



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa de Maestría en Producción Agropecuaria

**Antagonismo de aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de
Phytophthora capsici *in vitro***

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestra en Producción Agropecuaria
Opción: Terminal Agrícola**

PRESENTA:

IBT. KIRSTEN LIZETH ARRIAGA SOLORIO

DIRECTORA

DRA. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVÍA

CO-DIRECTOR

DR. GERARDO RODRÍGUEZ ALVARADO

Morelia Michoacán, Febrero 2021.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Patología Vegetal en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la dirección de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía y co-dirección por el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado. Así también con el apoyo incondicional de mi comité tutorial, el Dr. John Larsen, el Dr. Luis López Pérez y el Dr. Alejandro Martínez Palacios.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) beca N° 719440.

DEDICATORIA

A mis padres: Arturo Arriaga Zamayoa y Ma. Del Rosario Solorio Sánchez, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, siendo mi apoyo incondicional en cada momento y en mi desarrollo profesional, por ser mi motivación y por seguir enseñándome día con día. Por su grande esfuerzo y dedicación para vernos realizados a mis hermanos y a mí. Por su enorme corazón bondadoso y lleno de amor, les doy infinitas gracias.

A mis hermanos: Ma. Monserrat Arriaga Solorio y Arturo Arriaga Solorio, por su apoyo y por creer en mí.

A mis sobrinas: Naiara y Ainara, para ser un ejemplo en su vida y cuando crezcan luchen por sus sueños día a día.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.

A la Doctora Sylvia Patricia Fernández Pavía, por abrirme las puertas de su laboratorio y recibirme con la mejor disposición, así como por estar al pendiente en cada momento durante mi proceso de formación.

Al Doctor Gerardo Rodríguez Alvarado por haberme recibido con la mejor disposición sin conocerme y haberme dado la confianza para trabajar en su laboratorio y con su equipo, así como por la paciencia de trabajar conmigo.

A mi comité sinodal: Dr. Luis López Pérez, Dr. Alejandro Martínez Palacios, Dr. John Larsen por haber sido parte de mi formación profesional y por su apoyo en cada momento requerido.

Al doctor Miguel Ángel Esparza de la empresa Altus Biopharm ubicada en Zapopan, Jalisco, por haberme recibido para realizar una estancia profesional.

A mis diferentes profesores que participaron cada semestre en formarme lo que hoy en día soy (Dra. Melba, Dr. Mauricio, Dr. Daniel Val, Dra. Leticia F.P., M.C. Nuria, M.C. Nayda).

A mis compañeros de laboratorio, quienes me enseñaron y aportaron experiencias y conocimientos muy buenos que aplicaré en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE CUADROS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. El cultivo de chile en México	15
2.2. <i>Phytophthora capsici</i>	15
2.2.1. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora capsici</i>	16
2.2.2. Síntomas y ciclo de la enfermedad	16
2.3. <i>Trichoderma</i>	19
2.3.1. Aspectos generales.....	19
2.3.2. Clasificación taxonómica.....	19
2.3.3. Efecto de factores bióticos y abióticos en el desarrollo y eficacia de <i>Trichoderma</i>	20
2.3.4. Mecanismos de biocontrol.....	21
2.3.4.1 Antibiosis.....	21
2.3.4.2 Competencia por nutrientes	22
2.3.4.3 Micoparasitismo	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general	24
5.2. Objetivos específicos	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Obtención de cepas.....	25
6.2. Confrontaciones duales.....	25
Experimento no. 1.....	25
Experimento no. 2.....	26
6.3. Efecto de metabolitos secundarios volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre <i>P. capsici</i>	26

Experimento no. 3.	27
Experimento no. 4.	28
Experimento no. 5.	28
Experimento no. 6.	29
6.4. Efecto de metabolitos secundarios no volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre <i>P. capsici</i> ..	29
Experimento no. 7.	30
Experimento no. 8.	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Confrontaciones duales	32
Experimento no. 1.	32
Experimento no. 2.	34
7.2. Eficacia de metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Phytophthora capsici</i>	35
Experimento no. 3.	36
Experimento no. 4.	36
Experimento no. 5.	37
Experimento no. 6.	38
7.3. Eficacia de metabolitos secundarios no volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre <i>P. capsici</i>	39
Experimento no. 7.	39
Experimento no. 8.	41
7.4 Comparación del efecto inhibitorio de la cepa de <i>Trichoderma</i> que generó mayor inhibición.....	45
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	49
10. REFERENCIAS	50
11. ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la enfermedad causada por <i>Phytophthora capsici</i>	18
Figura 2. Confrontaciones duales. T = <i>Trichoderma</i> , P = <i>Phytophthora capsici</i>	26
Figura 3. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles. T = <i>Trichoderma</i> , P = <i>Phytophthora capsici</i> , experimento 1	27
Figura 4. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles. T = <i>Trichoderma</i> , P = <i>Phytophthora capsici</i> , experimento 2	28
Figura 5. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles. T = <i>Trichoderma</i> , P = <i>Phytophthora capsici</i> , experimento 3	29
Figura 6. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles utilizando cajas con división. T = <i>Trichoderma</i> , P = <i>Phytophthora capsici</i> , experimento 4.....	29
Figura 7. Evaluación de metabolitos secundarios no volátiles. T= medio sólido con metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> y P = <i>Phytophthora capsici</i>	31
Figura 8. Confrontaciones duales con los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62 y 42 frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282	33
Figura 9. Crecimiento radial en cm de <i>Phytophthora capsici</i> en las confrontaciones duales en medio de cultivo PDA, con los 12 aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	34
Figura 10. Evaluación de las confrontaciones duales con los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-48 y 60 frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-279 y CPV-277.....	35
Figura 11. Invasión de los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) en el medio donde se encontraba <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282, experimento 1 volátiles.....	36
Figura 12. Invasión de los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282, experimento 2 volátiles	36
Figura 13. Evaluación de los metabolitos secundarios volátiles producidos por los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282, experimento 3 volátiles	37
Figura 14. Evaluación de los metabolitos secundarios volátiles producidos por los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282, experimento 4 volátiles	39

Figura 15. Evaluación de los metabolitos secundarios no volátiles producidos por el aislado HCH-48 de <i>Trichoderma</i>	40
Figura 16. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> en medio líquido papa dextrosa	41
Figura 17. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. en medio líquido papa dextrosa: A) Cepa HCH-62, B) Cepa HCH-88 y C) Cepa HCH-42.	42
Figura 18. Evaluación de los metabolitos secundarios no volátiles producidos por los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62, 88 y 42 frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282	43
Figura 19. Crecimiento de <i>P. capsici</i> en los diferentes tratamientos con <i>Trichoderma</i> evaluados	44
Figura 20. Confrontaciones duales de 12 aislados de <i>Trichoderma</i> frente a <i>P. capsici</i> CPV-282.....	60
Figura 21. Evaluación de los metabolitos secundarios volátiles producidos por los aislados de <i>Trichoderma harzianum</i> Comercial y HCH-62 frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282	62
Figura 22. Evaluación preliminar de la concentración de zoosporas de <i>P. capsici</i> CPV-282	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora capsici</i>	16
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i>	19
Cuadro 3. Porcentaje de inhibición promedio de <i>Phytophthora capsici</i> frente a diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. en las confrontaciones duales.....	32
Cuadro 4. Porcentaje de inhibición promedio de <i>P. capsici</i> de las confrontaciones duales de los aislados CPV-277, CPV-279 y CPV-282 con los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-48 y HCH-60.....	34
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición promedio obtenido en las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles producidos con diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282 experimento 3.....	37
Cuadro 6. Porcentaje de Inhibición promedio de <i>Phytophthora capsici</i> cuantificado en las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles producidos con diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. experimento 4.....	38
Cuadro 7. Porcentaje de inhibición promedio obtenido de las evaluaciones de metabolitos secundarios no volátiles producidos por el aislado de <i>Trichoderma</i> HCH-48.....	40
Cuadro 8. Análisis factorial del crecimiento radial e inhibición de <i>Phytophthora capsici</i> obtenido de las evaluaciones de metabolitos secundarios no volátiles producidos por los aislados de <i>Trichoderma</i> HCH-62, HCH-88 y HCH-42.....	42
Cuadro 9. Clases de antagonismo de acuerdo a la escala de <i>Bell et al.</i> (1982)	61
Cuadro 10. Escala utilizada para evaluar la sobreposición de colonias de <i>Trichoderma</i> sp.	61
Cuadro 11. Inhibición promedio de <i>P. capsici</i> (n=5) de las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles producidos con aislados de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> CPV-282	62

RESUMEN

Phytophthora capsici es un oomiceto fitopatógeno que ocasiona principalmente marchitez en Chile (*Capsicum annuum*) y en otras plantas de interés económico, como *Solanum lycopersicum*, *S. melongena* y *Cucurbita pepo*. El uso de agroquímicos resulta ser poco eficaz para el manejo de la enfermedad y genera resistencia en el patógeno, contaminación ambiental y afecta la salud humana, por lo que es necesaria la búsqueda de métodos amigables con el medio ambiente. El control biológico mediante el uso de organismos antagonistas representa una valiosa alternativa para la protección de los cultivos. Los hongos del género *Trichoderma* son antagonistas a diversos fitopatógenos ya que poseen características micoparasitarias y antibióticas, por lo tanto, algunas especies son reportadas como excelentes agentes de control biológico. Sin embargo, los estudios de *Trichoderma* sobre *P. capsici* siguen siendo limitados, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos del follaje de plantas de *Heliconia* sp. sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici in vitro*, en confrontaciones duales y mediante la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles producidos por *Trichoderma*.

Se realizaron confrontaciones duales con un diseño experimental de dos factores el cual consistió en evaluar 12 aislados de *Trichoderma* sp.: HCH-88, HCH-99, HCH-11, HCH-94, HCH-71, HCH-36, HCH-46, HCH-48, HCH-42, HCH-61, HCH-60, HCH-62 frente al aislado CPV-282 de *P. capsici*. Posteriormente se evaluaron en confrontaciones duales dos aislados de diferentes fenotipos de virulencia de *P. capsici* CPV-277 Y CPV-279 con los aislados de *Trichoderma* HCH-48 y 60; en donde se observó diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de inhibición. El mayor porcentaje de inhibición obtenido fue para el aislado CPV-282, por lo cual se seleccionó este último para las siguientes pruebas. El aislado HCH-62 mostró el mayor porcentaje de inhibición con 58.60 y el aislado HCH-42 el menor con 31.23 frente a *P. capsici*. En la evaluación de metabolitos secundarios volátiles producidos por los diferentes aislados de *Trichoderma* spp., se encontró un bajo efecto inhibitorio frente al crecimiento de *P. capsici in vitro*. En los diferentes experimentos de metabolitos secundarios no volátiles producidos por los aislados HCH-48, HCH-88, HCH-42 no se encontró inhibición significativa en ninguna concentración evaluada (5.3, 10, 21 y 25 %) para inhibir el crecimiento de *P. capsici in*

vitro. Sin embargo, con el aislado HCH-62 se observó una inhibición del 100% frente a *P. capsici* en la evaluación a la concentración de 21%. Por otro lado, se encontró un incremento en el crecimiento radial con los aislados HCH-88 y 42 de *P. capsici* con respecto al control. De acuerdo a los resultados obtenidos se observaron diferencias en el grado de antagonismo, al parecer debido a los diferentes mecanismos de acción de los aislados de *Trichoderma*. El aislado HCH-62 destacó en las diferentes evaluaciones anteriormente mencionadas, inhibiendo el crecimiento de *P. capsici*, por lo que, se sugiere continuar con evaluaciones en invernadero y campo para determinar si el efecto antagonístico observado *in vitro* resulta ser eficiente en el biocontrol de *P. capsici* con este aislado promisorio de *Trichoderma* cuando se asocié con el patógeno en la planta hospedera.

Palabras clave: Inhibición, control biológico, *Heliconia*, interacción, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Phytophthora capsici is a phytopathogenic oomycete that mainly causes wilting in pepper chile (*Capsicum annuum*) and other plants of economic interest, such as *Solanum lycopersicum*, *S. melongena* and *Cucurbita pepo*. The use of agrochemicals turns out to be ineffective for the management of the disease and generates resistance in the pathogen, environmental contamination and affects human health, so the search for environmentally friendly methods is necessary. Biological control through the use of antagonistic organisms represents a valuable alternative for the protection of crops. Fungi of the genus *Trichoderma* are antagonistic to various phytopathogens since they have mycoparasitic and antibiotic characteristics, therefore, some species are reported as excellent biological control agents. However, *Trichoderma* studies on *P. capsici* are still limited, so the objective of this work was to evaluate different isolates of *Trichoderma* spp. obtained from the foliage of *Heliconia* sp. on the growth of *Phytophthora capsici* in vitro, in dual confrontations and through the production of volatile and non-volatile secondary metabolites produced by *Trichoderma*.

Dual confrontations were carried out with a two-factor experimental design which consisted of evaluating 12 isolates of *Trichoderma* sp. : HCH-88, HCH-99, HCH-11, HCH-94, HCH-71, HCH-36, HCH-46 , HCH-48, HCH-42, HCH-61, HCH-60, HCH-62 versus isolate CPV-282 from *P. capsici*. Later, two isolates of different virulence phenotypes of *P. capsici* CPV-277 and CPV-279 with *Trichoderma* isolates HCH-48 and 60 were evaluated in dual confrontations; where a statistically significant difference was observed in the percentage of inhibition. The highest percentage of inhibition obtained was for the CPV-282 isolate, for which the latter was selected for the following tests. The HCH-62 isolate showed the highest percentage of inhibition with 58.60 and the HCH-42 isolate the

lowest with 31.23 against *P. capsici*. In the evaluation of volatile secondary metabolites produced by the different isolates of *Trichoderma* spp., A low inhibitory effect was found against the growth of *P. capsici in vitro*. In the different experiments of non-volatile secondary metabolites produced by the isolates HCH-48, HCH-88, HCH-42, no significant inhibition was found at any evaluated concentration (5.3, 10, 21 and 25%) to inhibit the growth of *P. capsici in vitro*. However, with the HCH-62 isolate, a 100% inhibition against *P. capsici* was observed in the evaluation at the 21% concentration. On the other hand, an increase in radial growth was found with the isolates HCH-88 and 42 of *P. capsici* compared to the control. According to the results obtained, differences in the degree of antagonism were observed, apparently due to the different mechanisms of action of the *Trichoderma* isolates. The HCH-62 isolate stood out in the different evaluations mentioned above, inhibiting the growth of *P. capsici*, therefore, it is suggested to continue with evaluations in greenhouse and field to determine if the antagonistic effect observed in vitro turns out to be efficient in the biocontrol of *P. capsici* with this promising *Trichoderma* isolate when associated with the pathogen in the host plant.

