



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES



PROGRAMA PROFESIONALIZANTE DE MAESTRÍA  
EN PRODUCCION AGROPECUARIA

NUEVAS ALTERNATIVAS DE CONTROL  
BIOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* LEO.  
CAUSANTE DE LA MARCHITEZ EN  
EL CULTIVO DE CHILE (*Capsicum annuum* L.)

TESIS

PRESENTA:

ING. CARLA PAOLA QUINTO ALVAREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA  
CON OPCION TERMINAL AGRICOLA

Directores de Tesis:  
SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVÍA  
DRA EN AGRONOMIA

JOHN LARSEN  
DR. EN CIENCIA

Comité tutelar:  
YAZMÍN CARREÓN ABUD  
DOCTORA EN CIENCIAS AGRICOLAS Y FORESTALES

LUIS LOPEZ PEREZ  
DOCTOR EN BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

GERARDO RODRIGUEZ ALVARADO  
DR. EN FITOPATOLOGIA

Morelia, Michoacán, Marzo 2014.

---

# Nota al Lector

---

El Programa de Maestría en Producción Agropecuaria, sancionado por el H. Consejo Universitario con fecha 15 de Marzo de 2013; establece los lineamientos para su operación en su plan de estudios. Determinando en el artículo 28 de las reglas complementarias los requisitos para la obtención del grado que a la letra dice:

*Artículo 28. Requisitos para la obtención del grado. Se otorgará el grado de "Maestría en Producción Agropecuaria", con cualquiera de las siguientes opciones: "Agrícola", "Pecuaria", "Forestal", "Acuícola" o "Agronegocios" al alumno que cumpla con lo establecido en el artículo 71 del Reglamento General de Estudios de Posgrado y con los siguientes requisitos:*

a) *Haber cubierto la totalidad de los créditos.*

b) *Haber entregado y defendido el proyecto de Tesis el cual se define de la siguiente manera:*

*PROYECTO TERMINAL (TESIS). Es un informe académico que se deriva de los estudios realizados y, de acuerdo con el CONACYT (2006), es de carácter profesional, docente o empresarial, en el que el estudiante debe demostrar el dominio de las competencias adquiridas. Es un informe producto del trabajo que puede ser de carácter profesional, experimental o empresarial, según la modalidad escogida por el estudiante (ver Anexo 2), donde tiene que demostrar el dominio de las competencias adquiridas en el programa de la maestría y deberá responder a una problemática relacionada con el área y relevante en nuestro contexto a la cual contribuya a solucionar.*

A su vez el anexo 2 de dicho plan de estudios es más específico al explicar las alternativas para la realización del proyecto de tesis, como a continuación se describe:

## ANEXO 2

### *Alternativas para la realización del proyecto de tesis del PMPA*

*Debido a la diversidad de opciones y a los requerimientos de flexibilización de los planes de estudios de esta maestría, se plantean diferentes modalidades para el desarrollo del Proyecto de Tesis, el cual busca dar respuesta a las demandas del campo productivo, así como a los intereses y aptitudes del estudiante.*

*El objetivo de este anexo es clarificar las características generales de cada modalidad que sirvan de guía para a los Comités Revisores, conformados ad-hoc, quienes delimitarán los requisitos, exigencias, aspectos a abordar y los estándares mínimos de calidad requeridos. El proyecto de tesis podrá realizarse a través de alguna de las siguientes opciones:*

#### 1. ESTUDIO DE CASOS

*Es un análisis de una entidad, fenómeno o unidad social de naturaleza particularista, descriptiva y heurística, basada en el razonamiento inductivo. Es particularista porque se centra en una situación, evento o fenómeno específico, el cual en sí mismo es importante por lo que revela del fenómeno y lo que pueda representar. Es descriptivo, porque el producto final es una representación rica y densa del fenómeno a investigar y es heurística, porque ilumina la comprensión del lector del fenómeno objeto de estudio, lo que puede llevar a descubrir nuevos significados, ampliar la experiencia o confirmar lo que se sabe (Pérez, 2001). El estudio de casos puede ser de una empresa, de una actividad productiva, etc.*

*Los estudios de casos cualitativos son estudios que involucran la exploración detallada a lo largo de un período de tiempo, lo suficientemente extenso, que permita el entendimiento profundo del objeto de estudio y del contexto en que éste se ubica, por medio de métodos múltiples de recolección de datos y múltiples fuentes de información altamente contextualizadas (Cresswell, 1998). Es aplicable en innumerables campos donde se trate de combinar eficazmente la teoría y la práctica.*

#### 2. ESTUDIOS ECONÓMICOS

*Los estudios de este tipo son componentes importantes de la investigación acerca de la efectividad y establecimiento de políticas en los niveles federal, estatal y local en diversos tipos de sistemas educativos. Su*

---

*propósito es entender los efectos de reformas o políticas en relación con sus costos, contribuciones de la educación al crecimiento económico y al desarrollo, así como acerca del entorno no monetario en educación (Coombs, 1994).*

### 3. PROYECTOS DE DESARROLLO TECNOLÓGICO

*Estos proyectos involucran un proceso de cambio, por medio del cual se intenta alcanzar los objetivos de la actividad productiva con los más altos niveles de logro. Se caracterizan por realizar una descripción especializada de un caso, organizado de acuerdo con las líneas del posgrado. Los aspectos básicos que debe contener el análisis serán: describir el contexto situacional del caso, los principales factores involucrados, los conceptos que se aplican con base en las perspectivas disciplinares actuales, la explicación de los elementos que justifiquen el qué, cómo y cuándo de la problemática, la delimitación de la problemática analizada donde se deben definir sus fronteras e identificar los factores o variables que ocasionan obstáculos en el desarrollo de la institución; así como el análisis de las interrelaciones de los factores o variables seleccionadas.*

### 4. DISEÑO, DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS DE EVALUACIÓN Y MEDICIÓN PRODUCTIVA

*Consiste en el diseño, desarrollo y/o validación de un instrumento, técnica o estrategia de evaluación y/o medición, con sus propiedades, limitaciones y fortalezas reportadas; así como sus indicadores de confiabilidad y validez.*

### 5. PROGRAMAS DE PREVENCIÓN Y/O INTERVENCIÓN

*Consisten en el proyecto de atención, solución y/o prevención de problemas productivos, documentados a través de acciones que evidencien la adquisición de conocimientos, habilidades y actitudes durante el programa de estudio. Será necesario implementar el proyecto (aún en fases piloto o preliminares) y evaluar sus resultados.*

### 6. OTROS

*Cualquier otro proyecto propuesto del estudiante por el visto bueno de su asesor, aprobado por el Comité tutorial.*

Por tanto este documento podrá ser de la naturaleza descrita con antelación y con ello cumplir con el objetivo y el enfoque profesionalizante del programa.

***La Coordinación Académica del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria con opción terminal en la Áreas: Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola y Agronegocios.***



## Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales y al Programa Profesionalizante de Maestría en Producción Agropecuaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A mi directora de tesis, la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía por darme la confianza para la realización de esta investigación, por su invaluable respaldo y amistad, por haberme motivado a ingresar a la maestría, sin lo cual este momento no sería posible, por su apoyo absoluto y sus importantes aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A Dr. John Larsen mi Co-Director por todo su apoyo incondicional, por su dedicación, por la paciencia con la que me aconsejó y la enseñanza en la dirección del trabajo experimental.

A Fondos Mixtos que otorgó el financiamiento para el desarrollo de esta investigación, así como al Dr. Joaquín Qui, del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ) por el apoyo brindado.

Al Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF de la UMSNH por facilitarme la cepa de *Phytophthora capsici*, probada en esta investigación, al Dr. Gerardo, Nuria, Rosario y Marlene por todo su apoyo, colaboración, disponibilidad y sugerencias en el desarrollo del trabajo experimental.

A todos los miembros del Comité por sus valiosas aportaciones y correcciones al presente trabajo: Dr. Luis López Pérez, Dra. Yazmín Carreón Abud, Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado.

---

Al Laboratorio Agroecología del Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIECO) de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las facilidades para el desarrollo del experimento. A mis compañeros quienes estuvieron atentos apoyándome en el desarrollo del experimento, a Semiramis, Andrea, Dante, Omar, a los investigadores M.C. Miguel Nájera y Dr. Carlos González, gracias a todos de corazón.

A mis compañeras Ana Luisa Mora y Dinorah Quesada por el apoyo y los momentos compartidos.



## **Dedicatoria**

*A tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con lo mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para ti, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado,*

*Mi esposo José Carmen Rosas  
Mis hijas Frida y Salma Paola*

*Con todo mi cariño y amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento,*

*Mis padres Abraham y Consuelo*

*Dra. Sylvia Patricia F. P.*

*Dr. John Larsen*

*A mis hermanos Cesar, Abraham, David, Cecilia y Rodolfo.*

*A mis sobrinos*

*A Rafaela que desde el cielo me cuida*

*A los verdaderos amigos con quien espero contar siempre*



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales estados productores, superficie sembrada y valor de la producción de chile en México.....	3
<b>Cuadro 2.</b> Descripción de los tratamientos .....	20
<b>Cuadro 3.</b> Escala de índice de severidad de síntomas ocasionados por <i>P. capsici</i> .....	22



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de la enfermedad ocasionada por <i>Phytophthora capsici</i> .....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la quitina. ....	15
<b>Figura 3.</b> Desacetilación de la quitina para la obtención del quitosano. ....	16
<b>Figura 4.</b> Germinación de semillas de chile serrano en sustrato estéril.....	19
<b>Figura 5.</b> Inoculación del patógeno <i>Phytophthora capsici</i> en plantas de chile .....	21
<b>Figura 6.</b> Severidad de la enfermedad observada en plantas de chile, a) hoja con marchitamiento colapsadas, b) necrosis en tallos, c) pudrición de raíz.....	22
<b>Figura 7.</b> Raíces de chile en medio de cultivo Agar Harina de Maíz selectivo .....	24
<b>Figura 8.</b> Altura de plantas de chile el día de la inoculación con <i>P. capsici</i> (ALT1), y 23 días después de la inoculación (ALT2). Las plantas fueron sembradas en suelo estéril con productos alternativos de biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.....	26
<b>Figura 9.</b> Peso fresco de la parte aérea (PFPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de <i>P. capsici</i> . Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. ....	27
<b>Figura 10.</b> Peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de <i>P. capsici</i> . Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. ....	28
<b>Figura 11.</b> Peso fresco de la parte radicular (PFPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de <i>P. capsici</i> . Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente	

---

diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 29

**Figura 12.** Peso seco de la parte radicular (PSPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 29

**Figura 13.** Índice de severidad en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas con respecto el testigo positivo. .... 30

**Figura 14.** Síntomas de marchitez ocasionados por *P.capsici* en plantas de chile tratadas con productos alternativos para el biocontrol, 23 días después de la inoculación. .... 31

**Figura 15.** Severidad de la marchitez ocasionada por *P. capsici* en plantas de chile tratadas con productos alternativos para el biocontrol, 23 días después de la inoculación con el patógeno. .... 31

