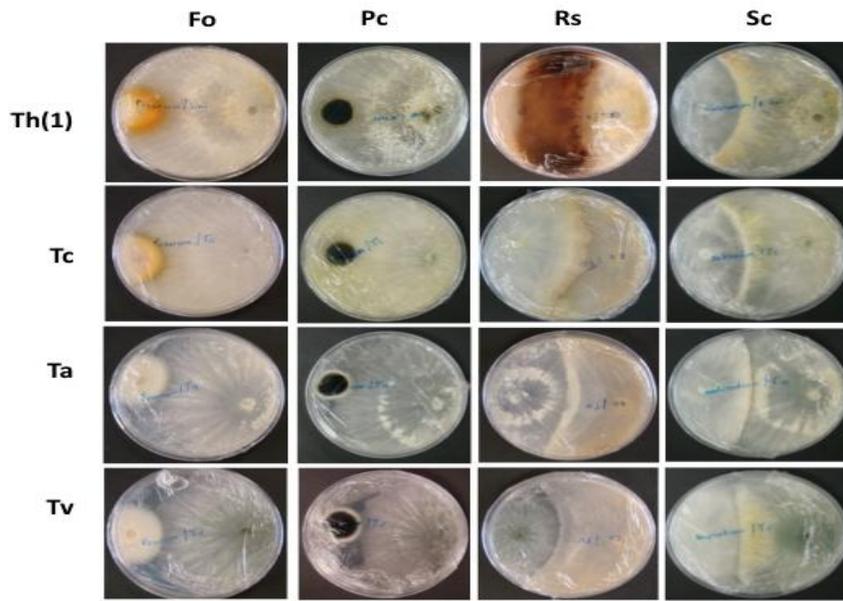


Figura 1. Ensayos duales o de confrontación de *Trichoderma* vs oomicetos y hongos fitopatógenos.

En la Figura 2 se aprecia la confrontación de las cepas. Se incluyen a las cepas de *T. citrinoviride* y *T. harzianum* (1), las cuales se muestran a la izquierda de las cajas de Petri.

Las cepas *T. citrinoviride* y *T. harzianum* y otras dos de *Hypocrea lixii* (anamorfo de *T. harzianum*) fueron seleccionadas para los ensayos en invernadero y campo, así como para los ensayos de inducción de los genes de defensa, debido a su capacidad para sobrecrecer e inhibir el crecimiento de oomicetos y hongos fitopatógenos.

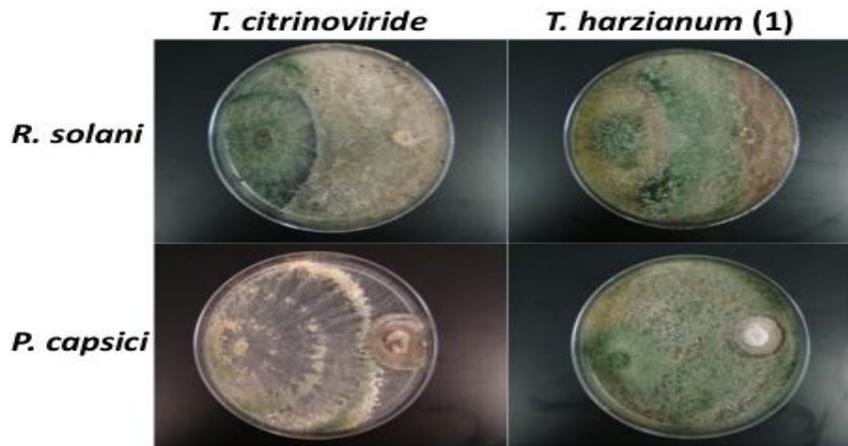


Figura 2. Confrontaciones mostradas en la figura 1.

Antibiosis de Metabolitos Producidos por *Trichoderma* spp. Vs Hongos y Oomicetos fitopatógenos

Como se puede observar en la figura 3, la cepa de referencia *T. virens* Tv29.8 fue capaz de inhibir el crecimiento de *R. solani* (J.G. Kuhn) y de *S. cepivorum*, (Fuckel), pero no el de los dos aislados de *P. capsici* (de Bary) y *F. oxysporum* (Schitdl), mientras que la cepa de *T. atroviride* IMI206040 inhibió prácticamente a todos los fitopatógenos. La cepa de *T. harzianum* al igual que la IMI206040 inhibió el crecimiento de todos los fitopatógenos probados. La cepa de *T. citrinoviride* aunque no inhibió el crecimiento de manera tan efectiva como lo hizo la cepa IMI206040 de *T. atroviride* o *T. harzianum* (1), fue seleccionada porqué retrasó el crecimiento de *P. capsici* y de *F. oxysporum* cuando se comparó con el resto de las cepas, incluida la Tv29.8.

Dado que los dos aislados de *T. harzianum* provenían de una misma muestra y el análisis molecular de las secuencias indica que podrían ser la misma cepa, se decidió trabajar solo con tres de ellas y la de *T. citrinoviride* en ensayos posteriores.

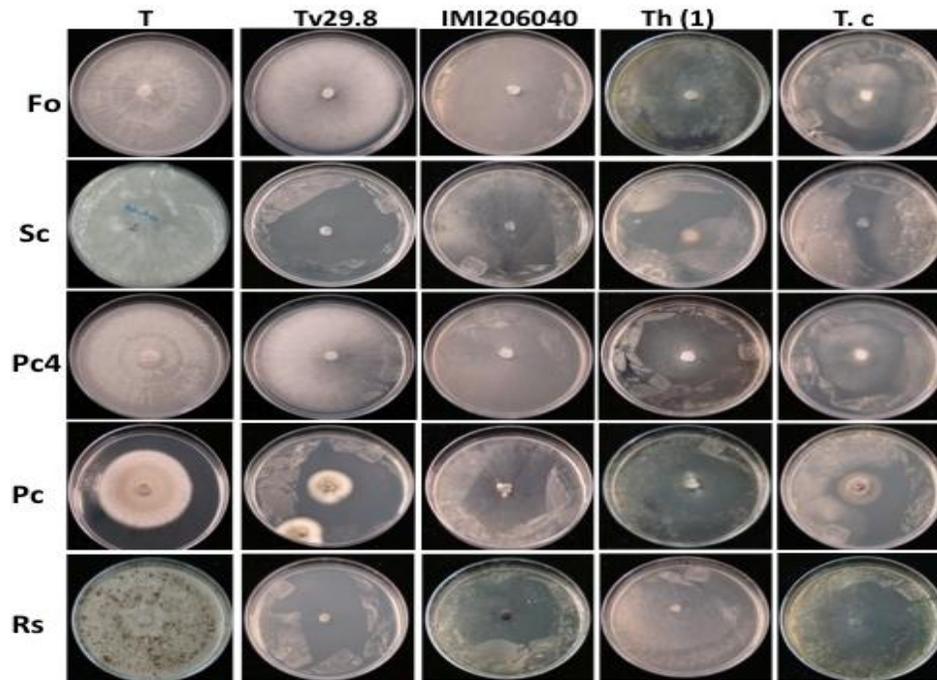


Figura 3. Ensayos de antibiosis.