Keywords: Inhibition, biological control, *Heliconia*, interaction, secondary metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ocasionadas por fitopatógenos, tales como bacterias, nematodos, virus y hongos, constituyen la causa más importante de pérdidas en la producción agrícola, tanto en cosecha como en poscosecha (Carnero *et al.*, 2013, Souza *et al.*, 2020). Dentro de los distintos fitopatógenos, los hongos constituyen uno de los principales grupos tanto por la diversidad de especies existentes como por las pérdidas económicas que originan (Fisher *et al.*, 2012). Otro grupo importante de patógenos de plantas lo constituyen los oomicetos, que presentan gran variedad de especies causantes de pérdidas económicas en cultivos de relevancia agrícola. Michoacán destaca en la producción de algunos tipos de chiles como son el serrano, chilaca y jalapeño; sin embargo, presentan diversos problemas fitosanitarios. Uno de los principales problemas que enfrentan los productores de chile son las enfermedades. La marchitez causada por *P. capsici*, es considerada como la principal limitante del cultivo, ya que es responsable de ocasionar pérdidas hasta del 80% en rendimiento productivo (Pernezny *et al.*, 2003; Vásquez *et al.*, 2009). Este patógeno infecta la base del tallo provocando un estrangulamiento interrumpiendo el flujo de savia, lo que ocasiona clorosis, defoliación rápida, pudrición de frutos y muerte de la planta (Espinosa-Victoria *et al.*, 2004; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010). El método más utilizado para combatir este patógeno es el control químico, el cual es poco efectivo para controlar esta enfermedad en chile, y además se utilizan compuestos tóxicos que eliminan a los fitopatógenos y a organismos benéficos (Rey *et al.*, 2000). Las especies del género *Trichoderma* como *T. asperellum* (García-Núñez *et al.* 2017), *T. harzianum* (Kerroum *et al.*, 2015), *T. atroviride* (Al-Mughrabi, 2008), son los antagonistas más evaluados para hacer frente a enfermedades de plantas ocasionadas por oomicetos, debido a su ubicuidad, inocuidad, facilidad para ser aislados y cultivados, y por su crecimiento rápido en un gran número de sustratos (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Ezziyyani *et al.* (2004) reportaron un claro efecto antagónico de *T. harzianum* en contra *P. capsici* en cultivos duales *in vitro* en medio agar-papa-dextrosa (PDA) enriquecido con laminarina-glucosa. El nivel de inhibición varió según el medio de cultivo. Por otro lado, Yao *et al.* (2016) estudiaron la actividad antagonista de *Trichoderma* contra *P. capsici* en confrontaciones duales, de los cuales el aislado HNA12 registró la mayor

tasa de inhibición en comparación con el control (62.3%) y redujo significativamente la esporulación; mientras que el aislado HNN2 redujo el crecimiento del patógeno solamente 31.5% con respecto al control.

En México se han realizado algunos estudios. Gutiérrez (2013) estudió la actividad antagónica de *T. harzianum* en conjunto con diferentes materiales orgánicos (vermicomposta, composta comercial a base de lirio y rastrojo de maíz) y su efecto sobre la densidad poblacional de *P. capsici*, encontrando que el uso de materia orgánica como supresor de la densidad poblacional, representa una alternativa de manejo para *P. capsici*. De la Cruz-Quiroz *et al.* (2018) evaluaron el porcentaje de inhibición *in vitro* de especies de *Trichoderma* nativas de México en confrontaciones duales contra *P. capsici* utilizando PDA. Obtuvieron 22.1% de inhibición con *T. harzianum* y 10.3% con *T. yunnanensei*. Además, evaluaron cepas de *T. longibranchiatum* y *T. asperellum* reportando inhibición de menos del 5%.

A pesar de los reportes que existen sobre el estudio de los mecanismos antagónicos de *Trichoderma* sobre *P. capsici*, son relativamente pocas las especies que se han analizado, con resultados favorables, por lo cual, es necesario evaluar la capacidad antagónica de otros aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1. El cultivo de chile en México

De acuerdo con Aguirre-Mancilla *et al.* (2017), el cultivo de chile es una especie hortícola de gran importancia económica por el valor de su producción en México. Se cultiva en todos los estados, desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm. Por ser el centro de origen y domesticación, se han generado una gran diversidad de tipos, principalmente de la especie *C. annuum*, por lo que constituye un recurso valioso para el mejoramiento genético. Sus frutos se consumen tanto en fresco como seco para proporcionar diversidad en la gastronomía regional. En 2018 la producción total del chile en México fue de 3,379,289.15 ton, la superficie total sembrada fue de 156,798.97 ha con un valor de \$30,063,163.92 mdp (SIAP, 2018). El cultivo del chile es una actividad económica importante dentro del sector agropecuario. En 2010, México ocupó el primer lugar a nivel mundial en la producción de chile verde con 2.33 millones de toneladas en una superficie de 148,758 ha (SIAP, 2010). Además de la importancia económica, en México se le considera una hortaliza de interés cultural y biológico, debido a que este país es centro de origen y domesticación del género *Capsicum* (Reyes-Tena *et al.*, 2017).

2.2. *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici fue descrita por primera vez en Nuevo México, USA, por Leonian en 1922, como agente causal de tizón de tallo y frutos de chile (Leonian, 1922). Inicialmente se consideró como hospedante específico de ese cultivo, actualmente se conocen múltiples hospedantes, tales como *Solanum lycopersicum*, *S. melongena*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Citrullus lanatus*, *C. melo*, *Fragaria*, entre otros (Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2012). Se considera que este patógeno ocasiona una de las enfermedades más devastadoras debido a que infecta distintas partes de la planta (Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). El daño económico que causa *Phytophthora* ha impulsado los esfuerzos para comprender los procesos básicos involucrados en la patogenicidad (Kamoun *et al.*, 2015). Dentro de estos procesos; los efectores, moléculas secretadas por fitopatógenos que se unen a proteínas de defensa de las plantas, suprimen su respuesta modulando su función para facilitar la infección y colonización (Bozkurt *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019; Lo Presti *et al.*, 2015). Los efectores son los principales factores de virulencia de microorganismos patógenos y en gran

medida se desconoce su mecanismo de acción (Chen *et al.*, 2019). El manejo de *P. capsici* es complejo, debido a la existencia de fenotipos de virulencia, los cuales tienen la capacidad de infectar a cultivares de la misma especie que poseen diferentes genes de resistencia. Además, este patógeno produce un arsenal de proteínas efectoras que pueden contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta a nivel fisiológico. Los efectores RXLR, CRN y fitotoxinas NPP1, son los principales factores de virulencia de *P. capsici* (Reyes-Tena *et al.*, 2019).

2.2.1. Clasificación taxonómica de *Phytophthora capsici*

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Phytophthora capsici* (NCBI-Lifemap, 2019).

Dominio: Eukaryota	Orden: Peronosporales
Reino: Stramenipila	Familia: Phythiaceae
Filo: Oomycota	Género: <i>Phytophthora</i>
Clase: Oomicetes	Especie: <i>P. capsici</i> Leonian

2.2.2. Síntomas y ciclo de la enfermedad

Phytophthora capsici puede infectar todas las partes de la planta de Chile. El patógeno causa pudrición de la raíz y corona, también produce lesiones necróticas distintivas en el tallo, infecta las hojas y causa lesiones circulares, de color marrón grisáceo y de apariencia acuosa. Las lesiones de la hoja y las lesiones del tallo son comunes cuando el inóculo se dispersa por salpicadura desde el suelo hasta las partes más bajas de la planta. El patógeno también puede infectar el fruto y causar lesiones que generalmente están cubiertas de esporangios blancos, un signo del patógeno (Duniway, 1976, 1979).

Phytophthora capsici al ser un oomicete es un organismo diploide (Sansome, 1976) que se reproduce de manera sexual y asexual (Ristaino y Jonhston, 1999). En la reproducción sexual el patógeno produce dos tipos de apareamiento conocidos como A1 y A2 (Figura 1). Cada tipo de apareamiento produce hormonas que son responsables de la diferenciación de gametangios en el tipo de apareamiento opuesto. La presencia de los tipos de apareamiento A1 y A2 es común en el mismo campo de cultivo y aún en la misma planta (Reifschneider *et al.*, 1992). En México, se han detectado aislados con

distinto tipo de compatibilidad sexual en una misma parcela en los municipios de Copándaro, La Barca, Queréndaro, Tarímbaro y Yurécuaro, Michoacán (Reyes-Tena *et al.*, 2019). También se han detectado en una misma planta en pimiento morrón y en plantas de vivero (Sánchez-Gurrola *et al.*, 2019; Soto-Plancarte, 2017). *Phytophthora capsici* produce un gametangio masculino llamado anteridio, y un gametangio femenino llamado oogonio. El anteridio es anfígino, es decir, rodea la cavidad del oogonio. La meiosis ocurre dentro del gametangio, y la plasmogamia y la cariogamia resultan en la formación de oosporas, que son las esporas sexuales que fungen como estructura de resistencia del patógeno durante el invierno (Ristaino y Jonson, 1999). Las oosporas pueden germinar directamente a través de la formación de un tubo germinal o indirectamente a través de la formación de esporangios.

El patógeno también se reproduce asexualmente a través de esporangios (Figura 1) (Leonian, 1922; Stamps *et al.*, 1990). Los esporangios son generalmente ovoides y tienen una papila prominente en su ápice. Los esporangios se desprenden fácilmente del esporangióforo y pueden dispersarse dentro de los campos por el viento, la lluvia y el agua de riego (Bowers *et al.*, 1990; Cafe-Filho y Duniway, 1995; Ristaino *et al.*, 1992;). Los esporangios germinan indirectamente y liberan zoosporas móviles biflageladas en condiciones de humedad, en las superficies de las plantas o en suelos saturados (Bernhardt y Grogan, 1982). Las zoosporas pueden moverse fácilmente bajo condiciones de saturación del suelo e infectar raíces de plantas sobre el suelo (Duniway, 1976,1979).

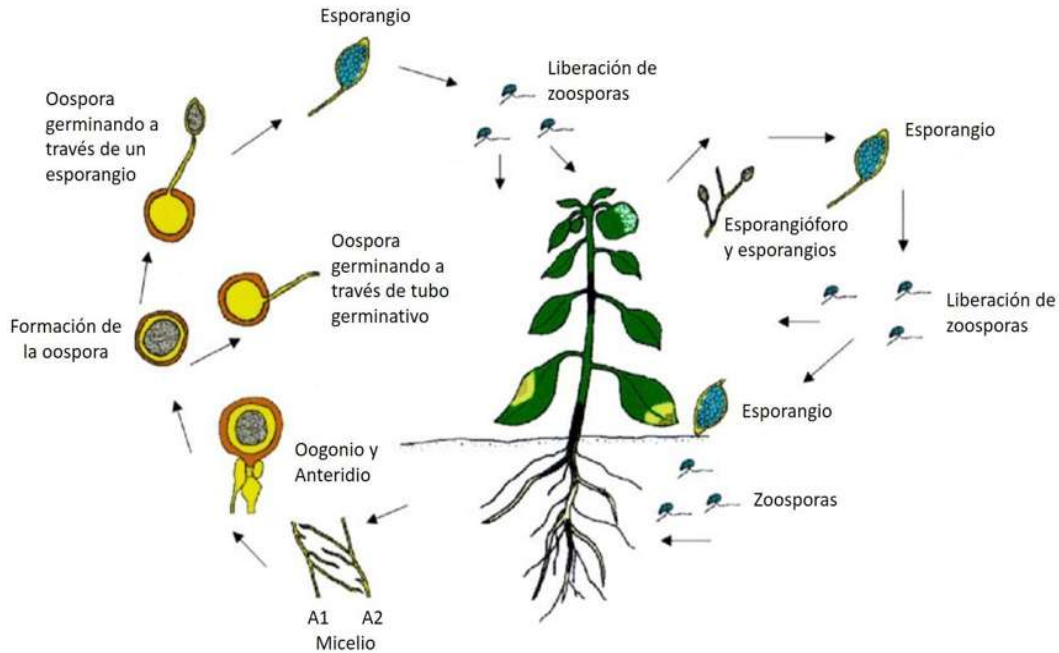


Figura 1. Ciclo de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici*. Fuente Ristaino y Johnston, 1999.

Debido a la resistencia que *P. capsici* ha mostrado a diversos fungicidas como metalaxyl, azoxystrobin y propamocarb (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Fernández-Pavía *et al.*, 2004; Silva-Rojas *et al.*, 2009), en la actualidad ha surgido un mayor interés en la generación de conocimiento para el diseño e implementación de sistemas de producción agrícola sustentables como la agricultura orgánica, que además de la nutrición vegetal a través de microorganismos que incrementan la disponibilidad de nutrientes minerales, incluye el manejo agroecológico de enfermedades mediante el control biológico de plagas y agentes patógenos por medio de la aplicación de enemigos naturales o sus productos (Rodríguez del Bosque y Arredondo, 2007). Entre los microorganismos más utilizados como agentes de control biológico se encuentran los hongos del género *Trichoderma* (Fernández-Herrera *et al.*, 2007). La capacidad de *Trichoderma* para reducir los daños causados por hongos fitopatógenos (Barroso-Albarracín *et al.*, 2015; Durman *et al.*, 1999; Gonzales-Rodríguez *et al.*, 2005; Infante *et al.*, 2011), está relacionada con su capacidad de competencia, micoparasitismo y antibiosis por la producción de enzimas y metabolitos secundarios (Michel-Aceves *et al.*, 2001).

2.3. *Trichoderma*

2.3.1. Aspectos generales

El género *Trichoderma* se presenta naturalmente en diferentes hábitats y es cosmopolita. Se caracteriza por ser saprófito, sobrevive en suelos con materia orgánica debido a su capacidad de descomponerla. En determinadas condiciones, puede ser anaerobio facultativo (Howell, 2003). La capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos permite su empleo en la industria biotecnológica (Harman, 2006). Su amplia distribución y su plasticidad ecológica se encuentran estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que posee para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos por medio de la producción de enzimas y metabolitos secundarios, tales como péptidos no ribosómicos, terpenoides, pironas, compuestos derivados de los indólicos entre otros (Howell, 2003).

2.3.2. Clasificación taxonómica

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* (NCBI-Lifemap, 2019).

Reino: Fungi	Subclase: Hypocreomycetidae
Subreino: Dikarya	Orden: Hypocreales
Filo: Ascomycota	Familia: Hypocreaceae
Subfilo: Saccharomyceta	Género: <i>Trichoderma</i>
Clase: Sordariomycetes	

Los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizosfera donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos; por lo tanto, algunas especies son excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades de plantas hortícolas (Benítez *et al.*, 2004). Las especies de *Trichoderma* más comercializadas para el control biológico son *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*. Esta última especie es frecuentemente utilizada y reportada en la literatura (Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Harman, 2000; Rojo *et al.*, 2007).

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como celulasas, polisacaridas, quitinasas y xilanasas, las cuales son empleadas en procesos industriales. La explotación comercial de estas enzimas es diversa, ya que facilitan la producción de detergente para ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Verma *et al.*, 2007). *Trichoderma reesei* produce celulasas que se utilizan en el blanqueo de pulpa de papel, y son una alternativa amigable con el ambiente en comparación con el blanqueo convencional con cloro (Buchert *et al.*, 1994). Las especies del género *Trichoderma* producen diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina, hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Cohen-Kupiec *et al.*, 1999). Debido a lo anterior, *T. harzianum* y otras especies del género favorecen el crecimiento de plantas (Benítez *et al.*, 2004). *Trichoderma* ha sido utilizada en la industria de los aromatizantes debido a la capacidad de producir el metabolito 6-pentil- α pirona que proporciona el aroma de coco al utilizar aceites vegetales comerciales (avellana, linaza, ricino y uva) como sustrato (Bonnarme *et al.*, 1997).

2.3.3. Efecto de factores bióticos y abióticos en el desarrollo y eficacia de *Trichoderma*

El conocimiento de la influencia de todos estos factores bioecológicos en la fisiología y las potencialidades de *Trichoderma* como agente de control biológico (ACB) son vitales en los procesos de selección de cepas promisorias, su reproducción masiva y su introducción en diferentes agroecosistemas para lograr una máxima eficacia del hongo en el manejo de enfermedades. Dentro de estos factores se encuentran: temperatura, pH, humedad relativa, iluminación y los diferentes sustratos que pueden utilizar las diferentes especies y los aislados pertenecientes al género *Trichoderma* (Harman, 2000). Además de su acción biorreguladora, *Trichoderma* actúa de forma indirecta sobre los patógenos a través de la inducción de mecanismos de defensa a nivel fisiológico y bioquímico en la planta, entre los cuales se encuentran: estimulación del crecimiento vegetal y desarrollo del sistema radicular, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos (N y P), inducción de resistencia y tolerancia a estrés biótico y abiótico (Harman, 2006; Vinale *et al.*, 2008).