**Figura 16.** Porcentaje de infección de raíces de plantas de chile inoculadas con *P.capsici*, sembradas en diferentes tratamientos con productos alternativos para el biocontrol del patógeno. Las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=20. .... 32

**Figura 17.** Altura de plantas de chile el día de la inoculación con *P. capsici* (ALT1), y 17 días después de la inoculación (ALT2). Las plantas fueron sembradas en suelo estéril con productos alternativos de biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 33

**Figura 18.** Índice de severidad en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno. .... 34

**Figura 19.** Síntomas de marchitez en plantas de chile 13 días después de inoculadas con *P. capsici*, utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno. ... 35

**Fig. 20.** Altura de plantas de chile el día de la inoculación con *P. capsici* (ALT1), y 21 días después de la inoculación (ALT2). Las plantas fueron sembradas en suelo no estéril con productos alternativos de

biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 36

**Figura 21.** Peso fresco de la parte aérea (PFPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 37

**Figura 22.** Peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 21 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 38

**Figura 23.** Peso fresco de la parte radicular (PFPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 21 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 39

**Figura 24.** Peso seco de la parte radicular (PSPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 21 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6. .... 39

**Figura 25.** Índice de severidad en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas con respecto al testigo positivo. .... 40

**Figura 26.** Síntomas de marchitez ocasionados por *P.capsici* en plantas de chile tratadas con productos alternativos para el biocontrol, 21 días después de la inoculación. .... 41

**Figura 27.** Porcentaje de infección de raíces de plantas de chile inoculadas con *P.capsici*, sembradas en diferentes tratamientos con productos alternativos para el biocontrol. Los tratamientos con letras distintas



son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6..... 41

**Figura 28.** Colonias de *P. capsici* obtenidas en medio selectivo, a partir de raíces de chile inoculadas y sometidas a diferentes tratamientos alternativos de biocontrol del patógeno. .... 42



## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. El cultivo del chile.....	2
2.1.1. Importancia.....	2
2.1.2. Enfermedades en el cultivo de chile .....	3
2.2. Marchitez del chile.....	5
2.2.1. Importancia y distribución de <i>Phytophthora capsici</i> .....	5
2.2.1.1. Posición taxonómica de <i>Phytophthora capsici</i> .....	6
2.2.1.2. Características de <i>P. capsici</i> .....	6
2.2.1.3. Síntomas.....	8
2.2.1.4. Ciclo de la enfermedad .....	8
2.3. Manejo .....	10
2.4. Manejo de <i>Phytophthora capsici</i> .....	10
2.4.1. Manejo químico .....	10
2.5. Manejo biológico .....	11
2.5.1. Microorganismos antagonistas .....	12
2.5.1.1. <i>Trichoderma</i> spp: .....	13
2.5.1.2. <i>Trichoderma harzianum</i> .....	13
2.5.2. Derivados de microorganismos de control biológico o polímeros utilizados en el biocontrol.....	14
2.5.2.1. Quitina.....	15
2.5.2.2. Quitosano.....	16

---

3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Material vegetal.....	18
5.2. Trasplante a macetas.....	19
5.3. Material biológico (Patógeno).....	19
5.4. Tratamientos .....	20
5.6 . Inoculación con el patógeno <i>P. capsici</i> .....	21
5.7. Diseño experimental.....	21
5.8. Determinación del índice de severidad de la marchitez en plantas de Chile.....	22
5.9. Registro de variables agronómicas .....	23
5.9.1. Altura de la planta.....	23
5.9.2. Peso fresco de la raíz y la parte aérea .....	23
5.9.3. Peso seco de la raíz y la parte aérea .....	23
5.9.4. Porcentaje de infección de las raíces por <i>P. capsici</i> .....	24
5.10. Análisis estadístico .....	25
6. RESULTADOS .....	26
6.1 Experimento 1 .....	26
6.1.1. Altura de la planta.....	26
6.1.2. Peso fresco de la parte aérea.....	27
6.1.3. Peso seco de la parte aérea .....	27
6.1.4. Peso fresco de la parte radicular .....	28
6.1.5. Peso seco de la parte radicular .....	29
6.1.6. Severidad de la enfermedad.....	30
6.1.7. Porcentaje de infección de las raíces por <i>P. capsici</i> .....	31

---

6.2. Experimento 2 .....	32
6.2.1. Altura de la planta.....	32
6.2.2. Severidad de la enfermedad.....	33
6.3. Experimento 3 .....	36
6.3.1. Altura de la planta .....	36
6.3.2. Peso fresco de la parte aérea .....	37
6.3.3. Peso seco de la parte aérea .....	37
6.3.4. Peso fresco de la parte radicular .....	38
6.3.5. Peso seco de la parte radicular.....	39
6.3.6. Severidad de la enfermedad.....	39
6.3.7. Porcentaje de infección de las raíces por <i>P. capsici</i> .....	41
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES .....	47
9. LITERATURA CITADA .....	48
Anexos .....	54



## RESUMEN

Existen diferentes productos que han funcionado en el biocontrol de *Phytophthora* en otros países sin embargo, en México estos no han sido probados. El objetivo de este estudio fue evaluar los productos alternativos quitina, quitosano y *Trichoderma harzianum*, individualmente y en combinación para el control biológico de *Phytophthora capsici* en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L). var. Camino Real.

Para los experimentos se seleccionaron plantas con cuatro hojas verdaderas, y se trasplantaron a macetas de 1 L conteniendo una mezcla de sustrato estéril y no estéril (turba, vermiculita, arena 3:1/2:1). Durante los experimentos las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero. Se realizaron tres experimentos. En el experimento 1 las plantas fueron trasplantadas a los 36 días; en el experimento 2 a los 48 días; y en el experimento 3 a los 55 días. En el experimento 1 se aplicaron los tratamientos antes del trasplante: *T. harzianum*, quitina, quitosano y las combinaciones *T. harzianum*-quitina y *T. harzianum*-quitosano. En los experimentos 2 y 3 los mismos tratamientos se aplicaron después del trasplante. Se incluyeron un testigo negativo (sin *P. capsici*) y un testigo positivo (con *P. capsici*). Cada tratamiento tuvo seis repeticiones. Las plantas fueron inoculadas con *P. capsici* (50,000 zoosporas/planta) 15 días después del trasplante. Los síntomas de marchitez en las plantas fueron evaluados 6, 13 y 20 días después de la inoculación de *P. capsici* en los experimentos 1 y 2, y a los 5, 12 y 21 días en el experimento 3. Las plantas de los experimentos 1 y 3 fueron cosechadas y se evaluaron el desempeño vegetal en términos de altura de la planta, peso fresco y seco parte aérea, peso fresco y seco de la parte radicular así como la severidad de la enfermedad y el porcentaje de raíces infectadas.

Los resultados mostraron que la aplicación de quitina sola y en combinación con *T. harzianum* favorecieron el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici*. La aplicación de quitina antes de la inoculación del patógeno causó una reducción en la altura de la planta. Fue posible recuperar el patógeno de raíces infectadas utilizando medio selectivo, corroborándose que funcionó satisfactoriamente el patosistema *P. capsici*-chile serrano utilizado en este

---

estudio. De manera general ninguno de los productos biológicos controlaron la enfermedad causada por *P. capsici* en plantas de Chile. Por el contrario, se observó que quitina favoreció el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici*.

**Palabras clave:** Control biológico, *Trichoderma harzianum*, quitina, quitosano.



## ABSTRACT

Several products have worked in the biocontrol of *Phytophthora* worldwide, but until now they have not been tested in Mexico. The objective of this work was to evaluate the alternative products chitin, chitosan and *Trichoderma harzianum* for the biocontrol of *Phytophthora capsici* individually and in combination, in serrano chili pepper plants (*Capsicum annum* L.) cv. Camino Real.

For the experiments plants with four true leaves were selected and were transplanted to 1 L pots containing a mixture of sterile substrate and non sterile (peat moss, vermiculite, sand, 3: 1/2: 1). During the experiments the plants were maintained under greenhouse conditions. Three experiments were carried out. In the experiment 1 the plants were transplanted at 36 days; in the experiment 2 at 48 days; and in the experiment 3 at 55 days. In the experiment 1 the treatments were applied before the transplant: *T. harzianum*, chitosan, chitin and the combinations *T. harzianum*-chitin and *T. harzianum*-chitosan. In the experiments 2 and 3 the treatments were applied after the transplant. A negative control (without *P. capsici*) and a positive control (with *P. capsici*) were included. Each treatment had six replicates. The plants were inoculated with *P. capsici* (50, 000 zoospores / plant) 15 days after the transplant. Wilting symptoms in the plants were evaluated at 6, 13 and 20 days after the inoculation with *P. capsici* in the experiments 1 and 2, and at 5, 12 and 21 days in the experiment 3. Plants were harvested in exp. 1 and exp. 3 and examined in terms of plant height, shoot fresh and dry weight, root fresh and dry weight, as well as disease severity and *P. capsici* root infection levels.

The results showed that the application of chitin alone and in combination with *T. harzianum* favored the development of the disease caused by *P. capsici*. The application of chitin before the inoculation of the pathogen caused a reduction in plant height. It was possible to recover the pathogen of infected roots using selective media, corroborating that the pathosystem *P. capsici*- serrano pepper used in this study worked satisfactory. In general none of the biological products controlled the disease caused by *P. capsici* in chili pepper plants and on the contrary it was observed that the organic compound chitin favored the development of the disease caused by *P. capsici*.

**Key words:** Biological control, *Trichoderma harzianum*, chitin, chitosan.

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades que afectan al cultivo del chile, la “marchitez del chile” causada por *P. capsici* Leo., es la más importante por su capacidad destructiva; puede ocasionar pérdidas económicas hasta del 100% de la superficie cultivada. Este oomiceto es particularmente destructivo cuando hay exceso de humedad en el suelo por irrigación o lluvia pesada, y se considera como el causante de la reducción de la superficie cultivada (60%) en los estados de Aguascalientes, Guanajuato y San Luis Potosí (Santos-Juárez, 2010). La pudrición del cuello y la subsiguiente marchitez son los síntomas más característicos.

Dada la importancia de esta enfermedad para los productores de chile, se han intentado varias alternativas de control como uso de variedades resistentes, control químico y utilización de bioplaguicidas, ninguna hasta el momento con resultados completamente satisfactorios (Bautista-Calles *et al.*, 2010; Santos-Juárez, 2010). Los patógenos de suelo en general, han sido controlados con tratamientos preventivos aplicados al terreno. Los productos utilizados son altamente tóxicos y dañinos al ambiente. Anteriormente era frecuente el uso de bromuro de metilo para esterilizar el suelo (Cruz-A y Cisterna-O, 1998) que actualmente está restringido a nivel mundial por tener antecedentes de efecto cancerígeno. El mfenoxam para el control de *P.capsici* es utilizado de manera frecuente pero su eficacia es baja (Hausbeck y Lamour, 2004).