Con respecto a la bacteria que se aisló e identificó molecularmente como *Bacillus mojavensis* (Cohn), se tienen resultados preliminares sobre su actividad antagónica contra hongos (Figura 4). En ensayos de confrontación y antibiosis contra cepas de *Trichoderma* spp., se observa que presenta capacidad para inhibir el crecimiento. Por tal motivo se considera que no podría utilizarse en formulaciones o mezclas junto con las cepas de *Trichoderma* spp., pero tal vez si puede ser aplicada por separado. Nótese el marcado efecto dañino sobre el crecimiento contra *B. cinerea* a diferencia del efecto dañino ejercido sobre el hongo benéfico *T. citrinoviride*.

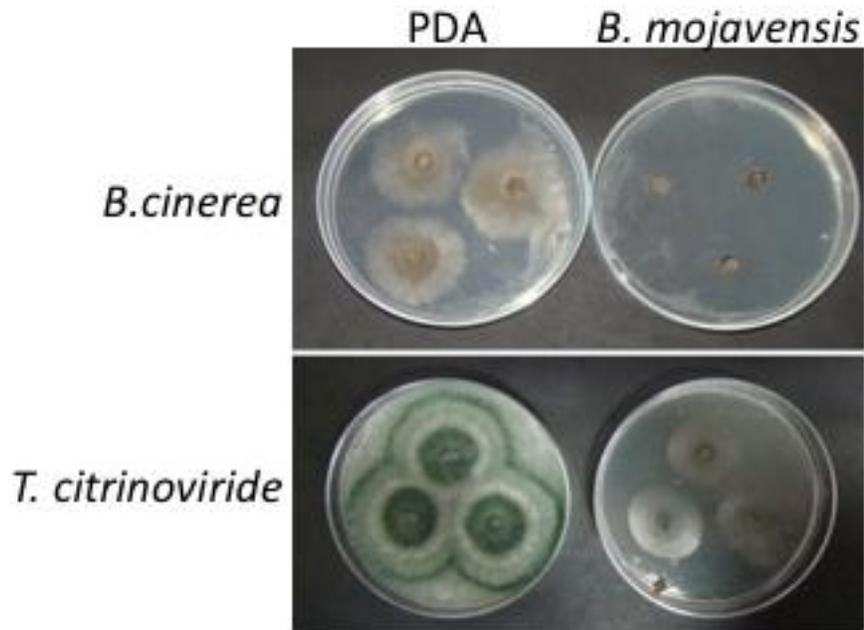


Figura 4. *B. cinerea* (de Bary)

Identificación de Patógenos

Se llevo a cabo la metodología descrita en materiales y métodos que concluyó con la secuenciación de cada una de las cepas, información que se ilustra en el Apéndice (Cuadro 3).

Formulación de *Trichoderma* spp., para Aplicación en Almácigo y Campo

Con la finalidad de determinar el mejor sustrato para la generación de inóculo, se realizaron distintas combinaciones de vermiculita con arroz o trigo, para posteriormente inocularlas con las distintas cepas de *Trichoderma* (ver materiales y métodos). Como resultado se obtuvo que la combinación de arroz con vermiculita

(25%/75%) resultó ser la mejor fórmula con una producción de 3.5×10^{10} unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de sustrato para cepas de *T. harzianum*, y de 5.4×10^9 para la cepa de *T. citrinoviride*. Para trigo las UFC fueron: 4.5×10^9 por gramo de sustrato para *T. harzianum*.

Promoción del Crecimiento de Cepas de *Trichoderma* spp., en Plántulas de Chile en Almácigo

Se determinó que las plántulas tratadas con la cepa de *T. citrinoviride* (Figura 5-A) para peso, presentaron en promedio 3.0 g de peso fresco y (Figura 5-B) 0.5 g de peso seco, mientras que con el testigo (agua) se obtuvo un promedio de biomasa para peso fresco de 2.0 g contra 0.3 g de peso seco.

Los resultados con la cepa *T. harzianum* (1) y *T. harzianum* (22) fueron muy similares a las presentados por las cepas comerciales TvG-42 (*T. virens*) y T-22 (*T. harzianum*). La cepa *T. harzianum* prácticamente dobló el peso fresco (4.0 g) y el peso seco (0.6 g) comparada con el testigo (Figuras 5-A y 5-B). La cepa Th (2) fue la que más peso fresco y seco produjo comparada con todos los demás tratamientos. El control químico presentó un comportamiento muy parecido a las cepas con menos generación de peso fresco, sin embargo, para peso seco si hubo diferencias significativas con todos los tratamientos, exceptuando el control con agua y con *T. virens* (TvG-42), donde los valores de estos oscilaron en alrededor de 3.0 g.

Las melgas de los almácigos tratadas con las distintas cepas, *T. citrinoviride* (Tc), *T. harzianum* (1), *T. virens* (TvG-42), *T. harzianum* (T-22), *T. harzianum* (22) (Th22) y *T. harzianum* (2) (Th2) utilizando el método por voleo, también se incluyeron los controles control Testigo absoluto (T) y un Control químico (CQ) (Clorotalonil+Metalaxil). Para cada tratamiento se determinó el peso fresco (A) y el peso seco (B).