2.3.4. Mecanismos de biocontrol

Los ACB (agentes de control biológico) son organismos vivos cuyas actividades dependen principalmente de las diferentes condiciones ambientales físico-químicas a las que están sujetos; por esta razón, el control biológico ejercido por las cepas de *Trichoderma* es en ocasiones impredecible (Benítez *et al.*, 2004). La comprensión de la diversidad genética de las cepas dentro de las especies de *Trichoderma* y de sus mecanismos de control biológico conducirá a una mejor aplicación de las diferentes cepas como ACB. Estos mecanismos son complejos, y lo que se ha definido como control biológico es el resultado final de diferentes mecanismos que actúan sinérgicamente para lograr el control del agente causal de la enfermedad (Howell, 2003). El control biológico resulta de la competencia por los nutrientes y el espacio o como resultado de la capacidad de los ACB de *Trichoderma* para producir metabolitos que impiden la germinación de esporas del patógeno (fungistasis), muerte de las células (antibiosis) o modificación de las condiciones en la rizósfera por medio de la acidificación del suelo, lo que impide el crecimiento de patógenos. Otro mecanismo es el micoparasitismo, que implica el contacto físico y la síntesis de enzimas hidrolíticas, compuestos tóxicos y / o antibióticos que actúan de forma sinérgica con las enzimas (Harman *et al.*, 2004).

2.3.4.1 Antibiosis

Mediante antibiosis se inhibe el desarrollo del patógeno o se causa la muerte del organismo patógeno por un compuesto metabolizado por el organismo antagónico. Cuando se lleva a cabo una interacción antagonista-patógeno se producen enzimas líticas extracelulares y antibióticos por parte del antagonista que inhiben el crecimiento del patógeno. De acuerdo con Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), *Trichoderma* produce distintos metabolitos secundarios, y los divide en tres grupos; peptaiboles (oligopeptidos lineales), antibióticos polares (ácido heptelídico) y antibióticos volátiles (6-pentil- α -pirona). Los peptaiboles y los compuestos polares actúan a corta distancia, es decir, cerca del hospedero. Algunas especies de *Trichoderma* producen compuestos antifúngicos que actúan contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* ocasionando la desintegración de las hifas (Martínez *et al.*, 2013).

2.3.4.2 Competencia por nutrientes

La competencia es la habilidad de un microorganismo para utilizar un sustrato de forma más eficiente que otro. Pueden competir por nutrientes o espacio, oxígeno o luz. *Trichoderma* compete por nutrientes, tales como carbono, nitrógeno y hierro. Colonizan rápidamente el suelo y evitan la proliferación de otros organismos (Inbar y Chet, 1997; Sivan y Chet, 1989). Anke *et al.* (1991) registraron la producción de hidroxamato, un sideróforo producido por *Trichoderma* spp. bajo condiciones deficientes de hierro, que le permite tomar el hierro de forma reducida y evita la supervivencia de otros organismos al disponer de las pocas cantidades de este mineral. Una de las características importantes de *Trichoderma* es su rápido crecimiento, lo que le permite competir por espacio y nutrientes en condiciones *in vitro* (Reyes *et al.*, 2008).

2.3.4.3 Micoparasitismo

La interacción micoparasitaria de *Trichoderma* sp. con otros hongos filamentosos está programada aparentemente por las señales del hospedante, lo que resulta en la producción de estructuras infecciosas y la secreción de enzimas (Harman *et al.*, 2004). La mayoría de los genes relacionados con el micoparasitismo descritos hasta ahora codifican un conjunto complejo de enzimas degradadoras de la membrana y la pared celular del patógeno, y se considera que actúan de forma sinérgica con metabolitos secundarios siendo determinantes en la capacidad antagónica de *Trichoderma* (Schirmbock *et al.*, 1994). El micoparasitismo es una interacción directa entre el antagonista y el hongo patógeno, en donde el antagonista utiliza al patógeno como alimento, siendo éste el principal mecanismo de acción utilizado por *Trichoderma* (Fernández-Larrea, 2001). De acuerdo con Harman (2000), es un proceso complejo que involucra el crecimiento del antagonista hacia el patógeno y un proceso de enrollamiento y degradación de hifas. Las enzimas juegan un papel importante en el micoparasitismo, dentro de ellas la β -1,3 glucanasa es esencial dentro de este mecanismo debido a que participa en la degradación de la pared celular de los patógenos (Sanz *et al.*, 2005). El micoparasitismo finaliza una vez que las células del patógeno pierden el contenido citoplasmático (Sánchez *et al.*, 2019; Savitha y Sriram, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de la marchitez de chile para los productores a nivel mundial se han intentado varias alternativas de control como el uso de variedades resistentes, control químico, utilización de biopesticidas y ACB, ninguna hasta el momento con resultados completamente satisfactorios al utilizarse por sí solas (Bautista-Calles *et al.*, 2010; Ezziyyani *et al.*, 2007). El manejo integrado de esta enfermedad se considera la mejor opción para disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por *P. capsici*. Uno de los principales desafíos de la agricultura moderna consiste no solo en encontrar un buen ACB sino asegurar que este sea fácil de propagar, de estabilizarse y que su producción sea rentable económicamente para emplearse como recurso biotecnológico.

Diversas investigaciones se han dedicado al estudio de los diferentes mecanismos antagónicos que posee *Trichoderma* frente a *P. capsici* (Bae *et al.*, 2016; Ezziyani *et al.*, 2004; Guigón-López y González-González, 2003; Gutiérrez-Núñez, 2003; Nawaz *et al.*, 2018; Quinto-Álvarez, 2014), sin embargo, son relativamente pocas las especies de *Trichoderma* que se han evaluado; la mayoría de las especies evaluadas son obtenidas del suelo y de la rizósfera. La búsqueda de nuevas especies de *Trichoderma* aisladas del follaje de plantas de climas cálidos y húmedos, podría ser una alternativa para descubrir nuevas especies que puedan implementarse para manejar enfermedades producidas por fitopatógenos. Por lo que, es necesario buscar y estandarizar una técnica de estudio para evaluar correctamente la eficacia de los mecanismos de acción, implementados por las especies de *Trichoderma* para hacer frente a *P. capsici*.

4. HIPÓTESIS

Cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de hojas de *Heliconia* sp. inhibirán significativamente el crecimiento de aislados virulentos de *Phytophthora capsici*, en condiciones *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antagónica de aislados de *Trichoderma* sp. obtenidos de hojas de *Heliconia* sp. sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici* *in vitro*

5.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de aislados de *Phytophthora capsici* en confrontaciones duales.
- 2) Evaluar el efecto de metabolitos secundarios volátiles producidos por *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici*.
- 3) Evaluar el efecto de metabolitos secundarios no volátiles producidos por *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici*.
- 4) Comparar el efecto inhibitorio de los diferentes metabolitos (volátiles y no volátiles) de la cepa de *Trichoderma* que generó la mayor inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de cepas

Se utilizaron los aislados de *Trichoderma* sp. HCH-88, HCH-99, HCH-11, HCH-94, HCH-71, HCH-36, HCH-46, HCH-48, HCH-42, HCH-61, HCH-60, HCH-62, obtenidos de hojas de plantas de *Heliconia* sp. colectadas en ecosistemas naturales en Chiapas, México. Se utilizaron las cepas de *P. capsici* CPV-277 y CPV-279, aislados de plantas de chile en cultivos comerciales de Queréndaro, Michoacán y CPV-282, obtenida de Copándaro, Michoacán, durante el 2017 (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Todos los experimentos se realizaron utilizando cepas reactivadas de la Colección de Hongos y Oomicetos del Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF-UMSNH.

6.2. Confrontaciones duales

Experimento no. 1. Se realizaron los experimentos de confrontación dual con 12 aislados de *Trichoderma* sp. HCH-88, HCH-99, HCH-11, HCH-94, HCH-71, HCH-36, HCH-46, HCH-48, HCH-42, HCH-61, HCH-60, HCH-62 y un aislado de *P. capsici* (CPV-282). Se utilizó la técnica establecida por Barakat (2014). Se reactivaron los aislados de *Trichoderma* y *P. capsici* en cajas Petri de vidrio 100x15 mm con PDA a 26 °C en oscuridad durante 5-7 días para obtener inóculo. Posteriormente se inoculó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de la cepa de *Phytophthora* en un extremo de la caja Petri con PDA, a 3 cm de distancia se colocó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de la cepa de *Trichoderma* (Figura 2). Se incubaron a 26 °C en oscuridad durante 5-7 días, posteriormente se registró el crecimiento radial del patógeno en dos direcciones (líneas perpendiculares) después de 6 días posteriores a la inoculación. Como control se utilizó un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici* en el centro de una caja Petri con medio PDA. El experimento se realizó con 5 repeticiones.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$I (\%) = (C - T) / C (100)$$

I = % de inhibición.

C = diámetro del crecimiento radial de *Phytophthora* en la caja control.

T = diámetro del crecimiento radial de *Phytophthora* en presencia de *Trichoderma*.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

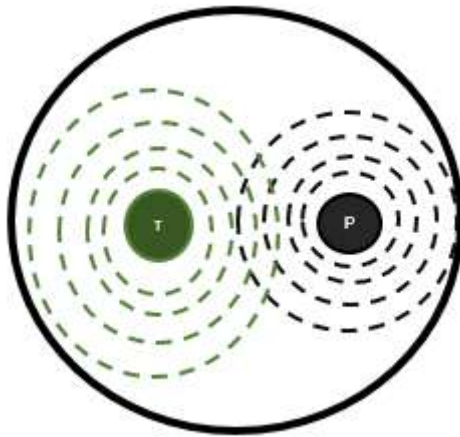


Figura 2. Confrontaciones duales. T = *Trichoderma*, P = *Phytophthora capsici*.

Experimento no. 2. De acuerdo a los resultados obtenidos del primer experimento, se realizó un segundo experimento de confrontación dual utilizando los dos aislados de *Trichoderma* (HCH-48 y HCH-60), que produjeron el mayor porcentaje de inhibición en el aislado CPV-282. Se confrontaron contra otros dos aislados virulentos de *P. capsici* (CPV-277 y CPV-279), en las mismas condiciones, para evaluar su actividad antagonista. Se registró el crecimiento radial y se calculó el porcentaje de inhibición conforme a la metodología descrita en el experimento no.1. Posteriormente se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

El aislado HCH-62, fue el último aislado evaluado en las confrontaciones duales frente al aislado de *P. capsici* CPV-282, por lo que su antagonismo se evaluó posteriormente a las evaluaciones de los aislados CPV-277 y 279.

Una vez evaluados los doce aislados de *Trichoderma* frente a *P. capsici* CPV-282 y en base a un análisis filogenético previo (Anexo 5), se decidió trabajar con los aislados de *Trichoderma* HCH-42, HCH-88 y HCH-62. Lo anterior para evaluar posibles especies diferentes de *Trichoderma*.

6.3. Efecto de metabolitos secundarios volátiles de *Trichoderma* sobre *P. capsici*

Se utilizó la técnica establecida por Barakat *et al.* (2014). Se realizaron cuatro diferentes experimentos con esta metodología con modificaciones para estandarizar el método adecuado.

Experimento no. 3. Se reactivaron los aislados de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88, HCH-42 con los que se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición en confrontaciones duales y la cepa de *P. capsici* CPV-282, en cajas Petri de vidrio 100x15 mm con PDA a 26 ± 2 °C en oscuridad durante 5-7 días para obtener inóculo. Posteriormente se inoculó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de la cepa de *Trichoderma* en una caja Petri de plástico 100x15 mm con medio PDA a 26 ± 2 °C en oscuridad durante 4 días. Al tercer día de crecimiento del aislado de *Trichoderma*, se inoculó un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici* en otra caja Petri de plástico 100x15 mm con medio PDA a 26 ± 2 °C en oscuridad durante 24 h. Posteriormente, a los 4 días de crecimiento de *Trichoderma* y 1 día de crecimiento de *P. capsici*, se retiraron las tapas de ambas cajas de forma aséptica en campana de flujo laminar y las bases de las cajas se unieron de tal manera que en el fondo de la placa estuviera el antagonista (*Trichoderma*) y arriba en la placa el patógeno (*P. capsici*) (Figura 3). Las cajas se cerraron con 3 tiras de cinta parafilm para evitar la pérdida de sustancias volátiles. El control fue una caja Petri con medio PDA inoculada con un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici*. Se incubaron a 26 ± 2 °C durante 5 días. El experimento se realizó con 5 repeticiones. Se calculó el efecto de las sustancias volátiles midiendo el crecimiento radial del patógeno en dos direcciones (líneas perpendiculares), a los 5 días posteriores a la unión de las cajas. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de inhibición:

$$I (\%) = (C-T) / C (100).$$

I = % de inhibición.

C = diámetro del crecimiento radial de *Phytophthora* en la caja control.

T = diámetro del crecimiento radial de *Phytophthora* en presencia de *Trichoderma*.



Figura 3. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles. T = *Trichoderma*, P = *Phytophthora capsici*, experimento 1.

Experimento no. 4. Se inoculó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici* CPV-282 en una caja Petri de plástico 100x15 mm con medio PDA y se incubó a 26 ± 2 °C en oscuridad durante 1 día. Lo anterior para darle ventaja de crecimiento a *P. capsici*, debido al rápido crecimiento de *Trichoderma*. Se realizaron 3 repeticiones. Al día siguiente, con un día de crecimiento de *P. capsici*, se inoculó un disco de 6 mm de diámetro de las cepas de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88, HCH-42 en diferentes cajas Petri de plástico de 100x15 mm con medio PDA y se incubaron a 26 ± 2 °C en oscuridad por 24 h. Posteriormente, con colonias de *Trichoderma* de 24 h de crecimiento, y colonias de *P. capsici* con 48 h de crecimiento, se retiraron las tapas de las cajas con los cultivos de forma aséptica en campana de flujo laminar, y las bases de las cajas con los cultivos se unieron y cerraron de la misma manera que en el experimento 3 (Figura 4). El control fue una caja Petri con medio PDA inoculada con un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici*. El experimento se llevó a cabo con 5 repeticiones. El efecto de los metabolitos secundarios volátiles se evaluó conforme lo establecido en el experimento no. 3.



Figura 4. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles. T = *Trichoderma*, P = *Phytophthora capsici*, experimento 2.

Experimento no. 5. Se inoculó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici* CPV-282 en una caja Petri de plástico 100x15 mm con medio PDA. El mismo día, se inoculó un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88, HCH-42, en otra caja Petri de plástico 100x15 mm con medio PDA por separado. Las bases de las cajas con medio y los discos inoculados, se unieron y se cerraron el mismo día de la inoculación, de la misma manera que en el experimento 3 (Figura 5). El control fue una caja Petri con medio PDA inoculada con un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici*. El experimento se llevó a cabo con 5 repeticiones. El efecto de las sustancias volátiles se evaluó conforme lo establecido en el experimento no. 3.



Figura 5. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles en cajas Patri con medio PDA, experimento 5. T = *Trichoderma*, P = *Phytophthora capsici*.