Actualmente existen en el mercado diferentes insumos orgánicos para el control de *Phytophthora* en hortalizas, principalmente en tomate (Lárez-Velasquéz, 2008). Estos insumos incluyen hongos y bacterias antagonistas, como son *Trichoderma* y *Bacillus*, con resultados que varían en su efectividad, principalmente por la falta de investigación relacionada con la adecuada transferencia de tecnología (Ezziymani *et al.*, 2007; Santos-Juárez, 2010).

En diferentes países se han hecho investigaciones con otras alternativas para el control biológico de enfermedades de raíz en hortalizas, empleando

diferentes formulaciones de quitina y quitosano con resultados muy alentadores (Benhamou *et al.*, 1998; Abd-El-Kareem *et al.*, 2006; Lárez-Velásquez, 2008; El Hadrami *et al.*, 2010).

Sin embargo, en México el uso de estos compuestos y de agentes de control biológico es limitado ya que hacen falta estudios para transferir estas tecnologías a nivel de campo y para los productores del estado de Michoacán. El objetivo de este trabajo es determinar la eficacia de alternativas de control biológico para el manejo de la marchitez del chile que han resultado exitosas en otros países.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. El cultivo del chile**

#### **2.1.1. Importancia**

Uno de los cultivos hortofrutícolas de mayor importancia económica y social en nuestro país es el chile. En esta especie existe una gran diversidad genética en un amplio número de variedades y tipos de chiles como son el serrano, jalapeño, ancho, pasilla, guajillo y de árbol entre otros. Este cultivo se siembra en la mayoría de las condiciones agroecológicas de nuestro país. En el Golfo se cultivan los chiles serranos y jalapeños; en la mesa central los chiles mulato, miahuateco y carricillo; en la zona del Bajío el ancho, mulato y pasilla; en el Sureste de México se siembra habanero; en el Norte-Centro el chile mirasol, ancho y pasilla; y en la región Noroeste chiles de exportación como el morrón, Anaheim, Caribe, Güero, etc. (Pérez, *et al.*, 1990). En 2010 se sembró una superficie total de 148,759.08 has, de las cuales se obtuvieron 2,335,560.28 toneladas de chile en México (SIAP-SAGARPA, 2010). Ubicando a México como el principal exportador y segundo productor de chile a nivel mundial. Los principales estados productores de chile en México son: Sinaloa, Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí, Tamaulipas, Sonora y Michoacán, éste último ocupa el séptimo lugar a nivel nacional con una producción de 67,671. 53

toneladas (SIAP-SAGARPA, 2010). Estas entidades concentran más del 50% de la superficie sembrada y cosechada, así como el 60% de la producción. Además, estos estados cuentan con una gran inversión en infraestructura y tecnología agrícola, que se refleja en su producción (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales estados productores, superficie sembrada y valor de la producción de chile en México (SIAP, 2010).

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA (ha)	PRODUCCIÓN (Ton/ha)
SINALOA	17,191.02	618,110.17
CHIHUAHUA	25,463.32	545,828.10
ZACATECAS	36,321.0	288,796.19
SAN LUIS POTOSI	15,080.0	184,852.50
TAMAHULIPAS	2,604.0	85,456.0
SONORA	2,707.0	79,220.34
MICHOACÁN	2,710.50	67,671.53
OTROS	46,678.24	465,622.45
<b>TOTAL</b>	<b>148,759.08</b>	<b>2,335,560.28</b>

El chile se cultiva desde 0 hasta 2500 m de altitud y sus frutos se encuentran en el mercado todo el año para consumo fresco, seco o industrializado (Pozo *et al.*, 1991). Los frutos de *C. annuum* son una fuente importante de capsicinas (compuestos orgánicos cíclicos que proporciona la pungencia), y se usan para la producción de cosméticos, esencias, medicinas, elaboración de salsas, en curtidos, etc.

### 2.1.2. Enfermedades en el cultivo de chile

La producción de chile se ve afectada por patógenos en todas sus etapas fenológicas, ocasionando pérdidas en el rendimiento que pueden llegar hasta el

100%. Entre los patógenos más importantes encontramos a las bacterias, hongos, oomicetos y virus (Santos-Juárez, 2010).

Las enfermedades bacterianas que se reportan afectando el cultivo del chile son: cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), cancro del tallo y pedúnculo (*E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi*), marchitez (*Ralstonia solanacearum*) y marchitez de plántulas y manchas foliares causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Santos-Juárez, 2010).

Entre los hongos y oomicetos reportados se incluyen los siguientes: antracnosis en tallos y frutos (*Colletotrichum capsici*, *C. gloesporioides*, *C. acutatum*), manchas foliares (*Cercospora capsici*, *C. melongenae*), damping off (*Pythium* sp.; *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.), pudrición de frutos (*Alternaria alternata*, *C. capsici*, *C. coccodes*, *C. gloesporioides*, *C. acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*), marchitez (*Phytophthora capsici*, *Fusarium* sp.), mancha gris (*Stemphyllium solani*, *S. lycopersici*) y manchas foliares (*Alternaria* sp., *Septoria melongenae*, *Cercospora* sp.) (Seminis, 2006).

Las enfermedades causadas por virus al cultivo son: el Virus del mosaico del tabaco (TMV- Tobacco Mosaic Virus), Virus moteado del pimiento (PMV o PMMV- Pepper Mottle Virus), Virus del bronceado del tomate (TSWV-Tomato Spotted Wilt Virus), Virus del enchinamiento (BCTV- Beet Curly Top Virus), Virus Y de la papa (PVY-Potato Virus Y), Virus mosaico de la alfalfa (AMV- Alfalfa Mosaic Virus), Chilli Veinal Mottle Virus (ChiVMV), Virus mosaico del pepino (CMV-Cucumber Mosaic Virus), Virus moteado del chile (PepMoV- Pepper Mottle Virus), Virus del moteado amarillo del chile (PepYMV- Pepper Yellow Mottle Virus), Virus X de la papa (PVX- Potato Virus X), Virus jaspeado del tabaco (TEV-Tobacco Etch Virus), Virus mosaico del tomate ((ToMV- Tomato Mosaic Virus), Virus de la yema necrótica del cacahuete (PBNV- Peanut Bud Necrosis Virus) (Seminis, 2006).

## 2.2. Marchitez del chile

### 2.2.1. Importancia y distribución de *Phytophthora capsici*

El primer reporte de la marchitez asociada a *Phytophthora capsici* L. fue descrito por Leonian en 1922 en chile morrón (*Capsicum annum*) en Nuevo México, EEUU (Erwin y Ribeiro, 1996). En México se reportó por primera vez por Galindo en 1956, atacando plantaciones de chile en los campos de la E.N.A., Chapingo, México y pueblos aledaños (Romero, 1993). En Michoacán, el primer reporte que se tiene de la presencia de *P. capsici* provocando la pudrición del fruto del jitomate corresponde a la región de Tacámbaro (Fernández *et al.* 2003). Varias investigaciones indican que la enfermedad afecta entre el 10 y 60 % del cultivo (Pérez *et al.*, 1990), pero puede afectar su totalidad en regiones como el Bajío y Puebla. Pernezny *et al.*, (2003) reportan que este oomiceto causa un 40% en pérdidas en la producción, provocando la reducción de la superficie cosechada en algunas regiones productoras de México. En un estudio regional de enfermedades del chile en el sur de Chihuahua encontraron que las pérdidas oscilan del 5.3 al 32% (Guigón y González, 2001). En los años 80's *P. capsici* fue el principal problema fitosanitario, responsable de hasta un 40% de pérdidas en rendimiento, originando el desplazamiento del cultivo a zonas libres del patógeno (Pozo, 1983). González *et al.* (2002) muestrearon plantas de chile con síntomas de marchitez en siete estados de la República Mexicana y determinaron que 65% de las muestras se asociaron a *Fusarium* sp., 33% a *Rhizoctonia solani* y 33% a *P. capsici*. Este último además de afectar chile puede atacar otros cultivos como frutales, pimienta negra, cacao, tomate, chayote, ciruela, algodón, pepino, calabaza, etc. Se ha reportado en Argentina, Bolivia, Brasil, China, EEUU, España, Francia, Irán, Italia, Japón, Korea, Puerto Rico, Serbia, Tailandia, Taiwán y Venezuela (Erwin y Ribeiro, 1996).

#### 2.2.1.1. Posición taxonómica de *Phytophthora capsici*

Dominio: Eucariota

Reino: Stramenipila

Phyllum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. capsici*

(Erwin y Ribeiro, 1996).

#### 2.2.1.2. Características de *P. capsici*

*P. capsici* es una especie heterotálica, forma estructuras sexuales (oogonios y anteridios) y estructuras asexuales (esporangios que producen zoosporas) (Erwin y Ribeiro, 1996). Los oogonios son esféricos con anteridios anfíginios, que al ser fertilizados producen oosporas pleróticas. El tamaño de los órganos sexuales varía según el aislado o cepa. En medio de cultivo se pueden producir oosporas cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se aparean. Los esporangióforos se producen en un simpodio simple. Los esporangios son papilados y variables en forma y tamaño. Las formas más comunes de los esporangios son ovoide y elipsoide, con bases redondeadas; sin embargo, formas irregulares, pedicelos laterales y papilas múltiples pueden presentarse. El tamaño de los esporangios es de aproximadamente 57 x 32 µm con una relación de largo por ancho cercana a 1.8. Los esporangios son caducos y portan pedicelos típicamente largos. Generalmente no presentan hifas hinchadas o clamidosporas. Los cultivos de esta especie crecen bien a 35 °C (Erwin y Ribeiro, 1996).

*P. capsici* tiene una alta capacidad de infección y se dispersa principalmente por el suelo a través de los canales de riego o debido a lluvias que provocan un salpicado sobre las plantas (Li *et al.*, 2007). *P. capsici* tiene la capacidad para producir una enfermedad policíclica. Las etapas iniciales de infección son biotróficas ya que a menudo no muestran síntomas. Dependiendo de la temperatura, existe un retraso de 24 h antes de que las primeras lesiones necróticas sean visibles. Aunque *P. capsici* es considerado como un patógeno del suelo, puede existir una abundante producción de zoosporas por encima del suelo. Frutos infectados pueden ser considerados como agentes de dispersión, ya que solamente requieren de lluvia o agua de riego para que ocurra una dispersión masiva de zoosporas (Lamour, 2009). Se ha observado en laboratorio que la dispersión de los esporangios de *P. capsici* ocurre en agua por fuerza capilar, pero no ocurre en respuesta al viento o la reducción de la humedad relativa. Estas observaciones en laboratorio y el muestreo volumétrico de esporas en campo indican que la dispersión de esporangios por medio de corrientes de viento es infrecuente y que es poco probable que sean dispersados de manera natural entre los campos de cultivo por acción del viento únicamente (Granke *et al.*, 2009).

*P. capsici* ataca solanáceas como el chile, el tomate y la berenjena, y cucurbitáceas como el pepino, la calabaza, y el melón, alrededor del mundo (Lamour, 2009). En muchas áreas, las epidemias más graves ocurren durante los meses cálidos y en la época de lluvias (Lamour, 2009), factores ambientales que favorecen el desarrollo de este oomicete.