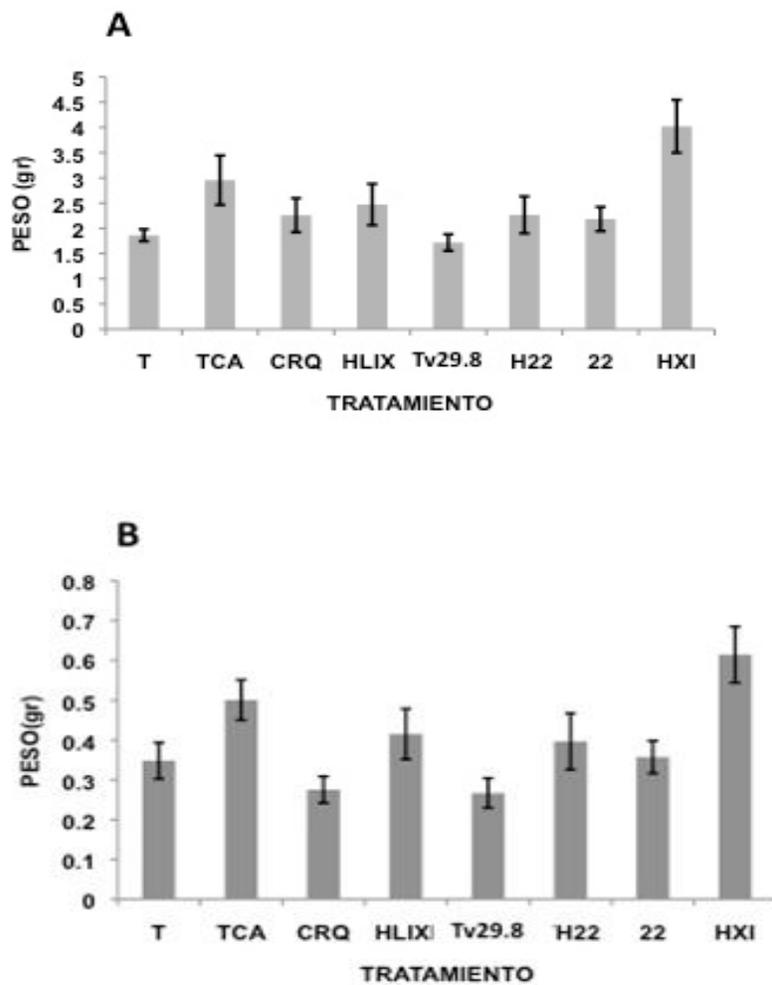


Figura 5. Efecto de la inoculación de *Trichoderma* spp., en plántulas de chile en condiciones de almácigo. a) Peso fresco b) Peso seco

Ensayos de Protección de Cepas de *Trichoderma* spp., en Campo

En el primer muestreo (Figura 6) se aprecia que existe un bajo porcentaje de plantas muertas, siendo el tratamiento control absoluto (T) donde se observó el mayor porcentaje (8%) de plantas muertas. Mientras que en los tratamientos con *T. harzianum*, *T. virens* G-42 y *T. harzianum* T-22, el porcentaje de plantas muertas no fue mayor de 3%. Para el caso de las distintas cepas aisladas en este trabajo, el porcentaje de plantas muertas osciló alrededor de 2%. Estos bajos valores se explican porque el ciclo del cultivo en campo apenas iniciaba, el muestreo para estimar el porcentaje de plantas muertas se hizo 15 días después del trasplante. En esta misma fecha se efectuó la primera aplicación de las cepas en campo.

El eje de la X muestra los distintos tratamientos, 1) T (Testigo absoluto), 2) Tc (*Trichoderma citrinoviride*) 3) Th(1) (*T. harzianum* (1)), 4) Th(2) (*T. harzianum* (2)), 5) Th(22) (*T. harzianum* (22)), 6) Tv G-41 (cepa comercial de *T. virens*, 7) T-22 (cepa comercial de *Trichoderma harzianum*), CQ (Manejo convencional químico que se le da al cultivo) (Clorotalonil+Metalaxil a una dosis de 2 kg por hectárea). En el eje Y se muestra el porcentaje de plantas muertas.

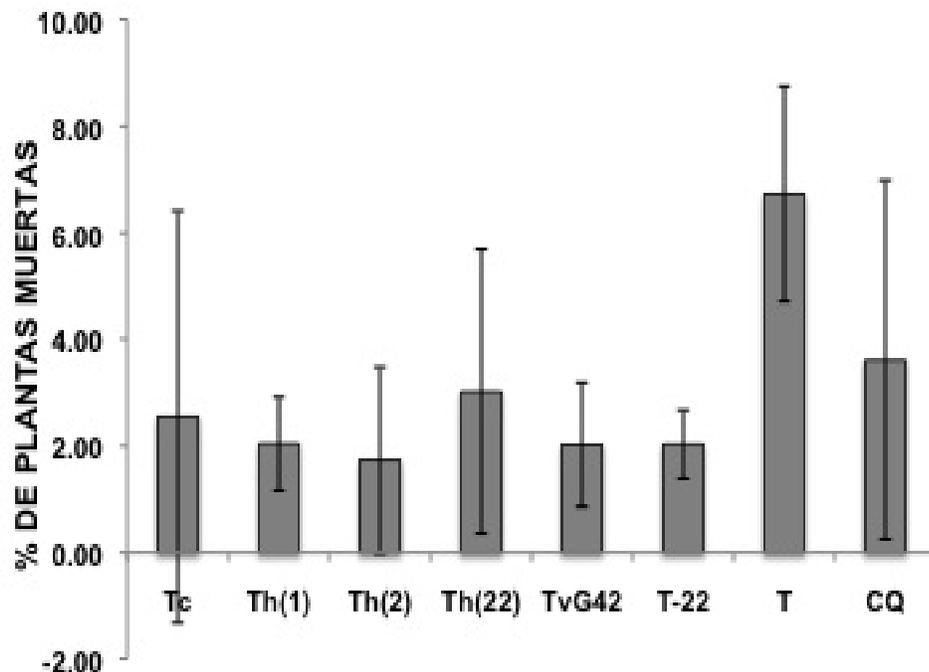


Figura 6. Efecto de las diferentes cepas en la protección de plantas de chile en campo en el muestreo I.

En la (Figura 7) se observa los resultados del muestreo II, del efecto de los tratamientos donde se inocularon las diferentes cepas de *Trichoderma*. El porcentaje de plantas muertas fue menor comparado con el porcentaje que se tiene en el control absoluto (T) o el tratamiento químico convencional (CQ). En este último, el porcentaje de plantas muertas fue superior a 12 %. En el tratamiento Th (22) el porcentaje de plantas muertas fue cercano a 4%. Las cepas Th (1) y Th (2), presentaron valores cercanos a 8%. Para las plantas tratadas con la cepa *T. citrinoviride* el porcentaje fue menor a 3.5%.

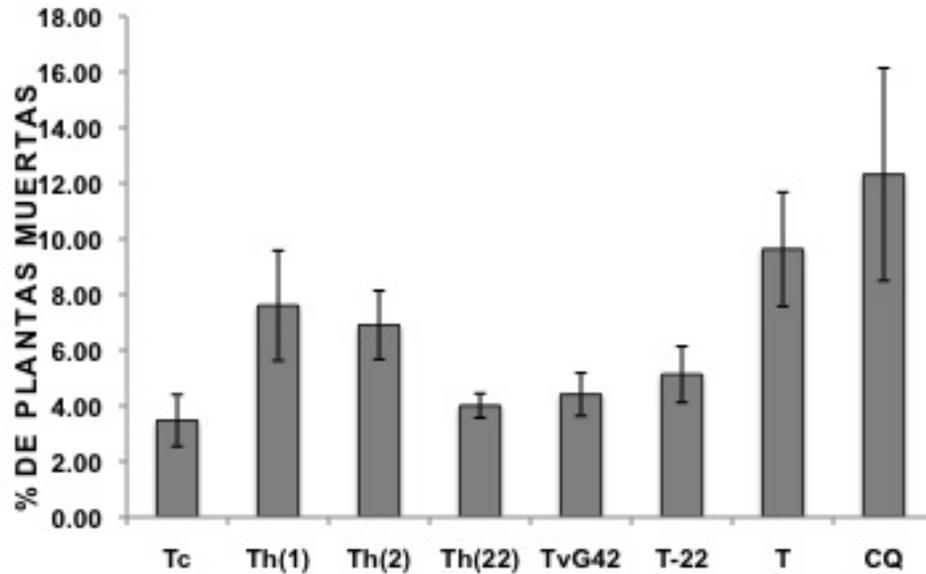


Figura 7. Efecto de las diferentes cepas en la protección de plantas de chile en campo en el muestreo II.