Experimento no. 6. Se utilizó la metodología establecida por Castillo *et al.* (2019) la cual consistió en utilizar cajas Petri de plástico que presentan una división interna en el centro de la base de la caja, las cuales contenían medio PDA. En una de las áreas dividida de la base de la caja, se colocó un disco de micelio de 7 días de crecimiento de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88, HCH-42 por separado y en la otra área dividida se colocó un disco de micelio de 7 días de crecimiento de *P. capsici* CPV-282 (Figura 6). Las cajas se sellaron con 3 capas de cinta parafilm y se incubaron a 26 ± 2 °C durante 3 días. El control fue una caja Petri con medio PDA inoculada con un disco de 6 mm de diámetro de la cepa de *P. capsici*. El experimento se realizó con 5 repeticiones. El efecto de las sustancias volátiles se evaluó conforme lo establecido en el experimento no. 3.

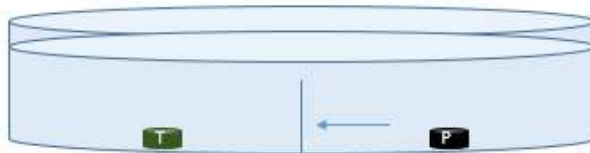


Figura 6. Evaluación de metabolitos secundarios volátiles utilizando cajas con división, en medio PDA. T = *Trichoderma*, P = *Phytophthora capsici*, experimento 6.

6.4. Efecto de metabolitos secundarios no volátiles de *Trichoderma* sobre *P. capsici*

Se realizaron dos experimentos para determinar el efecto de metabolitos secundarios no volátiles de *Trichoderma* sobre el crecimiento de la cepa CPV-282 de *P. capsici*. El aislado de *Trichoderma* utilizado fue el de mayor inhibición en base a los primeros resultados de confrontaciones duales (HCH-48) y el experimento se realizó antes de evaluar el aislado HCH-62.

Experimento no. 7. Se inoculó un disco de micelio de *Trichoderma* HCH-48 de 7 días de crecimiento en un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de medio líquido dextrosa papa, se incubó a 30 °C con agitación constante a 150 rpm. Se inoculó otro matraz Erlenmeyer con *Trichoderma* HCH-48, el cual se incubó estático a 26±2 °C. Los dos cultivos se incubaron en obscuridad durante 7 días. El día anterior a la filtración de los cultivos, se prepararon los medios # 1: 100 mL con PDA, # 2: 75 mL con PDA y # 3: 90 mL con PDA, y se colocaron en baño María durante toda la noche a 49 °C. Al séptimo día de incubación, los cultivos líquidos de *Trichoderma* se transfirieron a tubos de centrifuga estériles de 30 mL. Los tubos con los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min en una centrifuga Beckman a 20 °C. El sobrenadante de cada tubo y de cada aislado se transfirió a matraces estériles Erlenmeyer de 250 mL, por separado en la campana de flujo laminar. Cada matraz contenía papel filtro Whatman 1 (11 µ) estéril. Se filtró nuevamente utilizando un filtro Millex-HV de 0.45 µm, enroscado en una jeringa estéril de 20 mL y de esta a un frasco de tapa rosca de 100 mL estéril. Al medio # 3 se añadieron 10 mL del filtrado (concentración final 10%), al medio # 2 se añadieron 25 mL del filtrado (concentración final 25%) y al medio # 1 no se le añadió filtrado y se utilizó como control. Los medios se vaciaron en cajas Petri 100x15 mm y se dejaron deshidratar a 26±2 °C por 24 h. Se inoculó un disco de 5 mm de diámetro de medio y micelio de *P. capsici* CPV-282 en el centro de las cajas Petri con medio PDA sin filtrado para usarse como control. De la misma manera se inocularon discos en las cajas con medio PDA más el filtrado (Figura 7) y se incubaron en oscuridad a 26±2 °C durante 5-7 días. El experimento se realizó con 5 repeticiones. Se registró el crecimiento radial del patógeno en dos direcciones (líneas perpendiculares) a los 6 días posteriores a la siembra y se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$I (\%) = (C-T) / C (100).$$

I= % de inhibición.

C= diámetro del crecimiento radial de *Phytophthora* en la caja control.

T= diámetro del crecimiento radial de *Phytophthora* en presencia de *Trichoderma*.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde el factor 1 fue la inhibición por la concentración utilizada (10 y 25%) y el factor 2 fue, la inhibición

por la condición de crecimiento de *Trichoderma* (con y sin agitación). Se realizaron análisis de comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

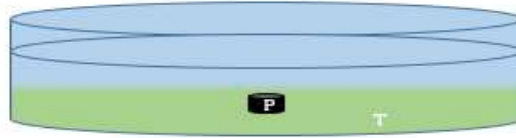


Figura 7. Evaluación de metabolitos secundarios no volátiles en medio PDA. T= medio sólido con metabolitos secundarios de *Trichoderma* y P = *Phytophthora capsici*.

Experimento no. 8. El experimento se realizó con los aislados de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88 y HCH-42, estos aislados se seleccionaron en base al análisis filogenético anteriormente mencionado (experimento 2). Se inoculó un disco de micelio de *Trichoderma* de 7 días de crecimiento en un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de medio líquido dextrosa papa y se incubó a 26 ± 2 °C en agitación constante a 150 rpm durante 8 días. Debido a que a los 8 días de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* en el medio líquido absorbieron la mayor parte del medio, se ajustaron las concentraciones con la cantidad obtenida; se agregaron 5 mL del extracto de *Trichoderma* de cada aislado por separado en frascos con 95 mL con medio PDA, y 20 mL del extracto al medio con 75 mL de PDA, para cada aislado por separado. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento de la primera prueba (Figura 7) ajustándose las concentraciones del extracto de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88 y HCH-42 al 5.3 y 21% utilizando la siguiente fórmula:

$$\%m/v = \text{volumen de soluto mL} / \text{volumen de disolución mL} \times 100;$$

Se registró el crecimiento radial del patógeno y se evaluó conforme lo establecido en el experimento no. 7. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde el factor 1 fue, la concentración (5.3 y 21%) y el factor 2 fue, la inhibición por los diferentes tratamientos (HCH-62,88 y 42), y se realizaron pruebas de comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Confrontaciones duales

Experimento no. 1.

En la evaluación de las confrontaciones duales con los doce aislados de *Trichoderma* (HCH-88, HCH-99, HCH-11, HCH-94, HCH-71, HCH-36, HCH-46, HCH-48, HCH-42, HCH-61, HCH-60, HCH-62; Figura 20, Anexo 1), se observó el más alto porcentaje de inhibición con el aislado HCH-62; y el menor con el aislado HCH-42 frente a *P. capsici* CPV- 282 (Cuadro 3, Figura 8).

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición promedio (n=5) de *Phytophthora capsici* frente a diferentes aislados de *Trichoderma* spp. en las confrontaciones duales después de 6 días de crecimiento. Superíndices con diferente letra indican diferencia significativa (P<0.05).

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Crecimiento radial de <i>P. capsici</i> en presencia de <i>Trichoderma</i> (cm)	Control de <i>P. capsici</i> (cm)	inhibición (%)
HCH-88	2.04	3.94	47.90 ^{de}
HCH-99	2.17	3.94	45.40 ^{cde}
HCH-11	2.30	3.94	41.60 ^{bc}
HCH-94	2.11	3.94	46.90 ^{cde}
HCH-71	2.25	3.94	43.10 ^{bcd}
HCH-36	1.98	3.97	50.12 ^{ef}
HCH-46	2.54	3.97	36.00 ^{ab}
HCH-48	1.92	3.97	51.63 ^{ef}
HCH-42	2.73	3.97	31.23 ^a
HCH-61	2.18	3.97	45.08 ^{cde}
HCH-60	2.24	4.71	50.31 ^{cde}
HCH-62	1.55	3.75	58.60 ^f

Los resultados mostraron que los 12 aislados de *Trichoderma* spp. evaluados, inhibieron el crecimiento de *P. capsici* CPV-282 en diferentes porcentajes con respecto al control (Cuadro 3, Figura 9). El crecimiento radial de *Trichoderma* es mucho más rápido que el del patógeno, cubren el espacio vital y utilizan con mayor facilidad los nutrientes disponibles en el medio, limitando de esta manera el crecimiento de *P. capsici* (Figura 8).

De acuerdo a la escala utilizada para evaluar sobreposición en base al porcentaje de inhibición propuesta por Jackkish-Matsuura y Menezes (1999), los aislados de *Trichoderma* HCH-48 Y 62, sobreposicionan medianamente a *P. capsici*, inhibiendo significativamente, mientras que el resto de los aislados sobreposicionan poco a *P. capsici*, no representando inhibición significativa (Anexo 1, Cuadro 10).

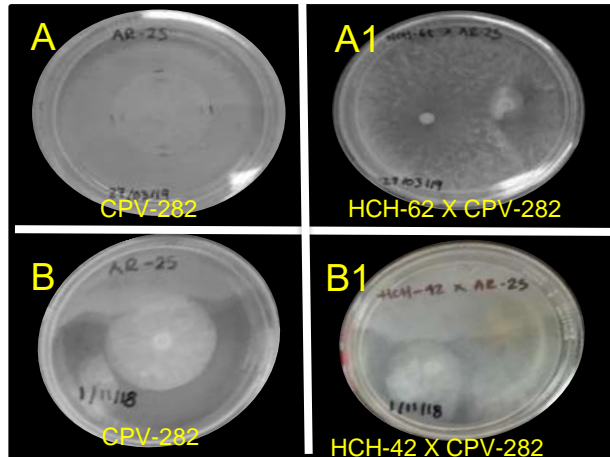


Figura 8. Confrontaciones duales con el aislado de *Trichoderma* HCH-62 y 42 frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 6 días de crecimiento. A y B) Control de *Phytophthora capsici* CPV-282. A1) Confrontación de *Trichoderma* HCH-62 y *Phytophthora capsici* CPV-282. B1) Confrontación de *Trichoderma* HCH-42 y *Phytophthora capsici* CPV-282.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0000$), entre los diferentes aislados de *Trichoderma* con respecto al efecto inhibitorio sobre *P. capsici*. Se encontró que los aislados HCH-42 y 62 fueron estadísticamente diferentes (Cuadro 3). De acuerdo con los datos obtenidos y en base a un análisis filogenético preliminar, la diferencia en el efecto inhibitorio podría deberse a que los aislados evaluados de *Trichoderma* sean de diferentes especies, ya que el aislado HCH-42 se encuentra cercano a *T. cf harzianum* y el aislado HCH-62 a *T. atroviride* (Anexo 5).

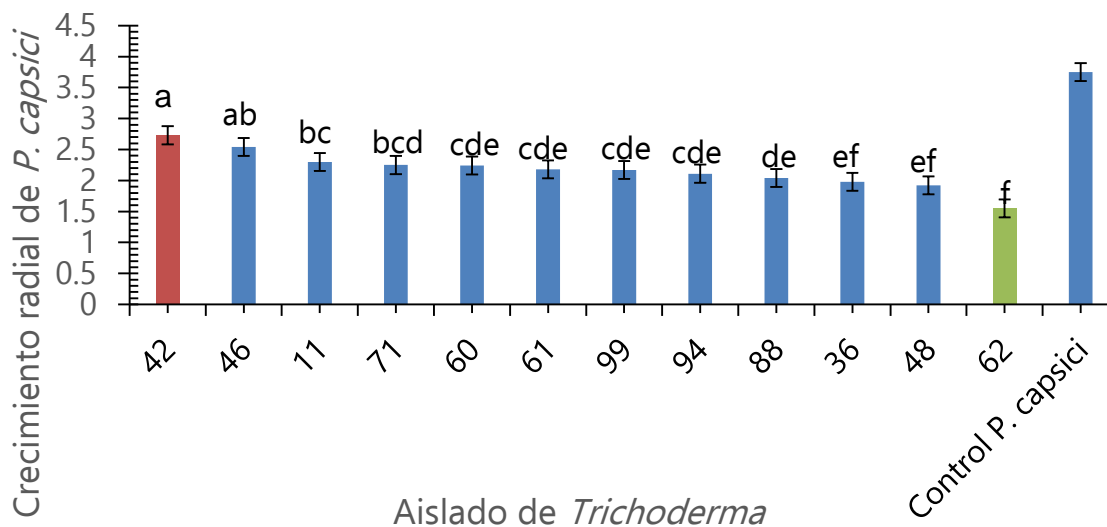


Figura 9. Crecimiento radial en cm de *Phytophthora capsici* en las confrontaciones duales en medio de cultivo PDA, con los 12 aislados de *Trichoderma* spp. después de 6 días de crecimiento. Columnas con superíndices con diferente letra indican diferencia significativa (Tukey, $P < 0.05$).

Experimento no. 2.

Se realizó la evaluación de confrontación dual con los aislados de *Trichoderma* HCH-48 y 60 frente a los otros dos aislados virulentos de *P. capsici* CPV-277 y CPV-279 (Figura 10). Los aislados evaluados se eligieron de acuerdo a los resultados preliminares obtenidos en el primer experimento de confrontaciones duales.

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición promedio ($n=5$) de *P. capsici* de las confrontaciones duales de los aislados CPV-277, CPV-279 y CPV-282 con los aislados de *Trichoderma* HCH-48 y HCH-60 después de 6 días de crecimiento. Superíndices con diferente letra indican diferencia significativa.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	CPV-277 ^{ab} (%) inhibición	CPV-279 ^a (%) inhibición	CPV-282 ^b (%) inhibición
HCH-48	45.59	42.02	51.63
HCH-60	52.00	48.63	50.31

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P= 0.0017$), en los diferentes aislados evaluados de *P. capsici*, con respecto al porcentaje de inhibición obtenido por los diferentes aislados de *Trichoderma* HCH-48 y 60 (Cuadro 4). Al realizar la prueba de comparación de medias, los aislados CPV-279 y 282 resultaron estadísticamente diferentes entre ellos, mientras que para el aislado CPV-277, no se encontró diferencia significativa con los otros dos aislados. En promedio los aislados de *Trichoderma* inhibieron a *P. capsici* CPV 279 (45.32%), CPV-277 (48.79%) y CPV-282 (50.97%), siendo este último el que presentó menor crecimiento radial en presencia de *Trichoderma*, por lo que el efecto inhibitorio por los aislados de *Trichoderma* se presentó en mayor porcentaje, y se decidió utilizar para las siguientes evaluaciones.

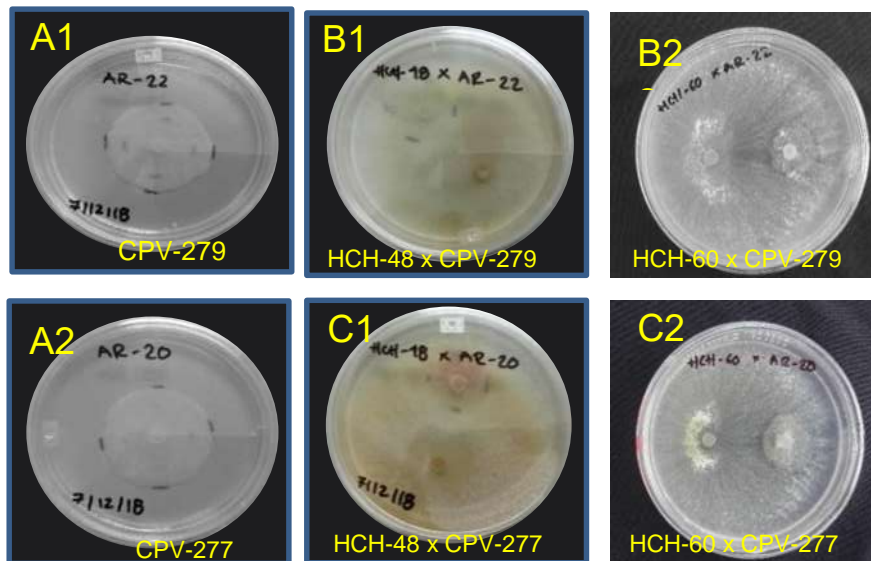


Figura 10. Evaluación de las confrontaciones duales con el aislado de *Trichoderma* HCH-48 y 60 frente a *Phytophthora capsici* CPV-279 y CPV-277 después de 6 días de crecimiento. A1) Control de *Phytophthora capsici* CPV-279, A2) Control de *Phytophthora capsici* CPV-277, B1) Confrontación de la cepa HCH-48 x CPV-279, B2) Confrontación de la cepa HCH-60 x CPV-279. C1) Confrontación de la cepa HCH-48 x CPV-277 C2) Confrontación de la cepa HCH-60 x CPV-277.