Agrios (2001) señala que la formación de las zoosporas puede estimularse *in vitro* cuando se incuba un cultivo con esporangios durante pocos minutos a temperaturas entre 5 y 10 °C. La exposición más prolongada a estas temperaturas (10 – 15 minutos) provoca que las zoosporas sean liberadas, lo cual constituye la forma de germinación indirecta de estos oomicetes.

#### 2.2.1.3. Síntomas

*P. capsici* puede infectar las raíces, flores, tallos, hojas y frutos del chile provocando el tizón foliar, la pudrición de frutos y la pudrición de raíz y tallo (Erwin y Ribeiro, 1996), en cualquier etapa de desarrollo de las plantas.

Las plantas afectadas por el patógeno con frecuencia empiezan a mostrar síntomas de marchitamiento, clorosis de hojas y resquebrajamiento de tallo debido principalmente a la falta de agua y deficiencia nutricional, se debilitan y se vuelven susceptibles al ataque de otros patógenos que aunados a otras causas, conducen a la muerte de las plantas (Agrios, 2001).

El ataque por *Phytophthora* puede ocasionar daños severos durante los períodos de fuertes lluvias. El patógeno se puede extender rápidamente al resto del campo de cultivo, ocasionando pérdidas severas en un corto espacio de tiempo (Bustamante, 1986). Frecuentemente el oomicete ataca inicialmente a nivel del cuello de la planta, lo que afecta la circulación de la savia, y la planta se marchita rápidamente de manera irreversible pero sin amarillamiento. Otras veces, la infección primaria es a nivel de raíces, por lo que no se observan síntomas claros (Jaramillo, 2003).

Por otra parte, esta enfermedad ataca tallos, flores y frutos en plantas adultas, principalmente por el salpique del agua de lluvia o riego que llevan el inóculo a la parte superior de la planta provocando infecciones en estas partes de las plantas cuando la humedad relativa es alta (Jaramillo, 2003).

#### 2.2.1.4. Ciclo de la enfermedad

*P. capsici* es un habitante del suelo que se vuelve parasítico en presencia de hospedantes susceptibles. Además, puede sobrevivir como saprófito, en tejidos infectados con descomposición lenta. También puede sobrevivir en el suelo como esporas resistentes (oosporas) o permanecer latente en forma de micelio en las raíces de las plantas infectadas e incluso en la parte aérea. Una vez que estos microorganismos son introducidos en el suelo, son capaces de

permanecer hasta 15 meses en el suelo húmedo en ausencia de plantas. Cuando se siembran plantas susceptibles en suelo infestado con *P. capsici*, el micelio se propaga hacia el tallo con mayor rapidez a nivel de la región cortical (Fig. 1), dando como resultado la decoloración y colapso de las células de esa zona. Más tarde, el micelio se desarrolla entre las células medulares del tallo, pero rara vez se le encuentra en el sistema vascular (Newsham *et al.*, 1995). El micelio crece a través del tallo y llega a la superficie del suelo. Una vez que tiene lugar la infección del tallo, el oomicete produce esporas en los tejidos del tallo infectado, que son entonces transportadas por las salpicaduras del agua de la lluvia a las plantas cercanas (Fig. 1). Las ramas más bajas de las plantas próximas pueden también ser afectadas sobre todo por la parte de abajo. Esporas nuevas son producidas en las nuevas plantas infectadas y la infección puede avanzar en un plazo corto (Erwin *et al.*, 1983).

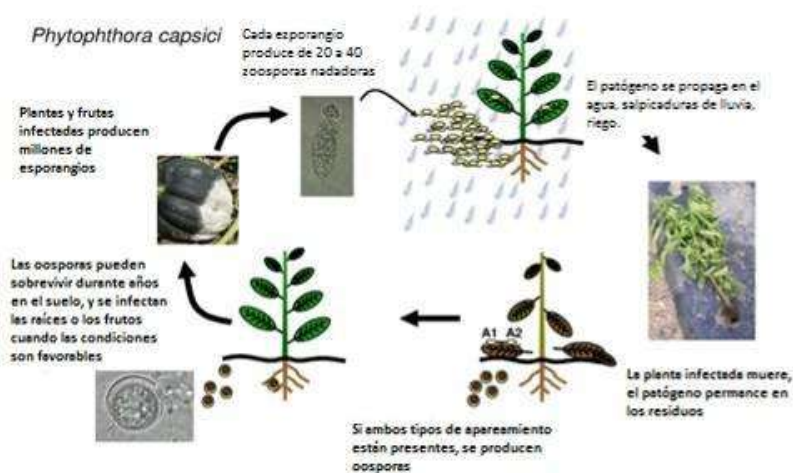


Figura 1. Ciclo de la enfermedad ocasionada por *Phytophthora capsici*  
<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/images/BIO/PHYTlifcycle.jpg>

Cuando el micelio alcanza las partes aéreas de las plantas, produce esporangióforos que emergen a través de las hojas y el tallo y se proyectan al exterior. Los esporangios que se producen en los esporangióforos se desprenden y son diseminados por la lluvia o bien son llevados por las corrientes de aire cuando han llegado a la madurez (Fig. 1). Al depositarse

sobre plantas de jitomate, los esporangios germinan y producen nuevas infecciones (Agrios, 2001).

El desarrollo de la enfermedad depende de las condiciones ambientales y de la cantidad de inóculo presente en el suelo. En época seca, con tiempo soleado y riego rodado que genere un nivel freático alto favorece la producción de esporangios y su posterior invasión de las plantas (Jaramillo, 2005). En cultivos bajo riego, el factor más importante para el desarrollo de la enfermedad es la humedad en el área cercana a la base del tallo. La producción de esporangios en tejidos infectados ocurre en suelos cuyos contenidos de humedad varían entre la capacidad de campo y el punto de saturación. El riego se considera uno de los principales medios de dispersión, porque facilita la diseminación de las zoosporas (Judelson y Blanco, 2005).

### **2.3. Manejo**

Las principales medidas de manejo se orientan a prácticas agronómicas, entre estas sobresalen la destrucción de fuentes potenciales de inóculo, como residuos de cosecha, solarización del suelo, aumento de la altura del surco, rotación de cultivos, manejo adecuado del agua de riego, uso de variedades resistentes. Se han encontrado cultivares que toleran mayores niveles de humedad sin ser afectados por *P. capsici* (Bustamante, 1999). También se usan microorganismos benéficos y agroquímicos inductores de resistencia

### **2.4. Manejo de *Phytophthora capsici***

#### **2.4.1. Manejo químico**

Para el control de *Phytophthora* se han utilizado principalmente agroquímicos por considerarse una de las medidas más efectivas y rápidas. En general,

varios autores reportan que este tipo de control no es efectivo y tiene un elevado costo. A nivel experimental se han probado aplicaciones con cloropicrina, cambios de pH por adición de sulfato, seguido por aplicaciones de cal y de urea, donde se ha logrado cierta reducción de la enfermedad. El uso de productos químicos como fosetyl-aluminio o ácido beta amino butírico (BABA) pueden inducir resistencia al incrementar la capacidad de la planta para sintetizar capsidiol así como glucanasas y quitinasas (Bustamante, 1999). El mefenoxam para el control de *P. capsici* es utilizado de manera frecuente pero su eficacia es baja (Hausbeck y Lamour, 2004). Así mismo, se observó que hay cierto grado de control con la aplicación de cal hidratada al suelo. También se han encontrado que los fungicidas como Captan, Maneb, Mancozeb y Thiram, mostraron efecto biocida en diferentes concentraciones, pero también presentaron fitotoxicidad (Chen *et al.*, 2006; Rinaudo, 2006). Actualmente, el uso de agentes químicos para el control de microorganismos fitopatógenos es muy cuestionado. Los graves daños al medio ambiente debido al uso desmedido de productos sintéticos ha llevado a considerar otras opciones de control. Entre estas se considera al control biológico como aquella que presenta mayores ventajas con respecto a los agroquímicos.

## 2.5. Manejo biológico

El control biológico ha sido definido por Baker y Cook (1974) como “la reducción de la densidad del inóculo o de la actividad productora de enfermedad, de un patógeno en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o artificial”. El control de hongos fitopatógenos utilizando microorganismos antagónicos, como se ha definido en su forma clásica se basa en la acción antifúngica de bacterias, hongos y actinomicetos, provenientes del suelo, conocidos con el nombre de hiperparásitos o micoparásitos (Ahmad y Baker, 1987; Baker *et al.*, 1984; Chet, 1990 y Strashnov, 1985). En el control biológico se utilizan las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus

hospederos o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980). El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente y no presenta problemas de residuos. Sin embargo, los resultados disponibles han sido obtenidos mayormente “*in vitro*” y bajo condiciones controladas. No obstante se van incrementando los trabajos de investigación en los diferentes países del mundo. Anteriormente, el control biológico de enfermedades vegetales consideraba el uso exclusivo de organismos vivos para contrarrestar a los organismos patógenos; sin embargo, esta definición ha sido extendida a derivados de organismos e incluso a compuestos químicos que pueden mimetizar o disparar respuestas en la planta. Actualmente se pueden considerar 3 tipos principales de control biológico de acuerdo a su mecanismo de acción:

- 1.- Microorganismos antagonistas,
- 2.-Inductores de mecanismos de defensa vegetal.
- 3.-Fortalecedores o precursores de la actividad antagonica u organismos benéficos.

### **2.5.1. Microorganismos antagonistas**

Los microorganismos antagonistas de control biológico o biocontrol (MOB) pueden ser: hongos, oomicetos, estreptomicetos, bacterias y virus, dependiendo del patógeno a combatir su efectividad ha sido mayor o menor, destacando de manera importante los hongos. El principal representante de este tipos de microorganismos lo encontramos con diferentes especies del género *Trichoderma* sp. Existen varias especies de *Trichoderma*, que pueden colonizar las raíces de las plantas, además de que ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así aprovechar esta

fuelle de alimento. Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982).

#### 2.5.1.1. *Trichoderma* spp:

Es utilizado en la agricultura como agente de control biológico debido a sus propiedades como biopesticida, biofertilizante y bioestimulante. Existen varias especies de *Trichoderma* con muchas características que los diferencian, poseen facilidades para colonizar las raíces de las plantas. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: 1. Competencia directa por el espacio o por los nutrientes (Belanger *et al.*, 1995; Chet y Ibar, 1994; Elad y Baker, 1985; Elad y Chet, 1987), 2. Producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet *et al.*, 1997; Sid-Ahmed *et al.*, 2000; Sid Ahmed *et al.*, 2003) y 3. Parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Ezziyyani *et al.*, 2003; Yedidia *et al.*, 1999).