Como antecedente mencionaremos que a mediados que el ciclo del cultivo, se estableció un periodo de lluvia, que se extendió, por cerca de 15 días. Esto en términos prácticos para el manejo fitosanitario, resulta ser una condición poco favorable, sobre todo en suelos con antecedentes de pérdidas severas de cultivos causadas por enfermedades radiculares, como es el caso del lote donde se realizaron los experimentos. El lote que se destinó para la realización de este experimento se eligió dado sus antecedentes en ciclos previos donde en el inmediato anterior se tuvieron pérdidas cercanas a 90 % del cultivo, con un periodo de lluvias menor del presente ciclo agrícola. Por lo anterior, se realizó una tercera aplicación al inicio de las primeras detecciones de los problemas de “secadera”, esta aplicación se realizó 8 días después de la segunda aplicación para incrementar el inóculo de las distintas cepas de *Trichoderma* spp., en campo.

En la tercera evaluación del daño causado por el complejo de organismos que conforman la “secadera” encontramos que en tratamientos con *T. citrinoviride* e incluso la cepa comercial T-22 proporcionan buena protección, pese a las condiciones climáticas, el porcentaje de plantas muertas apenas llegó a 20%,

mientras que en el T o el CQ alcanzo más de 50% (Figura 8). Otras cepas con buen comportamiento de protección a plantas de chile en campo fueron *T. harzianum* (1) y *T. harzianum* (22) con 30 y 40% de plantas con secadera respectivamente.

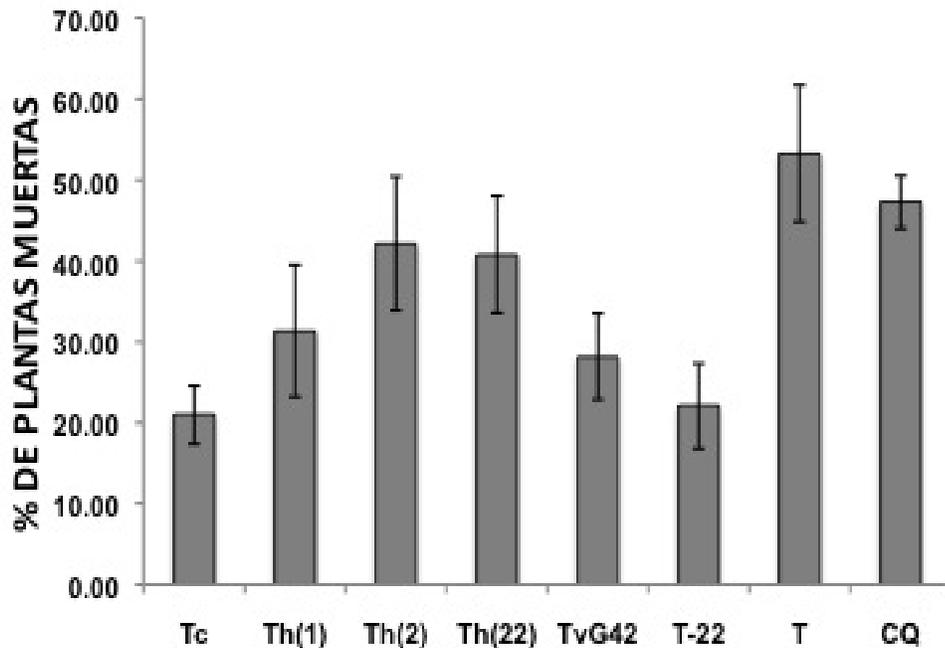


Figura 8. Efecto de las diferentes cepas en la protección de plantas de chile en campo en el muestreo III.

Metabolitos Secundarios en el Crecimiento de Plántulas de Chile

En cuanto al efecto de los metabolitos secundarios sobre el desarrollo de plántulas de chile, específicamente sobre el peso fresco, estadísticamente se separan algunos tratamientos (Figura 9). La dilución de 1/2 de *T. harzianum* (1) (1/2) y de *T. citrinoviride* (Tc) (1/2) no presentó crecimiento de plántulas respecto al control absoluto (MS). Se puede observar también que a medida que se diluye la concentración de los filtrados de todos los tratamientos, se incrementa el peso fresco de las plántulas, es decir, se estimulan el aumento en biomasa.

En la Figura 9, sobre el eje el eje de las X se muestran diferentes diluciones del cultivo de *T. harzianum* (Hx1), *T. citrinoviride* (Tc) y *A. ustus* (Micheli) (Au) (control positivo) crecidos con medio MS. El eje de las Y muestra el peso fresco en gramos.

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes Tukey ($p \leq 0.5$).

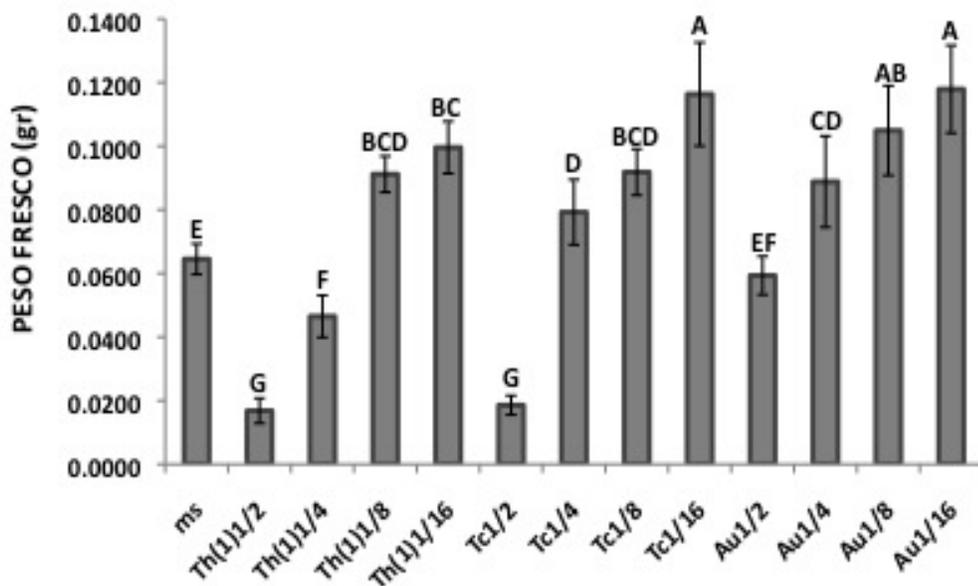


Figura 9. Moléculas promotoras del crecimiento en diferentes diluciones (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) en plántulas de chile poblano para peso fresco.