7.2. Eficacia de metabolitos volátiles de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*

El efecto de los metabolitos secundarios producidos por los aislados de *Trichoderma*, en los 4 experimentos descritos en el apartado 6.3, mostraron diferentes resultados.

Experimento no. 3.

En el experimento 3, al segundo día después de la unión de las cajas, los aislados de *Trichoderma* crecieron rápidamente en el medio donde se encontraba *P. capsici* (Figura 11), invadiendo el espacio y limitaron su crecimiento, por lo que la evaluación de metabolitos secundarios volátiles no se pudo observar.

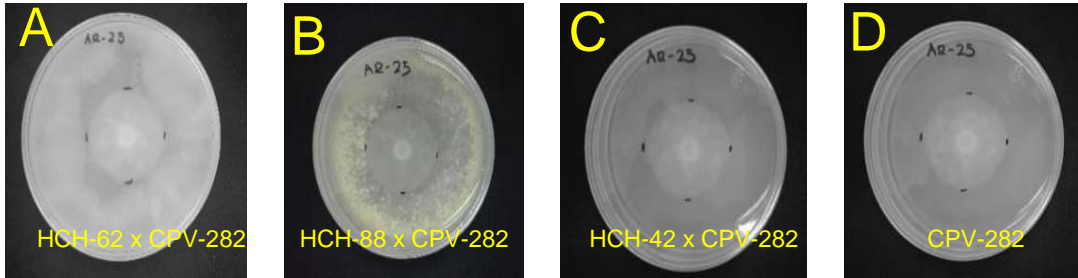


Figura 11. Invasión de los aislados de *Trichoderma* HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) en el medio donde se encontraba *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 2 días de la unión de las cajas. D) Control de *Phytophthora capsici*.

Experimento no. 4.

Se observó que el crecimiento de *Trichoderma* de nuevo fue más rápido que el de *P. capsici*, por lo que se generó invasión en el espacio del medio donde se encontraba *P. capsici* y la producción de metabolitos secundarios volátiles no pudo evaluarse (Figura 12).

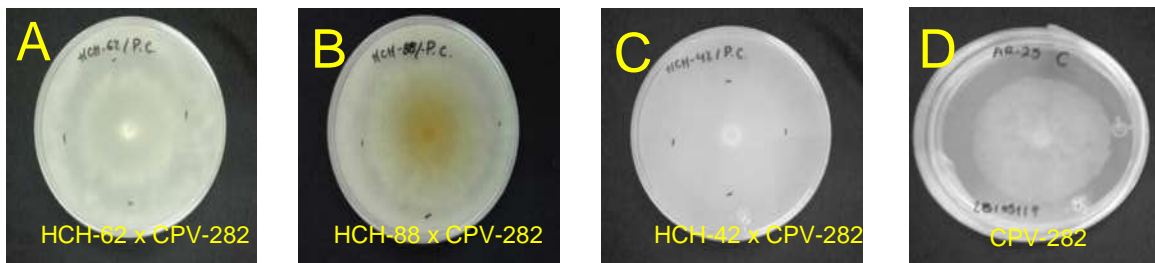


Figura 12. Invasión de los aislados de *Trichoderma* HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 5 días de crecimiento. D) Control de *Phytophthora capsici* CPV-282.

Experimento no. 5.

En este experimento se obtuvo un porcentaje de inhibición con el aislado HCH-62 (Cuadro 5), después de 5 días de crecimiento. Se observó que *Trichoderma* no invadió el medio donde se encontraba el patógeno (Figura 13), por lo que se pudo evaluar el efecto de metabolitos secundarios volátiles, siendo éste el mejor método para evaluar los compuestos volátiles.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición promedio (n=5) obtenido en las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles producidos con diferentes aislados de *Trichoderma* spp. frente a *Phytophthora capsici* CPV-282, después de 5 días de crecimiento. Aislados que comparten la misma letra, son estadísticamente iguales.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Crecimiento radial de <i>P. capsici</i> en presencia de <i>Trichoderma</i> (cm)	Control <i>P. capsici</i> (cm)	(%) inhibición
HCH-62	3.54	3.95	10.37 ^b
HCH-88	3.74	3.95	5.31 ^a
HCH-42	3.74	3.95	5.31 ^a

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0045$), para el porcentaje de inhibición con a los diferentes aislados de *Trichoderma*, al realizar la comparación de medias, los aislados HCH-88 y 42 resultaron estadísticamente iguales, ambos aislados filogenéticamente cercanos a *T. harianum* y diferentes al aislado HCH-62, el cual filogenéticamente es cercano a *T. atroviride* (Anexo 5).

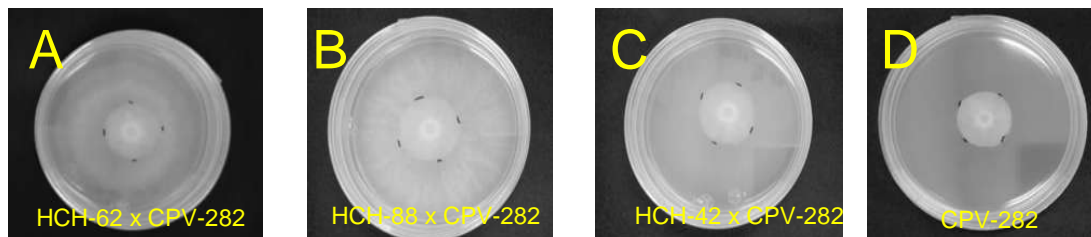


Figura 13. Evaluación de los metabolitos secundarios volátiles producidos por los aislados de *Trichoderma* HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 5 días de crecimiento. D) Control de *Phytophthora capsici* CPV-282.

Experimento no. 6.

No se observó un porcentaje de inhibición significativo con la técnica descrita para este experimento, debido a la rápida colonización después de 3 días de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* utilizados, por lo que, se detuvo el experimento antes de que *Trichoderma* invadiera todo el espacio donde se encontraba *P. capsici*. Sin embargo, se encontró un aumento el crecimiento de *P. capsici* con el aislado HCH-42 de 0.07mm con respecto al control a los 3 días de la evaluación (Cuadro 6, Figura 14).

Cuadro 6. Porcentaje de Inhibición promedio (n=5) de *Phytophthora capsici* cuantificado en las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles producidos con diferentes aislados de *Trichoderma* spp. después de 3 días de crecimiento. Aislados que comparten una misma letra, no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Crecimiento radial de <i>P. capsici</i> en presencia de <i>Trichoderma</i> (cm)	Control <i>P. capsici</i> (cm)	(%) inhibición
HCH-62	2.31	2.35	1.70 ^b
HCH-88	2.33	2.35	0.85 ^b
HCH-42	2.42	2.35	0 ^a

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0160$), para el porcentaje de inhibición frente a los diferentes aislados de *Trichoderma*, al realizar la prueba de comparación de medias, los aislados HCH-62 y 88 resultaron estadísticamente iguales, pero diferentes al aislado HCH-42.

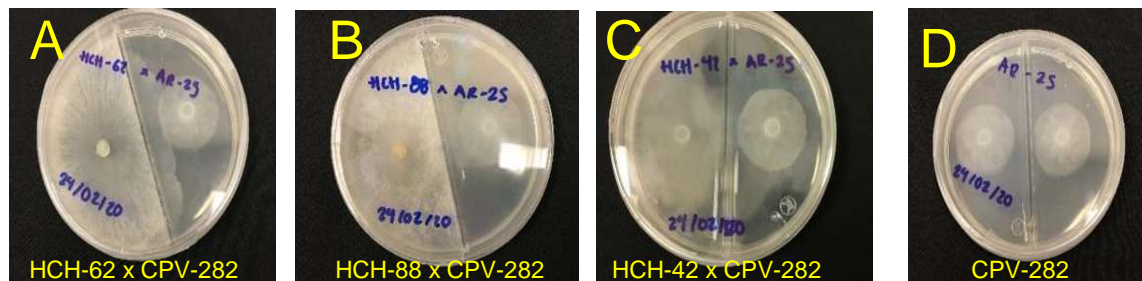


Figura 14. Evaluación de los metabolitos secundarios volátiles producidos por los aislados de *Trichoderma* HCH-62 (A), 88 (B) y 42 (C) frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 4 días de crecimiento. D) Control de *Phytophthora capsici* CPV-282.

Es importante estandarizar el método para realizar la evaluación de metabolitos secundarios volátiles de forma adecuada, de acuerdo al crecimiento que presentó *Trichoderma*, el mejor método fue el 5, ya que el efecto inhibitorio se presentó sin que *Trichoderma* colonizara el medio donde se encontraba *P. capsici* en comparación de los otros 3 experimentos donde no se pudo observar un efecto inhibitorio por sustancias volátiles debido a la rápida colonización e invasión en el espacio donde se encontraba *P. capsici*.

7.3. Eficacia de metabolitos secundarios no volátiles de *Trichoderma* sobre *P. capsici*

Experimento no. 7.

El siguiente experimento se realizó con el aislado HCH-48, de acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento 1. Esta evaluación se llevó a la par con las confrontaciones duales, en donde antes de obtener todos los resultados de las confrontaciones, se eligió por ser efectivo para detener el crecimiento de *P. capsici*.

Los resultados mostraron un bajo porcentaje de inhibición (Figura 15, Cuadro 7). El crecimiento del aislado HCH-48 en el medio con agitación fue en forma de esferas (blastospora) (Figura 16), en donde cada esfera representa una colonia de *Trichoderma*. Se observó una consistencia aceitosa, la cual no permitió una filtración adecuada con el filtro Whatman #1 y con la tela pellón, también se observó una coloración más oscura en el medio. En el medio sin agitación, se formó una manta de micelio, no hubo dificultad

para filtrar y el color del medio se observó más claro que el que estuvo en agitación (Figura 16).

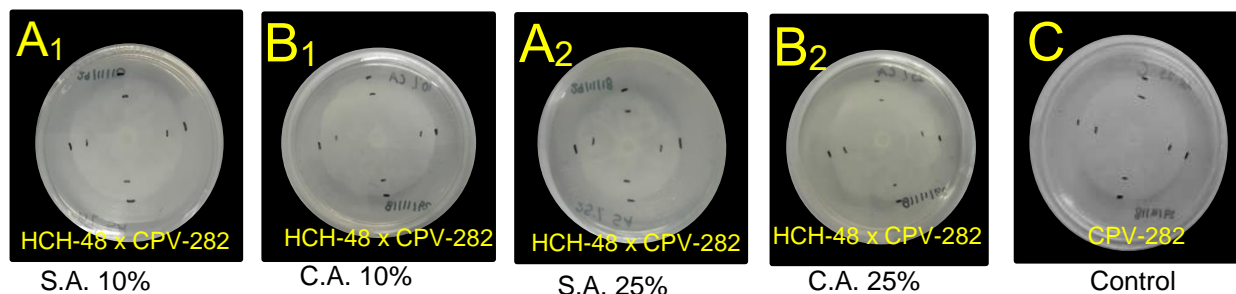


Figura 15. Evaluación de los metabolitos secundarios no volátiles producidos por el aislado HCH-48 de *Trichoderma* (A1- s/agitación 10%, A2- s/agitación 25 %, B1- c/agitación 10%, B2- c/agitación 25 %) frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 6 días de crecimiento. C) Control de *Phytophthora capsici* CPV-282.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición promedio (n=5) obtenido de las evaluaciones de metabolitos secundarios no volátiles producidos por el aislado de *Trichoderma* HCH-48 después 6 días de crecimiento frente a *Phytophthora capsici*. Concentraciones y condiciones que comparten una misma letra, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

% de extracto	Condición	Control de <i>P. capsici</i> (cm)	Crecimiento de <i>P. capsici</i> en presencia de <i>Trichoderma</i>	% Inhibición
10 ^a	Agitación ^a	5.30	5.28	0.37
10 ^a	Estático ^b	5.30	4.77	10
25 ^b	Agitación ^a	5.30	5.21	1.69
25 ^b	Estático ^b	5.30	4.13	22.07

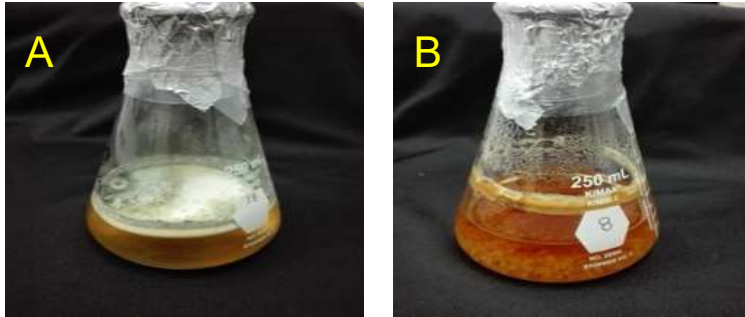


Figura 16. Crecimiento de *Trichoderma* en medio líquido papa dextrosa: A) Cepa de *Trichoderma* HCH-48 incubada sin agitación a 26°C en oscuridad. B) Cepa de *Trichoderma* HCH-48 incubada con agitación a 30°C en oscuridad. Ambos después de 7 días de crecimiento.

Los resultados del análisis de varianza indicaron diferencias estadísticamente significativas para el factor de las concentraciones evaluadas ($P=0.0067$), siendo al 25% la concentración más efectiva para detener el crecimiento radial de *P. capsici* con respecto al control. Respecto al factor de la condición empleada para crecer *Trichoderma*, HCH-48, también se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0000$), en donde se encontró que la condición sin agitación es más efectiva para realizar la evaluación ya que de acuerdo a los resultados y en comparación con el control se limita el crecimiento de *P. capsici*.

Experimento no. 8.

El crecimiento para los aislados HCH-88 y 42 fue de forma esférica (blastospora) (Figura 17 B y C), mientras que para el aislado HCH-62 fue de forma irregular (Figura 17 A), se encontró un porcentaje de inhibición máximo con el aislado HCH-62 frente a *P. capsici* CPV-282 (Cuadro 8, Figura 18, B1 y B2); mientras que con los aislados HCH-88 y HCH-42 se encontró un incremento del crecimiento de *P. capsici* CPV-282 con respecto al control (Figura 18, C1-D2, Cuadro 8).



Figura 17. Crecimiento de *Trichoderma* sp. en medio líquido papa dextrosa: A) Cepa HCH-62, B) Cepa HCH-88 y C) Cepa HCH-42.

Cuadro 8. Análisis factorial del crecimiento radial e inhibición de *Phytophthora capsici* por diferentes concentraciones de metabolitos secundarios no volátiles producidos por aislados de *Trichoderma* HCH-62, 88 y 42, después de 6 días de crecimiento.

Factor	Crecimiento de <i>P. capsici</i>	
	en presencia de metabolitos de <i>Trichoderma</i> (cm)	% Inhibición
Aislado de <i>Trichoderma</i> (A)		
HCH-62	2.32 A	55 A
HCH-88	5.63 B	0 B
HCH-42	5.70 C	0 B
Concentración del metabolito (C)		
5.3	5.13 A	3.41 B
21	3.97 B	33.3 A
Interacción (A x C)		
HCH-62 x 5.3	4.65 E	10.23 B
HCH-62 x 21	0 A	100 A
HCH-88 x 5.3	5.37 D	0 C
HCH-88 x 21	6.04 B	0 C
HCH-42 x 5.3	5.38 D	0 C
HCH-42 x 21	5.89 C	0 C

Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas. Tukey ($P < 0,05$).