#### 2.5.1.2. *Trichoderma harzianum*

Es un hongo antagonista de patógenos vegetales que se encuentra presente en la mayoría de los suelos. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Algunas cepas, son capaces de colonizar y crecer en las raíces a medida que éstas se desarrollan. Su aplicación, una vez formulado el producto, es fácil, pues puede añadirse directamente a las semillas o al suelo, semilleros, trasplantes, en charolas y macetas, empleando cualquier método convencional. *T. harzianum* tiene excelentes propiedades para el control biológico, siendo especialmente efectiva contra *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium*. A su vez, es un excelente estimulador

del crecimiento radicular. Su uso comercial como biofungicida ha sido ampliamente estudiado (Chet, 1990). Aunque también se distinguen varias especies de *Trichoderma*: *T. hamatum*, *T. viridae*, *T. harzianum*, *T. koningue* y *T. polyspermun*, en el control de hongos fitopatógenos (Chet, 1990).

García *et al.*, (2006) observaron que una cepa de *T. harzianum* tuvo capacidad antagónica contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp., *Plasmodiophora brassicae* y *Phytophthora* sp. Con la cual lograron reducciones de la incidencia de las enfermedades en más del 25% en la región Andina de Venezuela. Ezziyyani *et al.*, (2004) observaron que *T. harzianum* funciona como un biofungicida contra *P. capsici in vitro* sin embargo, Sid-Ahmed *et al.*, (2003) reportan que *T. harzianum* no fue capaz de detener el desarrollo de la enfermedad en plantas de chile solo o en combinación con quitina.

### **2.5.2. Derivados de microorganismos de control biológico o polímeros utilizados en el biocontrol.**

El uso de microorganismos ya sea parasitarios, depredadores o antagonistas ha sido la principal premisa del control biológico. Sin embargo, actualmente del conocimiento básico generado de los estudios de la interacción planta-patógeno, mecanismos de patogénesis y mecanismos de defensa vegetal, el control biológico se ha visto fortalecido con nuevos compuestos y moléculas que son derivados de los microorganismos de control biológico (MOB), o incluso moléculas señal de la propia planta. Entre estas moléculas destacan los polímeros como la quitina y su derivado el quitosano, que en la actualidad por sus propiedades como inductores de mecanismos de defensa vegetal o potenciadores de la actividad antagónica de MOB, además de su inocuidad para la salud humana y el medio ambiente, han surgido como fuertes candidatos para sustituir de manera efectiva productos químicos tóxicos y contaminantes.

### 2.5.2.1. Quitina

La quitina es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, del resistente exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos e insectos) y algunos órganos de otros animales. La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina) unidas entre sí con enlaces  $\beta$ -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. Así, puede pensarse en la quitina como en celulosa con el grupo hidroxilo de cada monómero reemplazado por un grupo de acetilamina (Fig. 2).

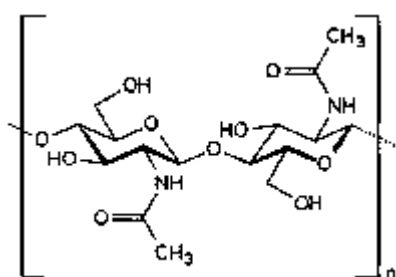


Figura 2. Estructura química de la quitina.

Es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa. Es usado como agente floculante para tratamiento de agua, como agente para curar heridas, como espesante y estabilizador en alimentos y medicamentos, como resina de intercambio iónico. Se sabe que los primeros mexicanos usaban preparaciones derivadas de hongos para acelerar la cicatrización de heridas y que los coreanos primitivos usaban quitina, proveniente de la pluma de calamar, para favorecer la curación de abrasiones corporales (Goodman, 1989). Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula. La quitina se vuelve soluble en ácidos inorgánicos diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosano. Se ha demostrado que la quitina se ha utilizado en combinación con otros microorganismos o productos de control biológico para combatir patógenos que causan serias enfermedades en la agricultura. Hirano, (1978); Mc Cormick *et al.*, (1982); Palma *et al.*, (2005); Teixeira *et al.*, (1990), realizaron liberación controlada de agroquímicos utilizando quitina y

quitosano para la formación de hidrogeles y labilidad de derivados en el cultivo de arándano. Por otra parte, para la agricultura la quitina ha sido utilizada como potenciador del efecto antagónico de microorganismos del suelo, además de aumentar el inóculo microbiano de organismos antagonistas.

#### 2.5.2.2. Quitosano

El quitosano, también llamado quitosana, quitosan o chitosán, es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El quitosano se produce comercialmente mediante la desacetilación de la quitina (Fig. 3), que es un elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, camarones, langostas, etc.).

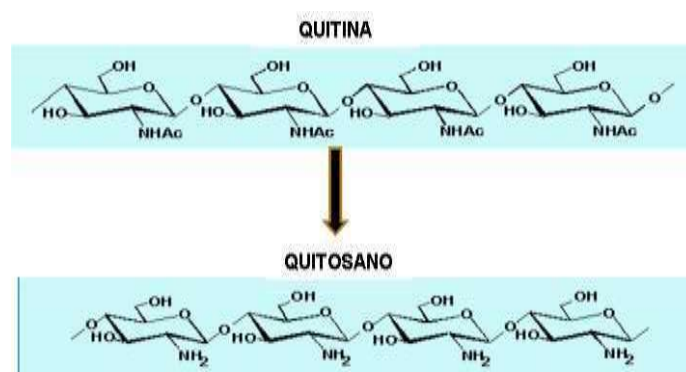


Figura 3. Desacetilación de la quitina para la obtención del quitosano.

El quitosano se emplea principalmente para favorecer el crecimiento de las plantas, debido a sus propiedades como promotor de la defensa de las plantas contra infecciones provocadas por hongos. La actividad fungicida del quitosano se ha estudiado, tanto *in vitro* (El Ghaouth *et al.*, 1992) como *in vivo* (Li y Yu, 2001; Yu *et al.*, 2007). El quitosano inhibe una gran cantidad de especies de hongos, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares (Allan y Hardwiger, 1979; Roller y Covill, 1999). Se ha estudiado la actividad biocida con algunos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* con el que se encontró que el quitosano (a una concentración de 50 ppm) controla la enfermedad conocida como “moho gris” en pepino (Ben-Shalom *et*

*al.*, 2003). Bautista-Baños *et al.* (2003) encontraron que los tratamientos *in vitro* con quitosano tienen efecto fungicida sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. Kendra y Hadwiger, (1984), describen que el heptámero no acetilado del quitosano tiene una alta actividad fungicida contra *Fusarium solani*. Xu *et al.* (2007) demostraron que los oligo-quitosanos pueden penetrar la membrana del patógeno y unirse al ADN y/o ARN de *P. capsici*. Se ha demostrado que la combinación de quitosano con otro polímero ha dado buenos resultados. Diversos autores utilizaron quitosano y quitina en combinación en corrección de sustratos de crecimiento como fungicida y nematocida en cultivo de lupino blanco (altramuz), guisante, tomate, papa y apio (Abd-El-, Kareem, 2002; Abd-El-, Kareem *et al.*, 2002; Abd-El-, Kareem *et al.*, 2004; Abd-El-, Kareem *et al.*, 2006; Sneh y Henis, 1972). Finalmente, Khan *et al.* (2003) describió que la combinación de quitosano y oligómeros de quitina pueden utilizarse como inductores de mecanismos de defensa vegetal y generando resistencia en el cultivo de soya.

### 3. HIPÓTESIS

La aplicación de quitina, quitosano y *Trichoderma harzianum* en suelo, disminuyen la severidad del ataque por *Phytophthora capsici* en plantas de Chile.

### 4. OBJETIVOS

- General

Evaluar los productos alternativos quitina, quitosano y *Trichoderma harzianum* para el control biológico de *Phytophthora capsici* en plantas de Chile serrano (*Capsicum annum* L).

- Específicos
- 1) Evaluar el efecto en la altura de la planta, peso fresco y peso seco de la planta y de la raíz, al aplicar al suelo quitina, quitosano y *Trichoderma harzianum*, en plantas inoculadas con *P. capsici*.
  - 2) Evaluar el índice de severidad de la marchitez en plantas de chile tratadas.
  - 3) Determinar *in vitro* el porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetal

Los experimentos se llevaron a cabo con plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) variedad Camino Real. Se germinaron las semillas en semilleros de 162 orificios con un volumen de 10 mL cada uno (Fig. 4). Se utilizó una mezcla de turba, vermiculita y arena (3:1/2:1) previamente humedecido, como sustrato. Las semillas se sembraron a una profundidad de aproximadamente 107 mm para facilitar la germinación. Los semilleros se mantuvieron durante 10 días en una cámara húmeda bajo condiciones de laboratorio para acelerar la germinación. Para conservar la humedad del sustrato, el semillero se colocó en el interior de una caja de plástico con agua, y esta se cubrió con una bolsa de plástico. Posteriormente las plántulas fueron trasladadas a un invernadero del Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM, Campus Morelia. Se regaron de acuerdo a las necesidades de la planta y se fertilizaron una vez por semana (Anexo 1).



Figura 4. Germinación de semillas de chile serrano en sustrato estéril

### 5.2. Trasplante a macetas

Se seleccionaron plantas con cuatro hojas verdaderas, y se trasladaron a macetas de 1 litro para cada experimento. Se utilizó sustrato a base de turba, vermiculita y arena (3:1/2:1) el cual solamente se esterilizó para los experimentos 1 y 2. Se trasladaron 36 días después de la siembra en el experimento 1, a los 48 días en el experimento 2 y a los 55 días en el experimento 3, y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero.

### 5.3. Material biológico (Patógeno)

Se utilizó el aislado CH-11 del oomiceto *Phytophthora capsici*, cepa muy agresiva, proveniente del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF de la UMSNH. La producción de esporangios y zoosporas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Ristaino (1990) con modificaciones. Los cultivos de *P. capsici* se crecieron en agar V-8 a 27° C por 6 días. Posteriormente se indujo la esporulación cortando cuadros de aproximadamente 2x2 cm con micelio que fueron transferidos a cajas petri, a las que se agregó agua estéril y se incubaron en cámara de incubación a 27° C durante 15 días. Durante este tiempo el agua se cambió varias veces hasta que hubo esporulación. Cuando se observaron esporangios, se indujo la liberación de zoosporas, manteniendo las cajas a una temperatura de 4° C por 30 min y otros 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó una suspensión de zoosporas cuantificándose la concentración de estas por ml en una cámara de Neubauer

(Fernández-Herrera *et al.*, 2007). La concentración se ajustó a 50,000 zoosporasmL<sup>-1</sup>.

#### 5.4. Tratamientos

Para establecer los diferentes tratamientos se utilizaron *T. harzianum*, quitina y quitosano, solos y en combinación (Cuadro 3). Se usó el producto comercial Tricsoil que contiene  $5.0 \times 10^{11}$  ufc/gr de *T. harzianum*, se agregaron 0.625 mg (dosis recomendada en la etiqueta) por maceta, de quitina se agregaron 6 gr de hojuelas por maceta y de quitosano 5 mL de una solución al 1% por maceta. Se aplicaron sobre el sustrato y se mezclaron homogéneamente con el mismo. Asimismo se colocaron dos tratamientos sin ningún producto, uno inoculado con *P. capsici* que correspondió al Testigo positivo (+) y uno sin inocular que fue el Testigo negativo (-).