Existe diferencia estadística significativa (Tukey $p \leq 0.5$) en el efecto de los metabolitos sobre el peso seco de las plántulas de chile. Es decir, los resultados de peso fresco coincidieron con los de peso seco, lo que demuestra el incremento en la biomasa (Figura 10). Se aprecia el efecto positivo en el estímulo del crecimiento en el caso de Tc1/16, que estadísticamente se separa de los demás tratamientos,

reflejando un efecto en la promoción del crecimiento. Por otro lado, el mismo filtrado, pero a mayor concentración, actúa como un regulador negativo Tc1/2, sin embargo, en el tratamiento Au1/2 este efecto de regulador negativo se ve de manera más clara. Ambos tratamientos tienen los dos efectos comparado con el control absoluto (MS).

En la Figura 10, sobre el eje de las X se muestran diferentes diluciones del cultivo de *T. harzianum* (1), *T. citrinoviride* (Tc) y *Aspergillus ustus* (Micheli) (Au) (control positivo) crecidos con medio MS y este último como control. El eje de las Y muestra el efecto de las moléculas promotoras de crecimiento en diferentes diluciones sobre el peso seco de plántulas de chile. Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes Tukey ($p \leq 0.5$)

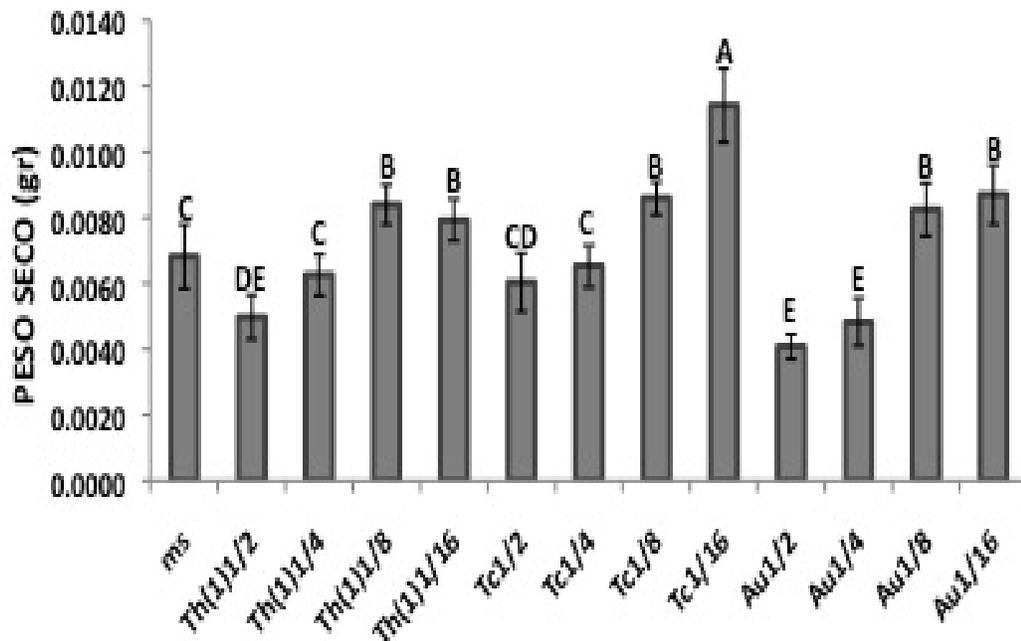


Figura 10. Moléculas promotoras del crecimiento en diferentes diluciones (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) en plántulas de chile poblano para peso seco.

Los resultados de la inhibición del crecimiento radial, muestran que todos los aislados de *Trichoderma* spp., presentaron efecto inhibitorio, el antagonista (*Trichoderma*) creció sobre el patógeno, posiblemente por mecanismos de antibiosis, micoparasitismo directo o penetración, resultando mejores aquellos aislados que presentan mayor capacidad para competir en el medio, ya que cubren el espacio vital y utilizan con mayor facilidad los nutrientes disponibles en el mismo. La mejor actividad fue observada para la cepa *T. harzianum* (Th1), la cual difiere significativamente del resto de los aislados, seguida por *T. citrinoviride* (Tc), *T. atroviride* IMI206040 y *T. virens* Tv29.8, no obstante, se asume que los aislados presentaron inhibición del crecimiento radial con una acción promisoriosa frente al patógeno. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por (Haggag and Mohamed, 2002) al evaluar cepas de *Trichoderma* spp, por la producción de altos niveles de celulasas, es como se inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia Solani* (J.G. Kuhn)

Con respecto a los ensayos duales, se observó que prácticamente todas las cepas de *Trichoderma* spp. sobrecrecieron e inhibieron a todos los fitopatógenos, sobresaliendo la cepa de *T. citrinoviride*, seguida por la cepa Th1 de *T. harzianum*, la cual esporula sobre los oomicetos mencionados, siendo muy eficaz en el tratamiento biológico de estos patógenos. En este sentido, varios trabajos han mostrado la eficacia de cepas de *Trichoderma harzianum* vs *P. capsici* (Ezziyyani *et al.*, 2004) en base a los resultados obtenidos en la investigación propuesta por Guédez *et al.* (2009).

En los ensayos de antibiosis los resultados para determinar la capacidad de los hongos en la producción de metabolitos secundarios que son capaces de matar o inhibir el desarrollo de los fitopatógenos se comparó con lo citado por Infante *et al.* (2009) donde refiere que *Trichoderma* produce 2 antibióticos más (Gliotixina y viridina), aunque a la fecha se han descrito muchos más, los cuales son importantes para llevar a cabo la actividad antibiótica contra los patógenos, lo que les confiere efectividad en el control de la enfermedad.

En los tratamientos aplicados en el cultivo de chile (*Capsicum annum*) se observó una disminución del daño donde se inoculó a las plantas con la cepa *Trichoderma* spp., la cual se supone inhibió el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, (J.G. Kuhn) y *S. cepivorum*(Fuckel), mientras que las cepas de *Trichoderma atroviride* IMI206040 y *Trichoderma harzianum* inhibieron prácticamente a todos los fitopatógenos in vitro. Esto ha sido documentado en trabajos anteriores sobre *P. capsici* (de Bary) o *F. oxysporum* (Schitdl), por medio de los metabolitos producidos y de antibióticos volátiles y no volátiles, que van suprimiendo el desarrollo de micelio y suprimen el crecimiento de los conidios. Los patógenos presentaron un efecto fungicida o fungistático de acuerdo con lo citado por (Michel, 2001). Por lo anterior, se hipotetiza que los metabolitos son capaces de inhibir el crecimiento de los fitopatógenos que mayor interés representaban para el objeto de estudio de esta investigación, sin embargo, esta parte es difícil demostrarla en campo. El uso de mutantes en la síntesis de metabolitos y su aplicación en campo ayudará a dilucidar esta pregunta.