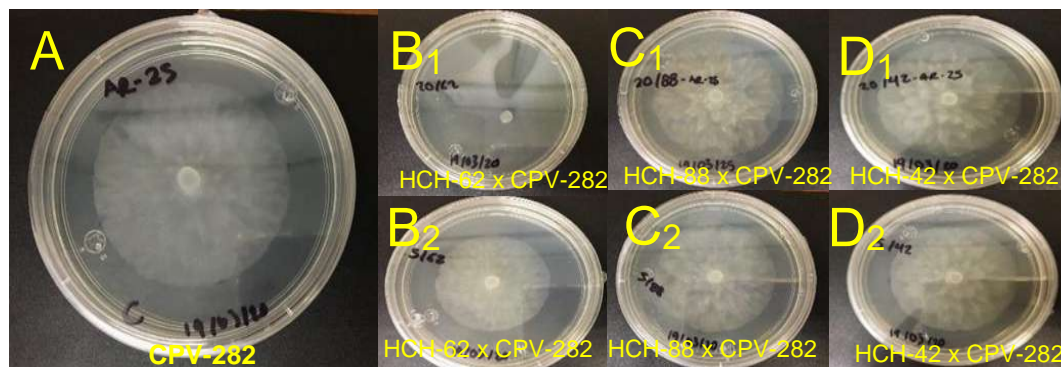


Figura 18. Evaluación de los metabolitos secundarios no volátiles producidos por los aislados de *Trichoderma* HCH-62 (B1, B2), 88 (C1, C2) y 42 (D1, D2) frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 6 días de crecimiento. A) Control de *Phytophthora capsici* CPV-282.

El análisis estadístico de los datos mostró un efecto altamente significativo ($P < 0.001$), para cada uno de los factores estudiados y su interacción, en el crecimiento de *P. capsici* y el porcentaje de Inhibición (Cuadro 8). Respecto a las diferentes cepas evaluadas se encontró que la cepa HCH-62 fue la única que mostró inhibición del crecimiento (55%). Por el contrario, las cepas HCH-88 y 42, estimularon el crecimiento de *P. capsici* en las placas de petri, siendo la HCH-42 donde *P. capsici* incrementó su crecimiento un 13%. Respecto al factor concentración, se encontró que la concentración más alta mostró el mayor efecto inhibitorio pero solo de la cepa HCH-62. En el caso de las cepas HCH-88 y 42, también se observó efecto en la concentración empleada; pero en este caso, a mayor concentración se incrementó el crecimiento de *P. capsici*.

Finalmente, en el caso de las interacciones, la combinación de la cepa HCH-62 con la concentración 21 fue donde se alcanzó un 100% de inhibición de *P. capsici*, le siguió el tratamiento de la cepa HCH-62 con la concentración de 5.3 donde se logró un 10% de inhibición del crecimiento. En el caso de los demás tratamientos, no se logró inhibir al patógeno, en estos casos se observó un efecto contrario, se estimuló el crecimiento en promedio un 9% (Figura 19).

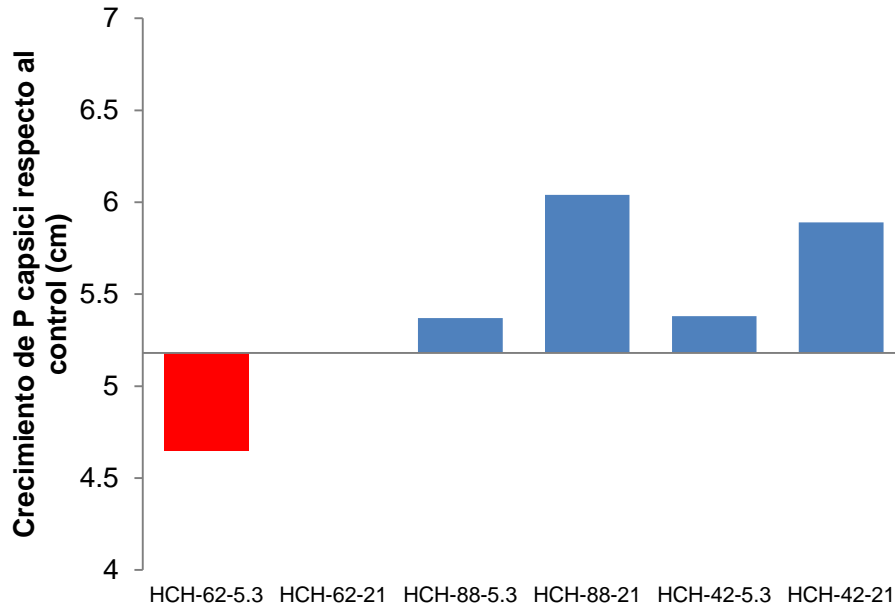


Figura 19. Crecimiento del patógeno *Phytophthora capsici* en los diferentes tratamientos evaluados. Barra de color rojo significa inhibición, barras en color azul muestran promoción, ambos respecto al crecimiento del control (5.18).

Las diferencias encontradas en la inhibición del crecimiento de *P. capsici* podrían explicarse en parte, por la diferencia de especies y metabolitos secundarios producidos por los diferentes aislados, ya que, de acuerdo al análisis filogenético, HCH-62 está filogenéticamente cercano a *T. atroviride*, mientras que los aislados HCH-88 y 42 a *T. harzianum* (Anexo 5). Lo cual dependiendo de la especie podrían ser los metabolitos producidos y en el caso de las cepas HCH-42 y 88, el metabolito producido está estimulando el crecimiento de *P. capsici*.

7.4 Comparación del efecto inhibitorio de la cepa de *Trichoderma* que generó mayor inhibición.

El aislado HCH-62 destacó sobre el resto de los aislados en los diferentes métodos evaluados frente a *P. capsici* CPV-282; Se obtuvo el 58.60% de inhibición en confrontaciones duales compitiendo por el espacio y colonizando el aislado de *P. capsici*, teniendo claramente un efecto antagónico al reducir el crecimiento radial en presencia de *Trichoderma*. En las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles tuvo en promedio un porcentaje de inhibición del 5.87%, siendo este el porcentaje de inhibición más bajo reportado con este aislado de *Trichoderma*. El mejor método para emplear la evaluación fue el realizado en el experimento 5, en donde se inocularon los discos de micelio del patógeno y el antagonista en cajas Petri por separado, y el mismo día de la inoculación se procedió a unir las cajas para evaluar el efecto de las sustancias volátiles producidas por *Trichoderma*. Cabe mencionar que los experimentos 3 y 4, no funcionaron para evaluar volátiles de *Trichoderma* debido a la rápida colonización e invasión en el espacio que efectuaban donde se encontraba *P. capsici*. En las evaluaciones de metabolitos secundarios no volátiles HCH-62 obtuvo el 100% de inhibición frente a *P. capsici* en la concentración al 21%, siendo este método el más eficiente en condiciones *in vitro* para inhibir el crecimiento del aislado virulento de *P. capsici* CPV-282. El aislado HCH-62, compite de manera eficiente por espacio, demostró tener un claro antagonismo sobre *P. capsici* CPV-282, en confrontaciones duales, limitando el crecimiento del patógeno invadiendo el espacio del medio y no permitiendo que *P. capsici* continuara su crecimiento. Por otro lado, los metabolitos secundarios no volátiles extraídos en el experimento no. 8 detuvieron 100% el crecimiento radial de *P. capsici*, posiblemente porque estén implicados antibióticos o componentes que no permiten el crecimiento del patógeno, por lo que estudiar e identificar los componentes no volátiles que estuvieran implicados en la inhibición del patógeno, podrían implementarse en el manejo de la enfermedad o para la elaboración de productos biotecnológicos.

8. DISCUSIÓN

El análisis de las diferentes evaluaciones de aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *P. capsici* *in vitro* mostró diferencias en el porcentaje de inhibición. De acuerdo al análisis filogenético preliminar de las cepas de *Trichoderma* utilizadas (Anexo 5), sugiere que se trata de especies diferentes, la mayoría cercanas a *T. harzianum* (HCH-88, 91, 71, 61, 48, 46, 11, 94) y una a *T. atroviride* (HCH-62). Con respecto a los aislados de *P. capsici* evaluados (CPV-279, 277 y 282), estudios realizados por Reyes-Tena (2019); mostraron que estos son aislados altamente virulentos en base a experimentos realizados *in vivo*. El llevar a cabo estudios con estos aislados es relevante porque estos fueron obtenidos de zonas de producción de Chile, en donde se quiere implementar el uso de ACB como parte del manejo integrado de la marchitez de Chile. De estos se seleccionó el aislado CPV-282 de *P. capsici* debido a que presentó menor crecimiento radial en presencia de aislados de *Trichoderma*, por lo que el efecto inhibitorio fue mayor.

El género *Trichoderma* se encuentra como endófito en plantas en interacciones benéficas ya que pueden ser antagonistas activos, protegiendo así a la planta de la invasión del patógeno (Sharma *et al.*, 2019). La competencia por espacio y nutrientes es considerada como uno de los principales mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas en el control biológico (Sharma *et al.*, 2009). Las especies de *Trichoderma* aisladas de partes aéreas de plantas de *Heliconia* sp. utilizadas en el presente estudio se encontraban como endófitos. Estas mostraron diferencias en el porcentaje de inhibición, lo que coincide con lo reportado por Guigón-López y González-González (2003), quienes reportaron actividad antagónica en confrontaciones duales de aislados de *Trichoderma* obtenidos de hojas de diferentes plantas (menta, Chile jalapeño y durazno), en donde todos los aislados presentaron diferencias en el grado de antagonismo frente a *P. capsici*, que oscilaban entre 42 al 51% de inhibición. Los autores sugieren que la supresión de este fitopatógeno es a través de los mecanismos de competencia y antibiosis. De manera similar De la Cruz-Quiroz *et al.* (2018) encontraron diferentes porcentajes de inhibición frente a *P. capsici* que oscilaron entre 5% y 22.10% en confrontaciones duales. Por otro lado, Yao *et al.* (2016) encontraron que el crecimiento de *P. capsici* se redujo en un 63% por efecto de la cepa HNA12 de *Trichoderma* sp. Los resultados en el presente estudio,

mostraron que de acuerdo al porcentaje de inhibición obtenido con los diferentes aislados de *Trichoderma* evaluados, y en base al análisis filogenético preliminar, podría tratarse de diferentes especies y/o de diferentes compuestos liberados, como antibióticos o compuestos volátiles que se pueden difundir a través del medio, limitando el crecimiento de *P. capsici*, o bien que los aislados son buenos competidores por nutrientes y antagonicos, ya que de acuerdo a la escala de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982), estos aislados se encuentran en Clase 2, ya que cubren más del 75% de la caja, impidiendo que el patógeno crezca (Cuadro 9).

Se ha reportado que el género *Trichoderma* secreta diversos compuestos volátiles (COV) que incluyen alcoholes, aldehídos y cetonas, etileno, cianuro de hidrógeno y monoterpenos (Sharma *et al.*, 2019). La riqueza de COV en *Trichoderma* aparentemente depende de la especie y cambia con la composición del sustrato (Crutcher *et al.*, 2013; Stoppacher *et al.*, 2010; Wheatley *et al.*, 1997). Los aislados de *Trichoderma* HCH-62, HCH-88 y HCH-42 evaluados en el presente estudio, tienen baja actividad inhibitoria frente a *P. capsici* por metabolitos secundarios volátiles, el promedio de los dos experimentos funcionales (experimento 5 y 6) fue de 5.87. En las evaluaciones realizadas en los experimentos 3 y 4, no se pudo realizar la evaluación de los volátiles por la invasión en el espacio del medio donde se encontraba *P. capsici*. Los resultados difieren a los reportados con Jamali *et al.* (2016), quienes observaron que la producción de metabolitos secundarios volátiles de aislados de *Trichoderma* redujeron el crecimiento radial de *P. drechsleri* de un 20 a 93%. En contraste, coincide parcialmente con un estudio realizado por Lupión-Rodríguez (2013), quien reportó un aumento en el crecimiento de las especies de *Phytophthora* evaluadas (*P. capsici* y *P. parasitica*) por la producción de metabolitos secundarios volátiles, ya que se observó un aumento en el crecimiento de *P. capsici* en el experimento no. 4 de volátiles del presente estudio.

Los resultados de la actividad de los compuestos no volátiles o difusibles producidos por el aislado de *Trichoderma* HCH-62 mostraron una inhibición máxima (100%) sobre el crecimiento de *P. capsici*, esta cepa se encuentra filogenéticamente cercana a *T. atroviride*, por lo que esta especie es promisoría como ACB y deben realizarse más estudios con la misma. Con los aislados HCH-48, 88 y 42 se observaron diferencias estadísticamente significativas para inhibir el crecimiento de *P. capsici*, el

aislado HCH-48 inhibió a *P. capsici* en promedio de 8.55%, sin embargo, también se observó que favoreció el crecimiento del patógeno en promedio de 1.96 cm, con los aislados HCH-88 (cercano a *T. harzianum*) y 42, esto indica que el tipo y la producción de compuestos inhibidores de fitopatógenos varía entre las especies de *Trichoderma* y entre las cepas de la misma especie. Un estudio *in planta* desarrollado por Quinto-Álvarez (2014), mostró que *T. harzianum* en combinación con quitosano aceleró el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici* en plantas de Chile. Por lo que es posible que componentes producidos por *T. harzianum* pudieran estar involucrados en el crecimiento de *P. capsici*. De manera similar, LeLay *et al.* (2007) al evaluar cepas de *Trichoderma* con el hongo *Rosellinia necatrix*, reportaron que algunas cepas de *Trichoderma* estimularon el crecimiento del patógeno. De acuerdo con Janitor (2002) algunas especies de *Trichoderma* producen fitohormonas que podrían estimular el crecimiento de los patógenos.

Cabe destacar que *Trichoderma* puede presentar mecanismos de acción de defensa tanto directos como indirectos. En el presente estudio, el aislado HCH-62 destacó sobre el resto de los aislados en los diferentes métodos evaluados frente a *P. capsici* CPV-282. En confrontaciones duales produjo un 58.60% de inhibición, en la evaluación de metabolitos secundarios volátiles tuvo en promedio un porcentaje de inhibición del 5.87%, siendo el porcentaje de inhibición más bajo que se observó, mientras que en las evaluaciones de metabolitos secundarios no volátiles obtuvo el 100%. Este último método fue el más eficiente para inhibir el crecimiento del aislado CPV-282 de *P. capsici*. Al parecer, el aislado HCH-62 utiliza de manera más eficiente los mecanismos de defensa indirectos, produciendo diferentes compuestos/antibióticos que detienen el crecimiento de *P. capsici*. Un trabajo futuro con este aislado será identificar la especie utilizando técnicas moleculares, así como identificar los componentes volátiles y no volátiles que estuvieran implicados en la inhibición del patógeno. Determinar que compuesto están involucrados abriría oportunidades de elaboración de productos biotecnológicos que podrían aplicarse en campo para controlar la marchitez del Chile y otras hortalizas.

De acuerdo con Howel (2003), la comprensión de la diversidad genética de las cepas dentro de las especies de *Trichoderma*, así como de sus mecanismos de control biológico conducirá a una mejor aplicación de las diferentes cepas como ACB. De

acuerdo a las características genéticas que estas cepas presenten, será el mecanismo de acción para confrontar las diversas situaciones de estrés, facilitando la producción de metabolitos secundarios.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, los aislados de *Trichoderma* emplean diferentes mecanismos de acción para hacer frente a los aislados virulentos de *P. capsici* por lo cual se observaron diferencias en el porcentaje de inhibición.