Para el experimento 1 los tratamientos fueron aplicados 15 días antes del trasplante, mientras que para los experimentos 2 y 3, los tratamientos fueron aplicados al momento del trasplante utilizando las mismas dosis. Cada tratamiento tuvo 6 repeticiones, por lo que el total de macetas fue de 42 por experimento (Cuadro 2). La unidad experimental fue una planta por maceta.

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos.

Tratamientos		
1	Testigo (-)	T-
2	Testigo (+)	T+
3	<i>Trichoderma</i>	Tr+
4	quitina	Q+
5	quitosano	Qo+
6	<i>Trichoderma</i> / quitina	Tr/Q+
7	<i>Trichoderma</i> / quitosano	Tr/Qo+

## 5.5. Manejo

Las plantas se regaron tres veces por semana y fueron fertilizadas dos veces a la semana. La solución para la fertilización utilizada fue la desarrollada por la Universidad de Western Australia, la cual contiene macro y micronutrientes (Anexo 1). Los micronutrientes se aplicaron las dos primeras semanas después del trasplante a las macetas, mientras que los macronutrientes (NPK) se aplicaron semanalmente hasta que se inoculó el patógeno *P. capsici*. Los experimentos se desarrollaron bajo condiciones de invernadero (30° C).

## 5.6. Inoculación con el patógeno *P. capsici*

En el experimento 1 las plantas se inocularon con *P. capsici* 27 días después de haber sido trasplantadas. En los experimentos 2 y 3 las plantas se inocularon 15 días después de haber sido trasplantadas. En los tres experimentos esta fecha correspondió a 63 días después de la siembra.

Las plantas se regaron hasta saturar el suelo antes de que fueran inoculadas, para facilitar la infección con el patógeno. Se inocularon 50, 000 zoosporas por planta, en la base del tallo (Fig. 5) utilizando una pipeta.



Figura 5. Inoculación del patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de chile

## 5.7. Diseño experimental

Se llevaron a cabo siete tratamientos con seis repeticiones para cada uno de los experimentos, con un diseño experimental factorial.

### 5.8. Determinación del índice de severidad de la marchitez en plantas de Chile

Se evaluó la sintomatología en base a una escala del 0 al 6, para determinar el índice de severidad (Cuadro 3), a los 6, 13 y 20 días después de la inoculación con el patógeno, en los experimentos 1 y 2, y a los 5, 12 y 21 días en el experimento 3 (Fig. 6). La escala utilizada fue desarrollada de acuerdo a los síntomas observados.

**Cuadro 3:** Escala de índice de severidad de síntomas ocasionados por *Phytophthora capsici*.

Índice de severidad	Sintomatología
0	Sana
1	Planta con hojas parcialmente colapsadas, tallo erguido.
2	Plantas con hojas colapsadas y con algunas desprendidas, tallo ligeramente inclinado
3	Plantas con hojas colapsadas y cloróticas, con algunas desprendidas, tallo ligeramente inclinado
4	Plantas con hojas colapsadas, con algunas desprendidas, tallos desplomados, necrosis en la base del tallo
5	Plantas con hojas totalmente colapsadas, con algunas desprendidas, tallos desplomados y con presencia de necrosis desde la base hasta la parte media del tallo
6	Plantas con hojas totalmente colapsadas, con algunas desprendidas, tallos desplomados y con presencia de necrosis en más de 50% del tallo

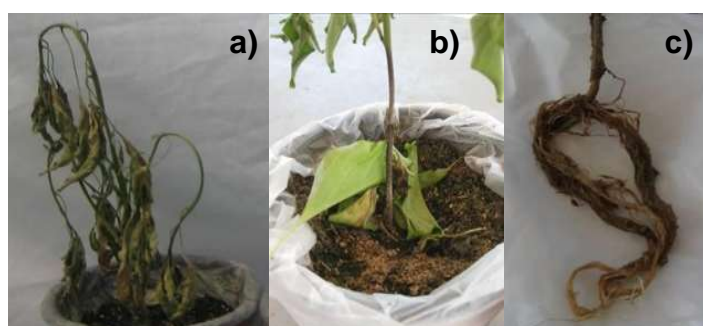


Figura 6. Severidad de la enfermedad observada en plantas de Chile, a) hoja con marchitamiento colapsadas, b) necrosis en tallos, c) pudrición de raíz.

## **5.9. Registro de variables agronómicas**

Se realizó una sola cosecha 23 días después de la inoculación con el objetivo de evaluar las variables agronómicas en los experimentos 1 y 3. En el experimento 2 no fue posible tomar las variables agronómicas debido a que las plantas se murieron antes de que realizara la cosecha. Las variables que se registraron fueron: altura de la planta, peso fresco y seco de la parte aérea, peso fresco y seco de la raíz y porcentaje de infección de las raíces.

Las raíces fueron lavadas con la finalidad de eliminar residuos del sustrato, posteriormente se colocaron por separado en bolsas de papel.

### **5.9.1 Altura de la planta**

Se realizaron dos mediciones de la altura de la planta una antes de la inoculación del patógeno *P. capsici*, y la segunda al momento de la cosecha.

En los experimentos 1, 2 y 3, se midió la variable altura de planta utilizando un metro de cinta metálica, considerando la base del tallo y el ápice de la planta donde se encontraban los últimos brotes.

### **5.9.2 Peso fresco de la raíz y la parte aérea**

En los experimentos 1 y 3, las variables peso fresco de la raíz y de la parte aérea fueron tomadas de cada una de las plantas inmediatamente después de la cosecha, utilizando una balanza analítica. La parte aérea se separó de la parte radical de la planta y éstas fueron pesadas por separado.

### **5.9.3 Peso seco de la raíz y la parte aérea**

En los experimentos 1 y 3, las raíces y la parte aérea se introdujeron en bolsas de papel y se colocaron en un horno, a 70° C por 48 h. Una vez pasado el tiempo de calentamiento se pesó la materia seca de cada una de las plantas, con ayuda de una balanza analítica.

#### 5.9.4 Porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*

En los experimentos 1 y 3 se evaluó el porcentaje de infección de las raíces con *P. capsici* al momento de la cosecha, lo que correspondió a 60 días después de la inoculación del patógeno. Se obtuvo una muestra de raíces de cada unidad experimental con el siguiente procedimiento: Las raíces fueron lavadas con agua corriente para quitar el sustrato y posteriormente las raíces se cortaron en segmentos de 0.5 a 1 cm. Después, las raíces se mezclaron en un vaso de precipitado agregando agua y posteriormente se colocaron en un colador para retirar el exceso de agua. Con pinzas de disección se tomó la muestra de raíces que fueron sumergidas durante 10 segundos en un vaso de precipitado con alcohol al 90%. Se retiró la mayor cantidad de líquido sobre una toalla de papel. Veinte segmentos de raíces desinfectadas fueron colocadas en cajas de petri con medio de cultivo selectivo para *Phytophthora* (Anexo 2) (Fig. 7). Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente en el laboratorio y cubiertas con papel aluminio para que estuvieran en oscuridad. Se monitorearon las cajas petri cada dos días, para observar el crecimiento de micelio. Se determinó el número de raíces que presentaban crecimiento de micelio en cada tratamiento y se calculó a que porcentaje correspondía.



Figura 7. Raíces de chile en medio de cultivo Agar Harina de Maíz selectivo

### **5.10. Análisis estadístico**

Los datos del desempeño vegetal se analizaron con ANOVA de una vía. Antes del ANOVA se realizó la prueba de Levene para verificar homogeneidad de la varianza entre tratamientos. Se realizó un análisis post ANOVA comparando los tratamientos con la prueba de LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) utilizando el software Statgraphics.

Los datos del índice de severidad de la enfermedad se analizaron en base al ANOVA con Kruskal Wallis por ser datos no paramétricos. Se realizó un análisis post ANOVA comparando los tratamientos con la prueba de Dunn ( $\alpha=0.05$ ) utilizando el software Statistix.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Experimento 1

#### 6.1.1. Altura de la planta

A los 63 días después de la siembra en plantas de chile, que correspondió al día de la inoculación con *P. capsici*, en los tratamientos con quitina y *T. harzianum*/quitina las plantas presentaron una altura significativamente menor que los testigos (positivo y negativo), mientras que con los demás tratamientos las plantas presentaron una altura similar a estos (Fig. 8).

Se observó una reducción significativa en la altura de las plantas 23 días después de la inoculación con *P. capsici* con respecto al Testigo (-) (Fig. 8). Siendo esta más evidente en los tratamientos de quitina y *T. harzianum*/quitina. Las plantas inoculadas en los tratamientos con quitina, quitina en combinación con *T. harzianum* y quitosano en combinación con *T. harzianum* mostraron una altura de la planta menor comparada con plantas del Testigo (+) (Fig. 8).

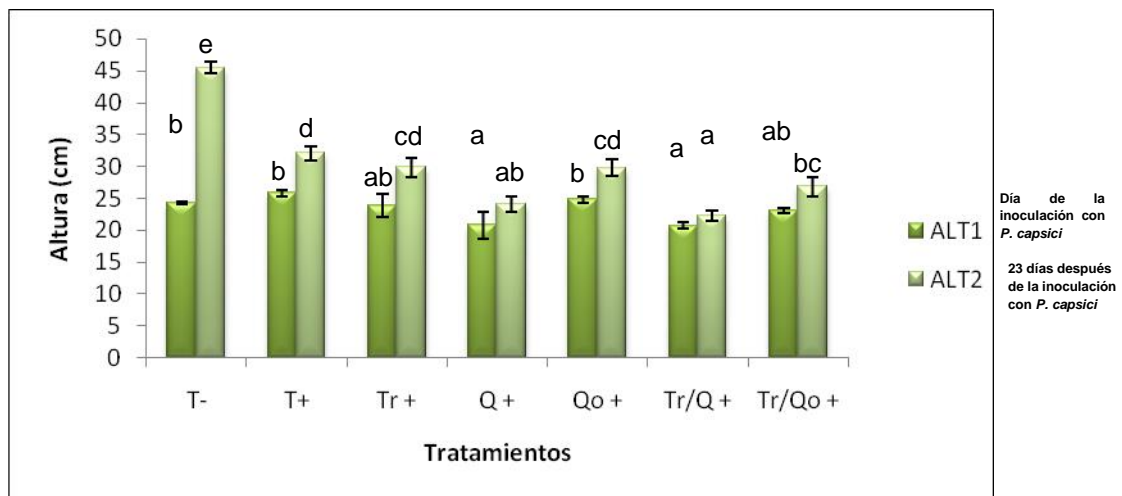


Figura 8. Altura de plantas de chile el día de la inoculación con *P. capsici* (ALT1), y 23 días después de la inoculación (ALT2). Las plantas fueron sembradas en suelo estéril con productos alternativos de biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.1.2. Peso fresco de la parte aérea

El peso fresco de la parte aérea (PFPA) en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) fue significativamente menor que en plantas no inoculadas (T-). Los tratamientos quitina, y *T. harzianum*/quitosano presentaron menor PFPA que el Testigo (+), mientras los otros tratamientos *T. harzianum*/quitina, *T. harzianum* y quitosano presentaron un PFPA parecido al Testigo (+) (Fig. 9).