Además de las cepas de *Trichoderma* spp., se aisló una bacteria con actividad antibiótica identificada como *Bacillus mojavensis*, la cual no solo presentó actividad contra fitopatógenos, sino contra los microorganismos benéficos del género *Trichoderma*. Se ha reportado que bacterias del género *Bacillus*, al cual pertenece la especie *mojavensis*, compiten por nutrientes (Mateluna, 2006), lo cual puede explicar el efecto observado en el presente trabajo. El hecho de haber observado el efecto negativo de *B. mojavensis* sobre las cepas de *Trichoderma*, nos llevó a no seguirla utilizando, ni pensar en una formulación conjunta, debido al efecto que esta podría generar en campo contra las cepas de *Trichoderma*.

Con respecto a la promoción del crecimiento y por lo tanto generación de biomasa, se determinó que las plantas tratadas con *T. citrinoviride* presentaron mayor peso fresco y peso seco en comparación con el testigo, así mismo, se observó que los resultados obtenidos en para las plántulas inoculadas con *T. harzianum*, coinciden con los de Jiménez *et al.* (2011), quien opina que la aplicación de *T. harzianum* en

semillero o en el trasplante pueden causar incremento en el crecimiento de la planta y desarrollo del sistema radical al obtener mayor masa fresca. Las variables evaluadas han sido comprobadas por distintos investigadores, entre ellos Jiménez *et al.* (2011), quienes refieren el crecimiento de las plantas debido a la inoculación con *Trichoderma harzianum*.

La protección de *Trichoderma* spp., a las plantas de Chile en campo, demostraron la efectividad que presentó la cepa *Trichoderma harzianum* (Th2) con un bajo porcentaje de plantas muertas, seguido de T-22 (Th1). En estudios anteriores se ha corroborado efectos similares en minimizar los daños causados por las enfermedades producto de los hongos que se encuentran en el suelo. En cultivos de tomate, tabaco y pimiento, Stefanova (2007) comprobó lo antes mencionado, al señalar que la cepa de *Trichoderma* spp, reduce la enfermedad Damping Off.

CONCLUSIONES

Se identificaron catorce cepas de los hongos ascomicetos *Trichoderma harzianum*, tres de *Trichoderma citrinoviride* y dos de *Trichoderma piluliferum*,

Estas cepas presentan potencial para poder ser utilizados en el combate de enfermedades provocadas por oomicetos y hongos fitopatógenos.

Se identificó una bacteria que inhibe el crecimiento de hongos, la cual fue identificada molecularmente como *Bacillus mojavensis*.

Se estableció el mecanismo de interacción de *Trichoderma* con plantas, así como su capacidad de inducir respuesta sistémica inducida y adquirida.

Se determinó que los filtrados libres de células de dos cepas de *Trichoderma* presentan actividad de regulador del crecimiento, ya que a concentraciones muy altas inhibe el crecimiento de las plantas y a medida que se diluye se incrementa el crecimiento y desarrollo, incluso más que las plantas control.

Se determinó que la combinación de arroz con vermiculita (25%/75%) fue el mejor sustrato para la generación de inóculo de las diferentes cepas de *Trichoderma* para su posterior utilización en condiciones de invernadero y de campo.

Los ensayos en campo nos dieron la pauta para determinar Qué cepas pueden ser utilizadas en el control de enfermedades provocadas por oomicetos y hongos fitopatógenos en cultivos de chile y tomate en los estados de Guanajuato y San Luis Potosí.

Se recomienda la utilización de las cepas *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma harzianum* en campo, las cuales resultaron ser las mejores en los ensayos de protección y promoción del crecimiento para producción de chile.

RECOMENDACIONES

Aplicar *Trichoderma* spp., en almácigo antes y después del desarrollo de la plántula, para prevenir las enfermedades que puedan causar daño a la raíz y hojas antes del trasplante al sitio de siembra.

Aplicar nuevamente *Trichoderma* en periodos de 1 mes al momento del trasplante y en forma periódica, con el fin de estimular el desarrollo radicular, el crecimiento de la planta, prevenir enfermedades fúngicas como la secadera o pudrición de la raíz que causen pérdidas en plantas muertas, incrementar la biomasa de las plántulas en peso seco y peso fresco.

Continuar investigando sobre los beneficios que estas cepas puedan ejercer sobre el mejoramiento y conservación de nuestro ambiente, al implementar el uso de biocontroladores en lugar de fertilizantes químicos.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2009. Fitopatología. Ed. Limusa. México, D.F. p. 4.
- Agrios, G. N. 2007. Fitopatología. Ed. Limusa. México, D.F. p. 46.
- Baek, J. M. and Ch. M. Kenerley. 1998. The *arg2* Gene of *Trichoderma virens* Cloning and Development of a Homologous Transformation System. Fungal Genetics and Biology vol 23. pp. 34-44.
- Barrios, M. M. A. 2006. Estudio de hongos endófitos como inductores de resistencia para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátanos. Tesis de Maestría en Ciencias. CATIE. Costa Rica. p. 23.
- Botero, O. MA. J. 1999. Estudio de la interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc., Agente causal de la antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betacea*) (Cav. Sendt.). Informe parcial de Tesis en M. Sc. Corpoica. p. 31.
- Chávez, G. M., J. S. Montaña Lara., Ma. M. Martínez Salgado., M. Mercado Reyes., Ma. X. Rodríguez y B. Quevedo Hidalgo. 2009. Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* spp., Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. D.C. vol. 13 no. 3 246 p.
- Cruz, M. L. C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma Koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. p. 24.
- Ezziyyani, M., C. Pérez Sánchez., A. Sid Ahmed., Ma. E. Requena, & Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) Anales de Biología vol. 26. pp. 35-45.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations ... FAOSTAT provides time-series and cross sectional data relating to food and agriculture for some 200. countrys. [http:// faostat.fao.org/default.aspx](http://faostat.fao.org/default.aspx) (2010) (2012, Enero 15)