Los aislados de *Trichoderma* HCH-88, 99, 11, 94, 71, 36, 46, 42, 61 y 60, no inhibieron significativamente aislados virulentos de *P. capsici*, mientras que los aislados 48 y 62 inhiben significativamente los aislados de *P. capsici* en confrontaciones duales.

Los aislados de *Trichoderma* spp. evaluados en los experimentos con metabolitos secundarios volátiles, y los aislados HCH-48,88 y 42 evaluados en experimentos con metabolitos no volátiles, no tuvieron efecto inhibitorio significativo en condiciones *in vitro*.

El aislado HCH-62 de *Trichoderma* con el cual se obtuvo un 100% podría ser un buen ACB, para lo cual es necesario realizar estudios *in planta* para determinar si reduce el daño ocasionado por *P. capsici* en plantas de Chile.

10. REFERENCIAS

- Al-Mughrabi K. 2008. **Biological control of *Phytophthora infestans* of potatoes using *Trichoderma atroviride***. Pest Technology. 2: 104-108.
- Anke H., Kinn J., Borgquist K. E. and Sterner O. 1991. **Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. Isolation and characterization of the new lipophilic coprogen derivative palmitoyl coprogen**. Biometals. 4: 157-165.
- Aguirre-Mancilla C. L., Iturriaga de la Fuente G., Ramírez-Pimentel J. G., Covarrubias-Prieto J., Chablé-Moreno F. y Raya-Pérez J. C. 2017. **El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla**. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 1: 19-27.
- Ávila-Miranda M. E., Herrera-Estrella A. y Peña-Cabrales J. J. 2006. **Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions**. Soil Biology Biochemichal. 38: 1823-1830.
- Bae S. J., Mohanta T. K., Chung J. Y., Ryu M., Park G., Shim S., Hong S. B., Seo H., Bae D. W., Bae I., Kim J. J., and Bae H. 2016. ***Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens**. Biological Control. 92: 128-138.
- Barakat F. M., Abada K. A., Abou-Zeid N. M., and El-Gammal H. E. 2014. **Effect of volatile and non-volatile compounds of *Trichoderma* spp. on *Botrytis fabae* the causative agent of faba bean chocolate spot**. American Journal of Life Sciences. 2: 6-2.
- Barroso-Albarracín J. B., Rincón-Romero A. M., Chaki M., Carreras E., Pérez-Artés E. Valderma R., Ruano-Rosa D., Prieto P., López-García A. A. y Mercado-Blanco J. 2015. ***Trichoderma harzianum* como agente de control biológico frente a la Verticilosis del olivo**. Ciencias Agrarias. 12: 22-34.
- Bautista-Calles J., García-Espinosa R., Zavaleta-Mejía E., Pérez-Moreno L., Montes-Belmont R., Ferrera-Cerrato R. y Huerta-Lara M. 2010. **Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con la aplicación de complejidad ascendente de antagonistas al sustrato de germinación del chile (*Capsicum annum* L.)**. Interciencia. 35: 613-618.

- Bell D. K., Well H. D. and Markham C. R. 1982. **“In vitro” antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens.** *Phytopathology*. 72: 379-382.
- Benítez T., Rincón A. M., Limón C. y Codón A. C. 2004. **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains.** *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Bernhardt E. A., and Grogan R. G. 1982. **Effect of soil matrix potential on the formation and indirect germination of sporangia of *Phytophthora parasitica*, *P. capsici*, and *P. cryptogea*.** *Phytopathology*. 72: 507-511.
- Bonnarme P., Djian A., Latrasse A., Féron G., Giniés C., Durand A. and Le Querré J. L. 1997. **Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils.** *Journal of Biotechnology*. 56: 143-150.
- Bowers J. H., Sonoda R. M., and Mitchell D. J. 1990. **Path coefficient analysis of the effect of rainfall variables on the epidemiology of *Phytophthora blight* of pepper caused by *Phytophthora capsici*.** *Phytopathology*. 80: 1439-1446.
- Bozkurt T. O., Schornack S., Banfield M. J., and Kamoun S. 2012. **Oomycetes, effectors, and all that jazz.** *Plant Biology*. 15: 483-492.
- Buchert J., Ranua M., Siika M., Pere J. and Viikari J. 1994. ***Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40: 941-945.
- Café-Filho A. C. and Duniway J. M. 1995. **Effect of location of drip irrigation emitters and position of *Phytophthora capsici* infections on roots on *Phytophthora* root rot of pepper.** *Phytopathology*. 86: 1364-1369.
- Carnero K. G., Medina E. L., Salvatierra C. Z., Castillo J. D. y Miranda W. M. 2013. **Efecto biofungicida de *Trichoderma harzianum* y de extractos de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Ricinus communis* sobre *Rhizoctonia solani*.** *REBIOLEST*. 1: 43-48.
- Castillo S. Y., Berroterán A. y Sarria G. 2019. **Evaluación de aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. obtenidos en la zona norte para el control de *Phytophthora palmivora* agente causal de la pudrición del cogollo.** *Biological Control*. 46: 24-35.

- Castro-Rocha A., Fernández-Pavía S. P. y Osuna Ávila P. 2012. **Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici***. Revista mexicana de fitopatología. 30: 49-65.
- Chen X. R., Zhang Y., Li H. Y., Zhang Z. H., Sheng G. L., Li Y. P., Xing Y. P., Huang S. X., Tao, H., Kuan T., Zhai Y., and Ma W. 2019. **The RXLR effector PcAvh1 is required for full virulence of *Phytophthora capsici***. Molecular Plant-Microbe Interactions. 32: 986-1000.
- Cohen-Kupiec R., Broglie K. E., Friesem D., Broglie R. M. and Chet I. 1999. **Molecular characterization of a novel β -1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum***. Gene. 226: 147-154.
- Crutcher F. K., Parich A., Schuhmacher R., Mukherjee P. S., Zeilinger S., Kenerley C. M. 2013. **A putative terpene cyclase, vir4, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens***. Fungal Genetic Biology. 56: 67–77.
- De la Cruz-Quiroz R., Roussos S., Rodríguez-Herrera R., Hernandez-Castillo D. y Aguilar C. N. 2018. **Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains**. International Journal of Modern Science. 4: 237-243.
- Duniway J. M. 1976. **Movement of zoospores of *Phytophthora cryptogea* in soils of various textures and matric potentials**. Phytopathology 66: 877-882.
- Duniway J. M. 1979. **Water relations of water molds**. Annual Review of Phytopathology. 17: 431-460.
- Durman S., Menendez A. y Godeas A. 1999. **Evaluación de *Trichoderma* spp. Como antagonista de *Rhizoctonia solani* in vitro y como biocontrolador del damping-off de plantas de tomate en invernadero**. Revista Argentina de Microbiología. 31: 13-18.
- Espinosa-Victoria D., González-Mendoza D., Placencia-de la Parra J. y García-Espinosa R. 2004. **Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo. en el sistema radical de plántulas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intraradices***. Terra Latinoamericana. 22: 317–326.

- Ezziyyani M., Pérez S. C., Ahmed A. S., Requena M. E. y Candela M. E. 2004. ***Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.)**. Anales de Biología. 26: 35–45.
- Ezziyyani M., Requena M. E., Egea Gilabert C. y Candela M. E. 2007. **Biological control of *Phytophthora* root of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination**. Journal of Phytopathology. 155: 342-349.
- Fernández-Herrera E., Acosta-Ramos M., Ponce-González F., y Manuel-Pinto V. 2007. **Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo, *Fusarium oxysporum* Schlechtend Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mili)**. Revista Mexicana de Fitopatología. 25: 35–42.
- Fernández-Larrea V. O. 2001. **Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Fomento de productos fitosanitarios no sintético**. Manejo Integrado de Plagas. 62: 96-100.
- Fernández-Pavía S. P., Biles C. L., Waugh M., Onsurez-Waugh K., Rodríguez-Alvarado G., y Liddell C. 2004. **Characterization of southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper (*Capsicum annum* L)**. Revista Mexicana de Fitopatología. 22: 82–89.
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C., McCraw S. L., and Gurr, S. J. 2012. **Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health**. Nature. 484: 186–194.
- García-Núñez H. G., Martínez-Campos Á. R., Hermosa-Prieto M. R., Monte-Vázquez E., Aguilar-Ortigoza C. J. y González-Esquivel C. E. 2017. **Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans***. Revista Mexicana de Fitopatología. 35: 58-79.
- González-Rodríguez M., Castellanos-González L., Ramos-Fernández M., Pérez-González G. 2005. **Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol**. Fitosanidad. 1: 37-41.

- Guigón-López C. y González-González P. A. 2004. **Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.).** Revista Mexicana de Fitopatología. 22: 117-124.
- Ghisalberti E. L. and Sivasithamparam K. 1991. **Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp.** Soil Biology Biochemistry. 23: 1011-1020.
- Gutiérrez-Nuñez M. S. 2013. **Evaluación de *Trichoderma harzianum* y materia orgánica para el manejo biológico de *Phytophthora capsici* en suelo y planta de chile.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Harman G. 2000. **Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22.** Plant Disease. 84: 377-393.
- Harman G. 2006. **Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp.** Phytopathology. 96: 190-194.
- Harman G. E., Howel C. H., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. 2004. ***Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts.** Nature Reviews Microbiology. 2: 43–56.
- Howell C. 2003. **Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts.** Plant Disease. 87: 4-10.
- Inbar J. and Chet I. 1997. **Lectins and biocontrol.** Critical reviews in biotechnology. 17: 1-20.
- Infante D., González N., Reyes Y. y Martínez B. 2011. **Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo.** Revista de Protección Vegetal. 26: 194-197.
- Jackkish-Matsuura A. B., Menezes M. 1999. **Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*).** Summa Phytopathologica. 25: 161-164.
- Jamali S., Panjehkeh N. y Mohammadi A. H. 2016. **Inhibición de especies de *Trichoderma* del crecimiento y producción de zoosporas de *Phytophthora***

- Drechsleri* y sus efectos sobre las enzimas hidrolíticas.** Journal of Nuts. 7: 137-148.
- Janitor A. 2002. **Growth of mycelia of phytopathogenic fungi after application of abscisic acid in *in vitro* conditions.** Plant Protection Science-Prague. 38: 94–97.
- Kamoun S., Furzer O., Jones J. D., Judelson H. S., Ali G. S., Dalio R. J., and Govers F. 2015. **The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology.** Molecular plant pathology. 16: 413-434.
- Kerroum F., Karkachi N., Jamal E. y Kihal M. 2015. **Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* in the North-west of Algeria.** International Journal of Agronomy and Agricultural Research. 6: 44-53.
- LeLay Y., Ruano R. D. y López H. C. 2007. ***In vitro* compatibility studies of monoconidia *Trichoderma* sp. Isolates with potential to be used as biocontrol agent against white avocado decay.** Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) (in Spanish).
- Leonian L. H. 1922. **Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* species nov.** Phytopathology. 12: 401-408.
- Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., and Kahmann, R. 2015. **Fungal effectors and plant susceptibility.** Annual review of plant biology. 66: 513-545.
- Lupi3n-Rodr3guez B. 2013. **Evaluaci3n del poder antagonista de *Trichoderma* sp. frente a dos formas especializadas de *Fusarium oxysporum* y dos especies de *Phytophthora*.** Tesis de Maestría. Repositorio Institucional UAL. Universidad Arzobispo Loayza.
- Mart3nez B., Infante D., y Reyes Y. 2013. ***Trichoderma* spp. y su funci3n en el control de plagas en los cultivos.** Revista de Protecci3n Vegetal. 28: 1-11.
- Michel-Aceves A.C., Rebolledo-Dom3nguez O., Lezama-Guti3rrez R., Ochoa-Moreno M.E., Mesina-Escamilla J.C. y Samuels G. 2001. **Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*.** Revista Mexicana de Fitopatolog3a. 19: 154–160.

- Morán-Bañuelos S. H., Aguilar-Rincón V. H., Corona-Torres T. y Zavaleta-Mejía E. 2010. **Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo de chiles nativos del sur de Puebla.** Revista Fitotecnia Mexicana. 33: 21-26.
- National Center for Biotechnology Information. 2019. **Taxonomía de NCBI Lifemap versión.** USA. <http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=5543>. Consultado el 11 de Julio del 2019.
- Nawaz K., Shahid A. A., Bengyella L., Subhani M. N., Ali M., Anwar W., Iftikhar S., Ali S. W. 2018. **Diversity of *Trichoderma* species in chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsici*.** Scientia Horticulturae. 239: 242-252.
- Pérez-Moreno L., Durán O. L, Ramírez M. R, Sánchez P.R y Olalde P.V. 2003. **Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo.** Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 19-25.
- Pernezny K., Roberts P.D., Murphy J. F., and Goldberg N. P. 2003. **Compendium of pepper diseases.** The American Phytopathological Society. 63.
- Quinto-Álvarez C. P. 2014. **Nuevas alternativas de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. Causante de la marchitez en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.)** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Ramos-Sandoval R. U., Gutiérrez-Soto J. G., Rodríguez-Guerra R., Salcedo-Martínez S. M., Hernández-Luna C. E., Luna-Olvera H. A., Jiménez-Bremont J. F., Fraire-Velázquez S. y Almeida I. H. 2010. **Antagonismo de dos ascomicetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L).** Revista Mexicana de Fitopatología. 28: 75-86.
- Reifschneider, J. B., Boiteux L. S., Della P. T., Poulos J. M., and Kuroda N. 1992. **Inheritance of adult plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper.** Euphytica. 62:45-49.