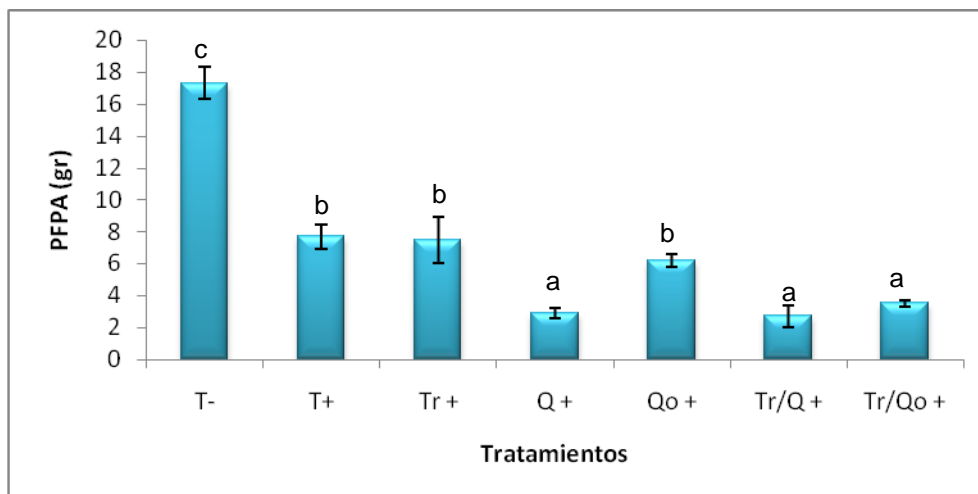


Figura 9. Peso fresco de la parte aérea (PFPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.1.3. Peso seco de la parte aérea

El peso seco de la parte aérea (PSPA) en plantas inoculadas con *P. capsici* en todos los tratamientos, fue menor que en plantas no inoculadas (T-). Los tratamientos quitina, *T. harzianum*/quitina y *T. harzianum*/quitosano presentaron menor PSPA que el testigo (+), los tratamientos con *T. harzianum* y quitosano presentaron un PSPA parecido al Testigo (+) (Fig.10).

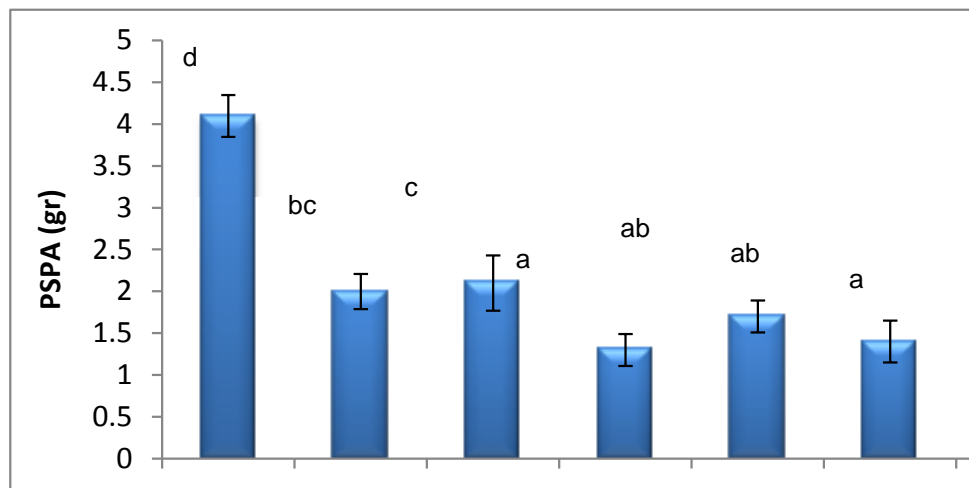


Figura 10. Peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.

#### 6.1.4. Peso fresco de la parte radicular

Se encontró que el peso fresco de la parte radicular (PSPR) disminuyó más del 50% en plantas inoculadas con *P. capsici* en todos los tratamientos, con respecto a plantas no inoculadas (T-). Por lo que se refiere a la respuesta a los tratamientos quitina, *T. harzianum*/ quitina y *T. harzianum*/ quitosano *T. harzianum* y quitosano disminuyeron significativamente más el PFPR de las plantas que el Testigo (+). Siendo los tratamientos de quitina, *T. harzianum*/ quitina y *T. harzianum*/ quitosano estadísticamente iguales y donde se obtuvieron los valores más bajos de PFPR (Fig. 11).

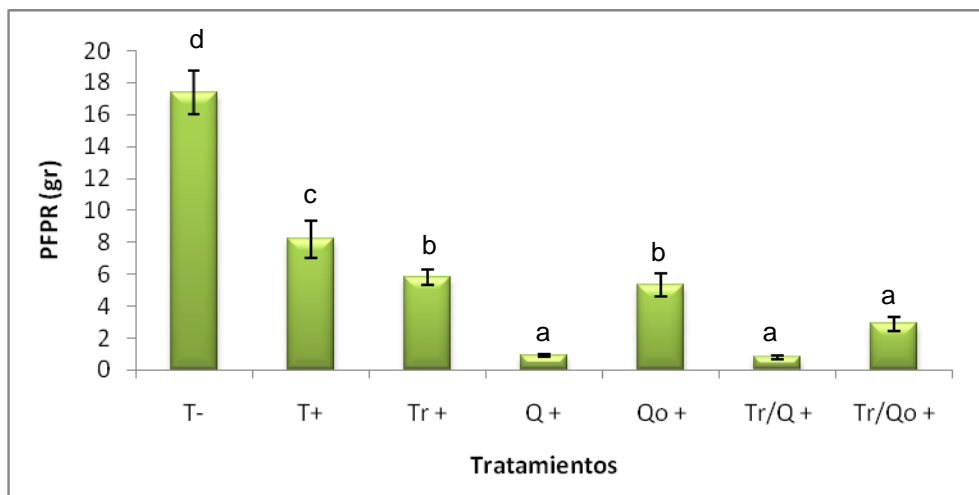


Figura 11. Peso fresco de la parte radicular (PFPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.

#### 6.1.5. Peso seco de la parte radicular

El peso seco de la parte radicular (PSPR) disminuyó significativamente en plantas inoculadas con *P. capsici* en todos los tratamientos. Los tratamientos quitina y *T. harzianum*/ quitina presentaron menor PSPR que el Testigo (+) siendo esta disminución significativa, mientras los otros tratamientos *T. harzianum* y quitosano presentaron un PSPR similar al Testigo (+) (Fig. 12).

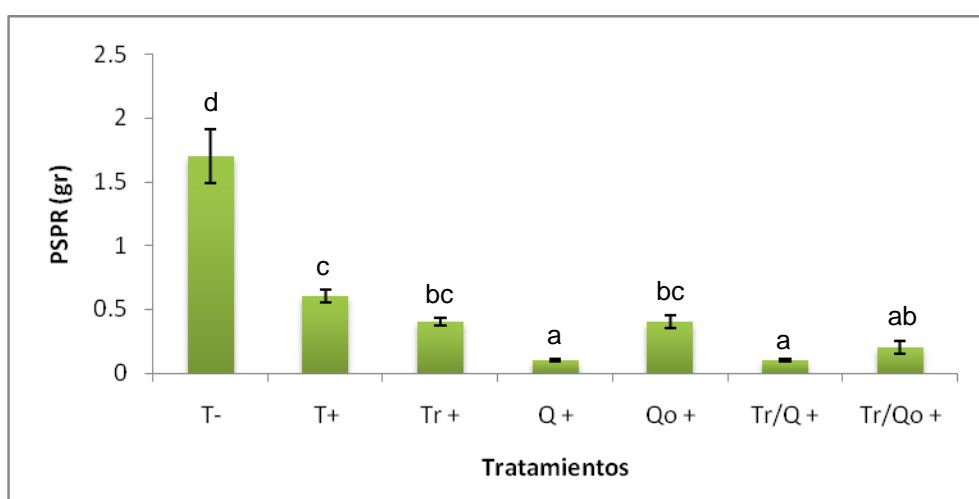


Figura 12. Peso seco de la parte radicular (PSPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*.

Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.1.6. Severidad de la enfermedad

El índice de severidad en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) fue aumentando con el paso del tiempo (Fig. 13). Los tratamientos quitina y *T. harzianum*/ quitina presentaron mayor índice de severidad que el Testigo (+) a los 6 días, 13 días, y 20 días (Figs.13 y 15). El testigo negativo no mostró síntomas.

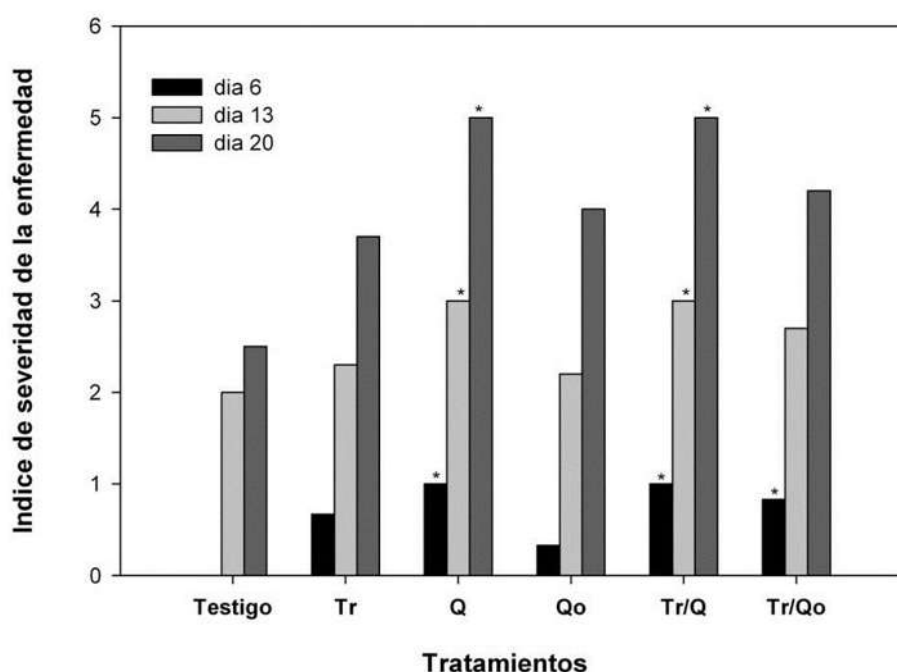


Figura 13. Índice de severidad en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas con respecto el testigo positivo.



Figura 14. Síntomas de marchitez ocasionados por *P. capsici* en plantas de chile tratadas con productos alternativos para el biocontrol, 23 días después de la inoculación.



Figura 15. Severidad de la marchitez ocasionada por *P. capsici* en plantas de chile tratadas con productos alternativos para el biocontrol, 23 días después de la inoculación con el patógeno.