- González, I. D. Infante, B. Peteira, B. Martínez, Y. Arias, N. González y I. Miranda. 2011. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp., promisorios como agentes de control biológico II expresión de actividad glucanasa. Revista de protección vegetal v.26 no. 1 pp. 58-63. Database: Scielo (2011, Noviembre 15)
- Guédez, C., L.M. Cañizalez., C. Castillo y R. Olivar. 2009. Micro flora asociada a dos sustratos orgánicos y su efecto en el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn Agronomía Colombiana vol. 27 no.3 p. 395.
- Hernández, D. Ma. I. y L. M. Chailloux, 2001. La nutrición mineral y la Biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Ensayos. Instituto de investigaciones hortícolas Liliana Diminova. vol. 5 n. 13 pp. 6-7.
- Hinojosa, C. J., N. Valero y L. Mejía. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). Agronomía Colombiana. Vol. 27 no. 1 p. 81.
- INEGI. 2012. Estadísticas Mexicanas Censo Agropecuario 2007. VIII censo agrícola ganadero y forestal Aguascalientes Ags. 2009.<http://www.campopotosino.gob.mx/INEGI> (2012, Enero 25)
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Villa de Arista, San Luis Potosí. pp: 1-0 (2012, Enero 25)
- Inforural. México (2010) primer lugar mundial en producción de chile verde y sexto en la de chile seco. [Online]. http://www.inforural.com.mx/centro.php?id_rubrique=26&id_article=61383 (2011, Diciembre, 14)
- Nee, M., 1986, Solanaceae I. En Sosa, V. (Ed.) Flora de Veracruz, Fascículo 49.<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm> (2011, Diciembre 14)
- Humeres, V. C. A. 2004. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp., sobre aislados de hongos basidiomicetes asociados a muerte de brazos en kiwi. Memoria de Título. Universidad de Talca-Chile. p. 19.

- Infante, D. B. Martínez., N. González y Y. Reyes, 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal v.24. no. 1 pp. 14-21. Database: Scielo (2011, Noviembre 15)
- Jiménez, C., N. Sanabria de Albarracín., G. Altuna y M. Alcano. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Revista de Facultad Agronomía. vol. 28 p. 6. Database: LUZ (2011, Noviembre 15)
- Haggag, W. M. and H. A. A. Mohamed. 2002. Enhancement of antifungal metabolites production from gamma-ray induced mutants of some *Trichoderma* species for control onion white rot disease. Plant Pathology Bulletin 11 p. 53.
- Mateluna, E. R.A. 2006. Estudio de Actividad antibacteriana de potenciales biocontroles sobre bacterias acéticas involucradas en la producción acida de la uva. Memoria para optar el título de Ingeniero en alimentos. Universidad de Santiago de Chile. p. 21.
- Michel, A. A. C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp *Euscomycetes hipocreales*, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y (Hyphomycetes: *Hyphales*) Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias Universidad de Colima. p. 17.
- Michel, A. A. C., M. A. Otero Sánchez., O. Rebolledo Domínguez y R. Lezama Gutiérrez. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentil a pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología. vol. 22, numero 001 pp. 14-21. Database: Redalyc (2011, Noviembre 15)
- Michel, A. A. C., M. A. Otero Sánchez., O. Rebolledo Domínguez., R. Lezama Gutiérrez y M.E. Ochoa Moreno. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. En la inhibición de *Fusarium subglutinans* y f. *oxysporum* in vitro. Revista de Chapingo Serie horticultura vol. 11, no. 002 pp. 273-278. Database: Redalyc (2011, Noviembre 15)
- Minchala, V. T. P. 2007. Proyecto de inversión para la elaboración de bioproducto con microorganismos para el control de las enfermedades de las plantas. Tesis de grado. Escuela superior politécnica del litoral. Guayaquil- Ecuador p.25.

- Monreal, V. C. T. 2005. Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas. Tesis de maestría en Ciencias en biología Molecular, IPICYT S.L.P. pp. 30 y 49.
- Stefanova, M. N. 2007. Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp., en Cuba. Fitosanidad. vol. 11. No. 3 pp. 75-79. Database: Redalyc (2011, Noviembre 15)
- Pérez, V. L., A. Batle Viera., J. Chacón Benazet y V. Montenegro Moracen. 2009. Eficacia de *Trichoderma harzianum* a 34 en el biocontrol de *fusarium oxysporum* f. sp. *Cúbense*, agente causal de la marchitez por *fusarium* o mal de Panamá de los bananos en Cuba. Fitosanidad. v. 13 no. 4 pp. 1-6. Database: Scielo (2011, Noviembre 15)
- Salas, B. W y V. Sánchez Garita. 2006. Avances en el control biológico de *Botrytis cinerea* en chile y tomate cultivados bajo techo. Manejo integrado de plagas y Agroecología. Costa Rica no. 78 p. 57.
- Sánchez, D. F. y R. Álvarez Zamorano. 2004. Enfermedades del tomate y chile Bell. Ed. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. pp. 18-19.
- Sarabia, O. M., R. Madrigal Pedraza., M. Martínez Trujillo y Y. Carreón Abud. 2010. Plantas, hongos micorrizicos y bacterias su compleja red de interacciones. Revista de la DES Ciencias Biológicas Agropecuarias vol. 12 no. 1 pp. 65-71.
- Siannah, M. Mas Diego., A. Gonzales Morla., S. Melek Campos y P. Dainelis Cabeza. 2001. Desarrollo de un bioplaguicida de *Trichoderma* sp., sobre soporte sólido con aplicación de campos electromagnéticos. Tecnología química Vol. XXI. No.3 p.1.
- Tovar, C. J. C. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista in vivo de aislamientos de *Trichoderma* spp., frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. p. 15.
- Vilches, P. L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis para optar título profesional de Biólogo. Con mención de microbiología y parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. P. 7.

APENDICE

Apendice 1. Organismos identificados por medio de secuenciación.

Muestras			
Genero	GenBank (NCBI)	Clona	Observación
<i>Aspergillus ostianus</i>	<u>FJ4780</u> <u>90.1</u>	A01_2F, A08_16F, B03_30F, B11_46F, B12_48F, C02_52F, E04_23F, E05_25F, F05_49F, F06_51F, F12_62F, G08_70F, G11_73F,	Hábitat en arroz con cascara. Fitopatógeno.
<i>Fusarium camptoceras.</i>	<u>EU520</u> <u>082.1</u>	E09_33F, G02_64F, G04_66F,	Se ha encontrado en fruta de banana en América Central. Fitopatógeno.
<i>Fusarium equiseti</i>	<u>AB470</u> <u>890.1</u>	A02_4F, B02_28F, B04_32F,	Patógeno de raíces de plantas. Ocasiona la