- Rey M., Delgado-Jarana J., Rincón A., Limón M. D. C., y Benítez T. 2000. **Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas.** Revista Iberoamericana de Micología. 17: 31-36.
- Reyes Y., Martínez B. y Infante D. 2008. **Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp.** Revista Protección Vegetal. 23: 112-117.
- Reyes-Tena A., Rincón-Enríquez G., López-Pérez L. y Quiñones-Aguilar E. E. 2017. **Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annuum* L. against *Phytophthora capsici*.** Pakistan Journal of Agricultural Sciences. 54: 513-522.
- Reyes-Tena A., Castro-Rocha A., Rodríguez-Alvarado G., Vázquez-Marrufo G., Pedraza-Santos M. E., Lamour K., Larsen J., y Fernández-Pavía S. P. 2019. **Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico.** Hortscience. 54: 1526-1531.
- Ristaino J. B., Hord M. J., and Gumpertz M. L. 1992. **Population densities of *Phytophthora capsici* in field soils in relation to drip irrigation, rainfall, and disease incidence.** Plant Disease. 76: 1017-1024.
- Ristaino J. B., and Johnston S. A. 1999. **Ecologically based approaches to management of *Phytophthora blight* on bell pepper.** Plant Disease. 83: 1080-1089.
- Rodríguez del Bosque L. A. y Arredondo B. H. 2007. **Teoría y aplicación del control biológico.** Sociedad Mexicana de Control Biológico. pp. 303.
- Rojo F.G., Reynoso M. M., Perez M., Chulze S. N. y Torres A. M. 2007. **Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions.** Crop Protection. 26: 549-555.
- Sánchez A. D., Ousset M. J., Sosa M. C. 2019. **Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms.** Biological Control. 135: 124-134.
- Sánchez-Gurrola C., Gómez-Dorantes N., Rodríguez-Alvarado G-, Fernández-Pavía S. P. y Ávila-Quezada G. 2019. **Variabilidad morfológica y sensibilidad de**

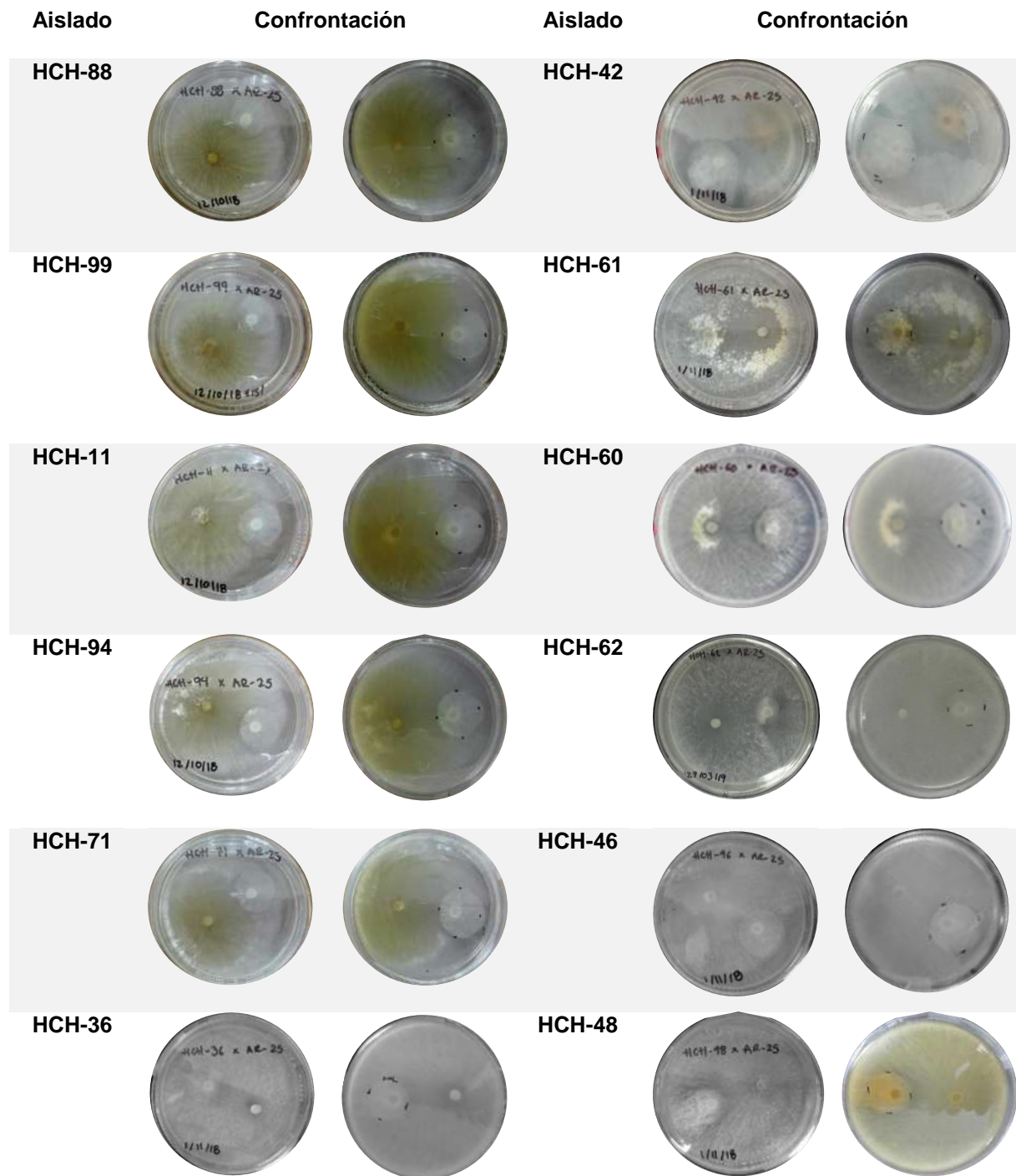
- Phytophthora capsici* causando marchitez en Chile pimiento morrón en Chihuahua, México.** Revista Mexicana de Fitopatología. 37: 65-71.
- Sansome E. 1976. **Gametangial meiosis in *Phytophthora capsici*.** Canadian Journal of Botany. 54: 1535-1545.
- Sanz L. Montero M., Redondo J., Llobell A. and Monte E. 2005. **Expression of an β -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*.** FEBS Journal. 272: 493-499.
- Savitha M. J., Sriram S. 2015. **Identificación morfológica y molecular de aislados de *Trichoderma* con potencial de biocontrol contra el tizón de *Phytophthora* en pimiento rojo.** Manejo de Plagas en Ecosistemas de Horticultura. 21: 194-202.
- Schirmböck M., Lorito M., Wang Y. L., Hayes C. K., Arisan-Atac I., Scala F., and Kubicek, C. P. 1994. **Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi.** Applied and Environmental Microbiology. 60: 4364-4370.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 2010). www.siap.gob.mx/ (Accesada 17 de enero 2019).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 2018). www.siap.gob.mx/ (Accesada 17 de enero 2019).
- Sharma S., Kour D., Lata R. K., Dhiman A., Thakur S., Thakur P., Thakur S., Thakur N., Sudheer S., Yadav N., Nath Y. A., Rastegari A. A., Singh K. 2019. ***Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications.** Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. pp 85-120.
- Silva-Rojas H. V., Fernández-Pavía S. P., Góngora-Canul C., Macías-López B. C., y Ávila-Quezada G. D. 2009. **Distribución espacio temporal de la marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo.** Revista Mexicana de Fitopatología. 27: 134-147.
- Sivan A. and Chet I. 1989. **The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization.** Phytopathology. 97: 198-203.

- Soto-Plancarte A., Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía Y. L., Pedraza-Santos M. E., López-Pérez L., Díaz-Celaya M. y Fernández-Pavía S. P. 2017. **Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8: 1867-1880.
- Souza-Silva L. C., Hanada R. E., ASSIS, Guimarães L. A., Camelo-García V. M., Rezende-Marques J. A., Yuki V. A., y Kitajima E. W. 2020. **Ocurrencia del virus del mosaico amarillo de la pimienta y del virus del mosaico del pepino en *Capsicum chinense* en el estado de Amazonas, Brasil.** Acta Amazonica. 50: 5-7.
- Stamps D. J., Waterhouse G. M., Newhook F. J., and Hall G. S. 1990. **Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*.** CAB International Mycological Institute, Mycology 162.
- Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R., Schuhmacher R. 2010. **Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS.** Journal Microbiology Methods. 81: 187–193.
- Vásquez L. A., Tlapal B.B., Yáñez M. M., Pérez P. R., y Quintos E. M. 2009. **Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México.** Revista Fitotecnia Mexicana. 32: 127-134.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. and Valéro J. R. 2007. **Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control.** Biochemical Engineering Journal. 37: 1-20.
- Vinale F., Sivasithamparamb K., Ghisalbertic E. L., Marraa R., Woo L. and Lorito M. 2008. ***Trichoderma*-plantpathogen interactions.** Soil Biology and Biochemistry. 40: 1-10.
- Wheatley R, Hackett C, Bruce A, Kundzewiczd A. 1997. **Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi.** International Biodeterioration and Biodegradation. 39: 199-205.
- Yao Y., Li Y., Huang Z., Hong Y., Sun C., Jinkang S., Du R., Pang X. and Wang Q. 2016. **Targeted selection of *Trichoderma* antagonists for control of pepper *Phytophthora* blight in China.** Plant Disease Protection. 123: 215-223.

11. ANEXOS

1.- Confrontaciones duales

Figura 20. Confrontaciones duales de 12 aislados de *Trichoderma* frente a *P. capsici* CPV-282.



Cuadro 9. Clases de antagonismo de acuerdo a la escala de *Bell et al.* (1982).

Clase	Descripción
5	El patógeno crece en toda la caja deteniendo a <i>Trichoderma</i> .
4	El patógeno crece más del 75% entremezclándose con <i>Trichoderma</i> e inhibiéndolo.
3	Patógeno y <i>Trichoderma</i> crecen 50% deteniendo ambos su crecimiento.
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece al patógeno inhibiéndolo y ocupando el 75% de la caja.
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja

Cuadro 10. Escala utilizada para evaluar la sobreposición de colonias de *Trichoderma* spp. propuesta por Jackkish-Matsuura y Menezes (1999).

Grado	Porcentaje	Interpretación
1	0 – 25	Nula o pobre sobreposición de colonias de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el fitopatógeno.
2	26 – 50	Sobreposición poco intensa de las colonias de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el fitopatógeno.
3	51 – 75	Sobreposición medianamente intensa de las colonias de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el fitopatógeno.
4	76 – 100	Sobreposición muy intensa de las colonias de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el fitopatógeno.

2.- Comparación del efecto inhibitorio de metabolitos secundarios volátiles con una cepa comercial de *Trichoderma* frente al aislado HCH-62 de *Trichoderma* sp.

Se realizó la comparación del aislado de *Trichoderma* HCH-62 con una cepa comercial de *Trichoderma harzianum* (THCOM1), se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de inhibición con a los diferentes aislados de *Trichoderma* P (0.0000), al realizar la comparación de medias, los aislados HCH-62 y THCOM1 resultaron estadísticamente iguales. Se observó el mayor porcentaje de inhibición con el aislado de *Trichoderma* HCH-62 (Figura 21, Cuadro 11).

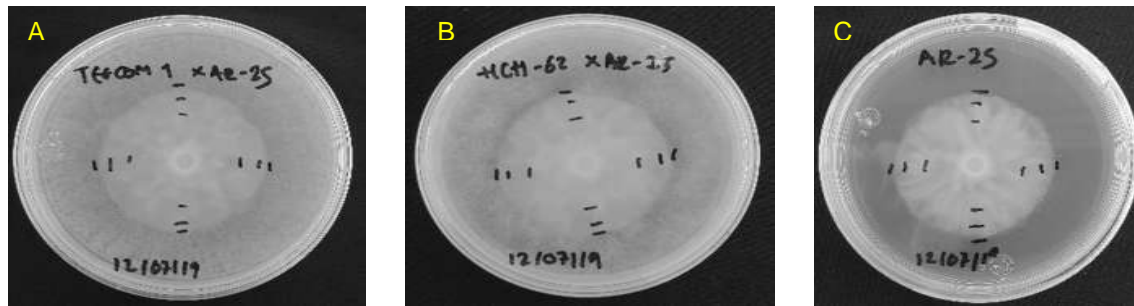


Figura 21. Evaluación de los metabolitos secundarios volátiles producidos por los aislados de *Trichoderma harzianum* Comercial (A) y HCH-62 (B) frente a *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 5 días de crecimiento. Control de *Phytophthora capsici* (C).

Cuadro 11. Inhibición promedio de *P. capsici* (n=5) de las evaluaciones de metabolitos secundarios volátiles producidos con aislados de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici* CPV-282 después de 5 días de crecimiento.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	(%) inhibición
HCH-62	2.7 ^a
THCOM1	1.5 ^b

3.- Evaluación en Invernadero

1.- Por motivos de la contingencia COVID-19 no se pudo llevar a cabo la evaluación con plantas en invernadero, pero se realizaron pruebas preliminares para evaluar la concentración de zoosporas de *P. capsici* para inocular en los chiles, de la cual se eligió la concentración de 1000 zoosporas/mL, debido a que en esta concentración se inducían los síntomas de la enfermedad, mientras que con las concentraciones de 500 y 750 no hubo síntomas visibles (Figura 22). Esta información será de utilidad para estudios posteriores, en condiciones de invernadero.



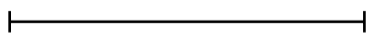
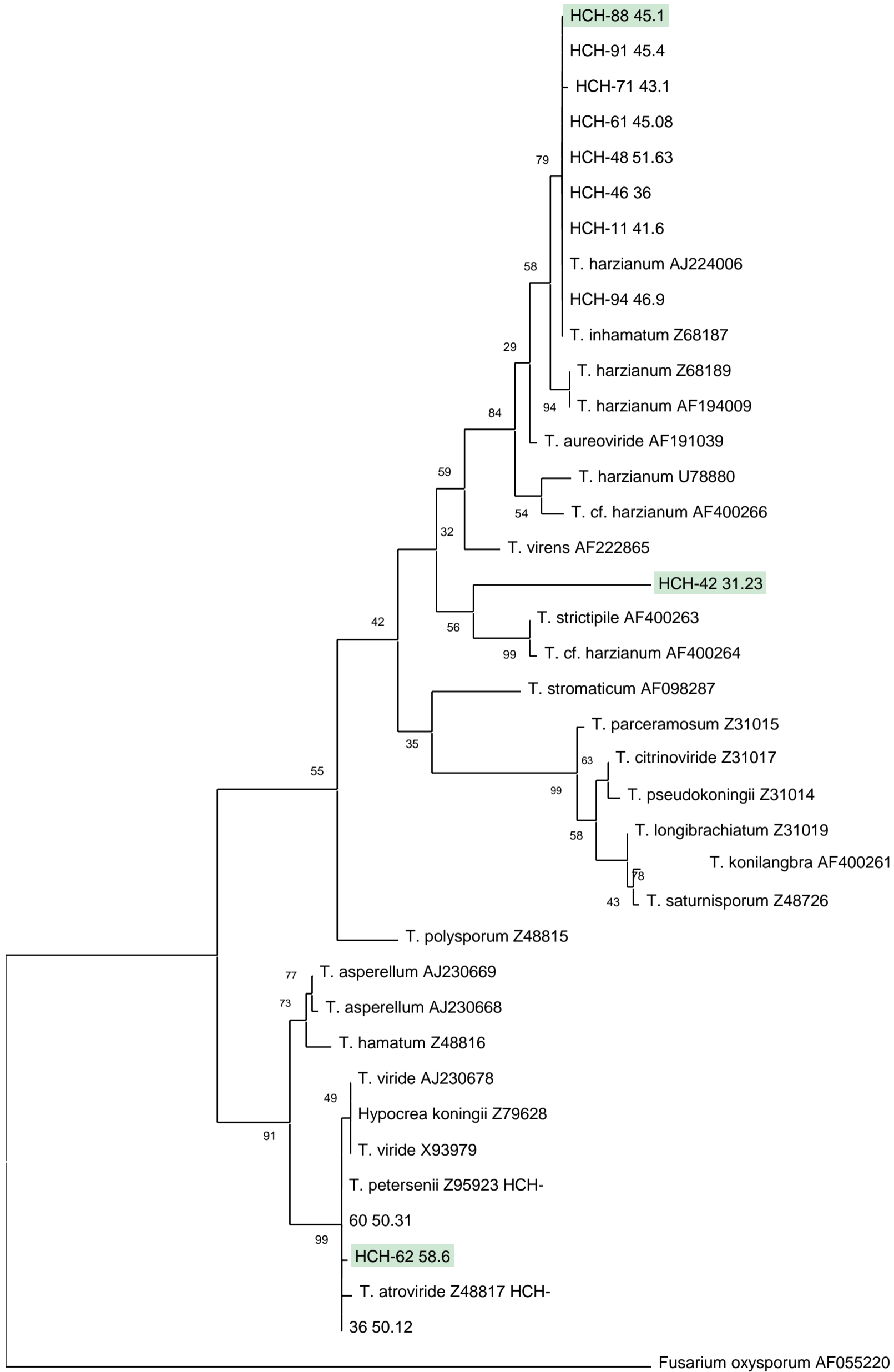
Figura 22. Evaluación preliminar de la concentración de zoosporas de *P. capsici* CPV-282.

4.- Estancia Altus Biopharm

Realicé una estancia profesional de un mes en la empresa Altus Biopharm ubicada en Zapopan, Jalisco. En donde tuve la oportunidad de desarrollar un proyecto para evaluar diversos productos de la empresa frente a patógenos de suelo y plantas.



5.- Análisis filogenético preliminar usando las regiones ITS 1 y 2 del ARN ribosomal



0.050