	<u>FJ4599</u>	E09_33F,	podredumbre
	<u>81.1</u>	G02_64F,	radical de la colza
	<u>FJ4599</u>	G04_66F,	(canola).
	<u>75.1</u>	G12_74F,	
<i>Fusarium</i>	<u>AY213</u>	A02_4F,	Patógeno en
<i>chlamydosporum</i>	<u>655.1</u>	B02_28F,	granos cereales.
		B04_32F,	Avena, sorgo
		G12_74F,	
<i>Fusarium solani.</i>	<u>AB470</u>	D08_7F,	Fitopatógeno.
	<u>904.1</u>	E02_19F,	causante de la
	<u>FJ7198</u>	E10_35F,	podredumbre del
	<u>12.1</u>		tomate en raíz
<i>Fusarium</i>	<u>EF589</u>	G03_65F,	Patógeno de
<i>tricinctum</i>	<u>875.1</u>		plantas oportunista
			principalmente en
			granos de cereales.
			Y algunas veces
			ocasiona
			enfermedades en
			humanos y
			animales como
			agente oportunista.
<i>.Fusarium sp.</i>	<u>GQ505</u>	A02_4F,	Se encuentra como
	<u>759.1</u>	B02_28F,	sapofito del suelo
	<u>EU750</u>	B04_32F,	es patógeno de
	<u>680.1</u>	B10_44F,	plantas y bacterias,

		C04_56F, C05_58F, D08_7F, E02_19F, E09_33F, E10_35F, E12_39F, F03_45F, G01_63F, G02_64F, G04_66F, G05_67F, G12_74F,	en humanos produce infecciones.
	<u>EU594</u> <u>570.1</u> <u>DQ657</u> <u>851.1</u>		
<i>Aspegillus melleus</i>	<u>EF661</u> <u>426.1</u>	A03_6F y A01 2F	Actividad insecticida biocontrolador fitopatógeno.
<i>Aspergillus ustus.</i>	<u>AY373</u> <u>879.1</u> <u>AY373</u> <u>876.1</u>	E03_21F	Patógeno oportunista su hábitat es el heno y el compostaje.
<i>Penicillium vinaceum</i>	<u>EU833</u> <u>227.1</u>	A04_8F A06_12F, A07_14F, A10_20F, A12_24F, B05_34F, B06_36F,	, Se encuentra en materia saprofita del suelo.

		C01_50F,	
		C03_54F,	
		C06_60F,	
		D07_5F,	
		D12_15F	
		E01_17F,	
		E06_27F,	
		E11_37F,	
		F02_43F,	
		F04_47F,	
		F08_55F,	
		F09_57F,	
		F10_59F,	
		F11_61F,	
		G07_69F,	
		G09_71F,	
		G10_72F,	

<i>Penicillium</i>	<u>GQ305</u>	D12_15F,	Produce toxinas en
<i>griseofulvum</i>	<u>305.1</u>	F11_61F,	humanos y
			animales por su
			ubicuidad en
			diversos sustratos,
			granos, fruta,
			cueros.

<i>Penicillium</i>	<u>GQ161</u>	D07_5F,	Produce toxinas.
--------------------	--------------	---------	------------------

<i>dipodomycola</i>	<u>752.1</u>	F02_43F, F09_57F, G09_71F,	
<i>Penicillium gladioli</i>	<u>DQ339</u> <u>568.1</u>	F09_57F,	Fitopatógeno se encuentra principalmente en las flores de gladiolas.
<i>Neurospora sp.</i>	<u>GU183</u> <u>173.1</u>	A05_10F, A09_18F, B09_42F	Modelo de estudio en Biología molecular.
<i>Neurospora crassa.</i>	<u>FJ3605</u> <u>21.1</u>	A05_10F, A09_18F, B09_42F	Inhibidor de crecimiento homeostático. No se le considera patógeno
<i>Neurospora tetrasperma.</i>	<u>FJ9049</u> <u>22.1</u>	A05_10F, A09_18F, B09_42F	Hongo filamentoso, no se le considera patógeno.
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<u>GU932</u> <u>679.1</u>	A11_22F, B07_38F, D05_1_F, F01_41F, G06_68F,	Hongo que vive en material saprofito.
<i>Actinomucor elegans</i>	<u>AM745</u> <u>429.1</u>	B08_40F, D06_3F,	Se localiza en estiércol y material

	<u>FJ1763</u>	F07_53F,	vegetal saprofito
	<u>96.1</u>		
	<u>AY492</u>		
	<u>088.1</u>		
	<u>AY492</u>		
	<u>087.1</u>		
<i>Cylindrocarpon</i>	<u>AM419</u>	B10_44F,	Patógeno de
<i>destructans</i>	<u>062.1</u>	DD08_7F,	plantas, agente
		D09_9F,	causal de la
		E02_19F,	podrición de la raíz
		E10_35F,	en ginseng.
		E12_39F,	
		F03_45F,	
		G01_63F,	
		G05_67F,	
<i>Nectria</i>	<u>AY310</u>	B10_44F,	Patógeno de
<i>haematococca</i>	<u>442.1</u>	D09_9F,	plantas se le puede
		E02_19F,	encontrar en
		E10_35F,	material saprofito.
		E12_39F,	
	<u>GU066</u>	F03_45F,	
	<u>713.1</u>	G01_63F,	
	<u>GQ365</u>	G05_67F,	
	<u>155.1</u>		
<i>Gibberella</i>	<u>GU982</u>	C05_58F,	Patógeno de
<i>moniliformis</i>	<u>311.1</u>	E08_31F,	plantas

	<u>GQ466</u>		asintomático.
	<u>390.1</u>		
	<u>EU151</u>		
	<u>483.1</u>		
<i>Gibberella fujikoroi.</i>	<u>AY188</u> <u>916.1</u>	E08_31F	Fitopatógeno de plantas
<i>Gibberella avenacea</i>	<u>EF589</u> <u>875.1</u>	G03_65F	Patógeno de plantas
<i>Penicillium expansum</i>	<u>EF491</u> <u>160.1</u>	D05_1F	Patógeno de plantas principalmente en el manzano
<i>Trichoderma atroviride</i>	<u>EU520</u> <u>084.1</u>	E03_21F	Fitopatógeno
<i>Uncultured fungus</i>		E07_29F, G03_65F, G06_68F,	No es patógeno causal en <u>GU721670.1</u> con <u>AF026784.1</u>
<i>Discorea polystachya</i>	<u>FJ8600</u> <u>81.1</u> <u>FJ8600</u> <u>75.1</u>	F01_41F	Fitopatógeno de plantas en el este de los Estados Unidos.
<i>Fungal endophyte</i>	<u>FJ3780</u>	F01_41F	Hospedero de

.	<u>87.1</u>		plantas.
<i>Thanatephorus cucumeris.</i>	<u>DQ339</u> <u>103.1</u>	G01_63F, G05_67F,	Fitopatógeno.
<i>Lacazia loboii</i>	<u>AF035</u> <u>674.1</u>	G03_65F,	No es fitopatógeno
<i>Phialocephala sp.</i>	<u>FM999</u> <u>988.1</u>	G03_65F,	No es patógeno.