### 6.1.7. Porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*

Las raíces de las plantas no inoculadas no presentaron raíces infectadas. El tratamiento con *T. harzianum*/quitosano presentó un mayor porcentaje de raíces infectadas por *P. capsici* que el testigo (+), mientras que los otros tratamientos presentaron un porcentaje de raíces infectadas similar a este (Fig. 16).

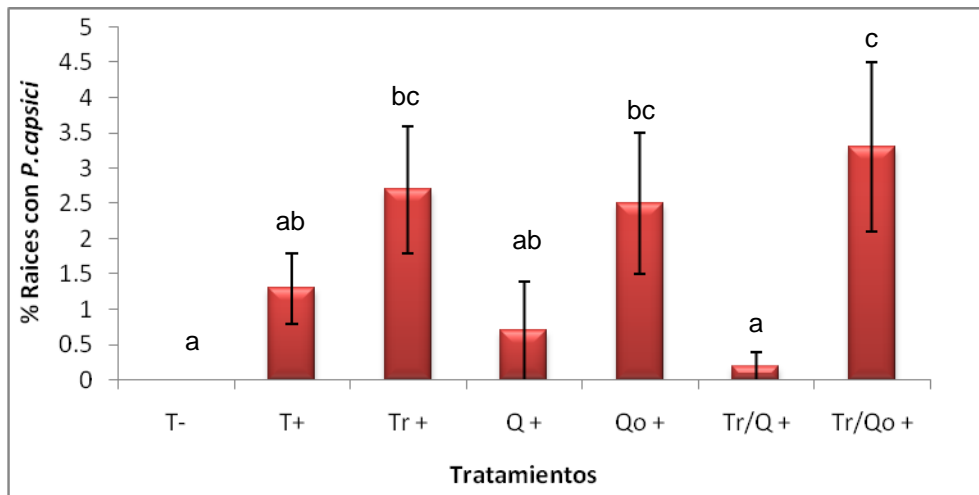


Figura 16. Porcentaje de infección de raíces de plantas de chile inoculadas con *P.capsici*, sembradas en diferentes tratamientos con productos alternativos para el biocontrol del patógeno. Las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=20.

## 6.2. Experimento 2

### 6.2.1. Altura de la planta.

Las plantas del tratamiento Testigo (-) no presentaron diferencia en la altura con respecto al Testigo (+) y a los tratamientos *T. harzianum*, quitina, quitosano, *T. harzianum*/ quitina y *T. harzianum*/ quitosano, 63 días después de la siembra, que correspondió al día de la inoculación.

Se observó una reducción significativa en la altura de las plantas, 17 días después de la inoculación con *P. capsici* en los tratamientos Testigo (+), *T. harzianum*, quitina, quitosano, *T. harzianum*/ quitina y *T. harzianum*/ quitosano con respecto al Testigo (-) (Fig. 17).

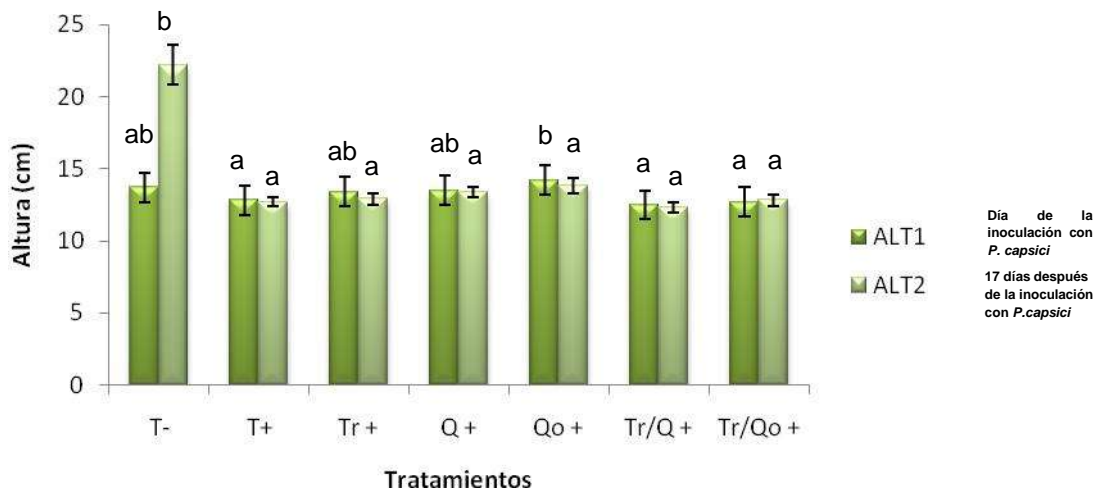


Figura 17. Altura de plantas de chile el día de la inoculación con *P. capsici* (ALT1), y 17 días después de la inoculación (ALT2). Las plantas fueron sembradas en suelo estéril con productos alternativos de biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error de estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.2.2. Severidad de la enfermedad

El índice de severidad en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) incrementó con el tiempo, en comparación con plantas no inoculadas con *P. capsici* (T-). No se observaron diferencias significativas entre el testigo positivo y los tratamientos con productos alternativos para el control biológico de *P. capsici* (Figs. 18 y 19).

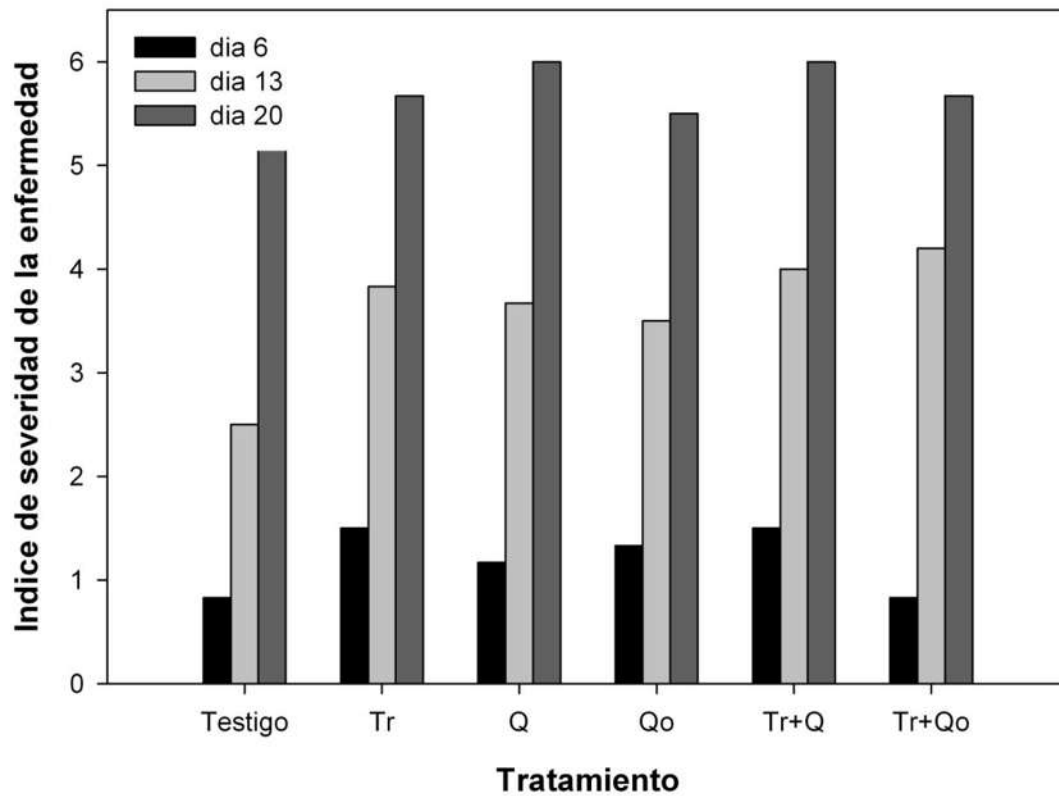


Figura 18. Índice de severidad en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno.



Figura 19. Síntomas de marchitez en plantas de chile 13 días después de inoculadas con *P. capsici*, utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno.

### 6.3. Experimento 3

#### 6.3.1. Altura de la planta

Las plantas de los tratamientos con *T. harzianum*/quitina y *T. harzianum*/quitosano presentaron menor altura que los testigos, 91 días después de la siembra (día de la inoculación) (Fig. 20).

Se observó una reducción significativa en la altura de las plantas con todos los tratamientos, 21 días después de la inoculación con *P. capsici* (Fig. 20) con respecto al testigo (-). Siendo esta más evidente en el tratamiento de *T. harzianum*/quitina donde se observó la menor altura. Las plantas en los tratamientos de *T. harzianum*, quitina y *T. harzianum*/quitosano mostraron una altura de la planta estadísticamente similar a la del testigo (+) (Fig. 20).

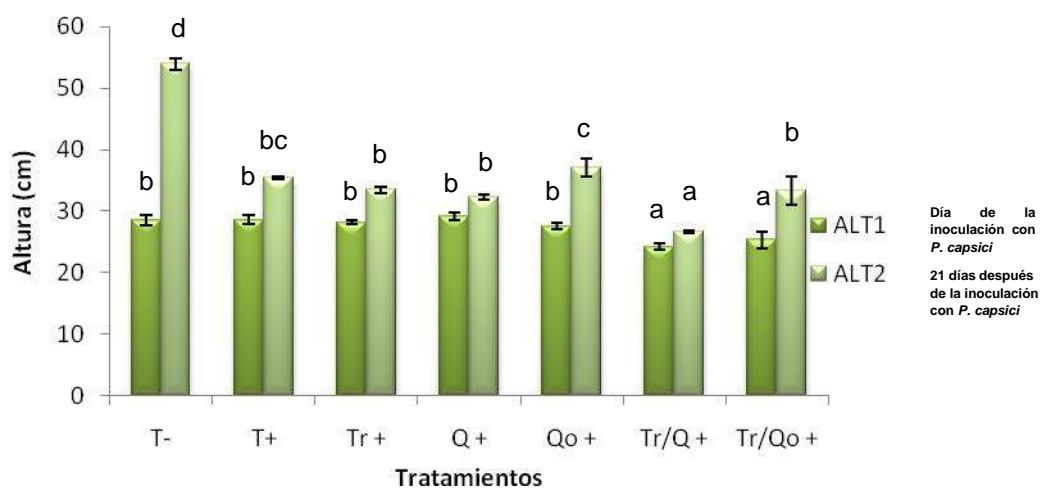


Fig. 20. Altura de plantas de Chile el día de la inoculación con *P. capsici* (ALT1), y 21 días después de la inoculación (ALT2). Las plantas fueron sembradas en suelo no estéril con productos alternativos de biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.3.2 .Peso fresco de la parte aérea

El peso fresco de la parte aérea (PFPA) en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) fue significativamente menor que en plantas no inoculadas con *P. capsici* (T-). Quitina, *T. harzianum* y *T. harzianum*/quitina presentaron significativamente menor PFPA que el testigo (+), mientras que los tratamientos de quitosano y *T. harzianum*/quitosano presentaron un PFPA estadísticamente similar al del Testigo (+) (Fig. 21).

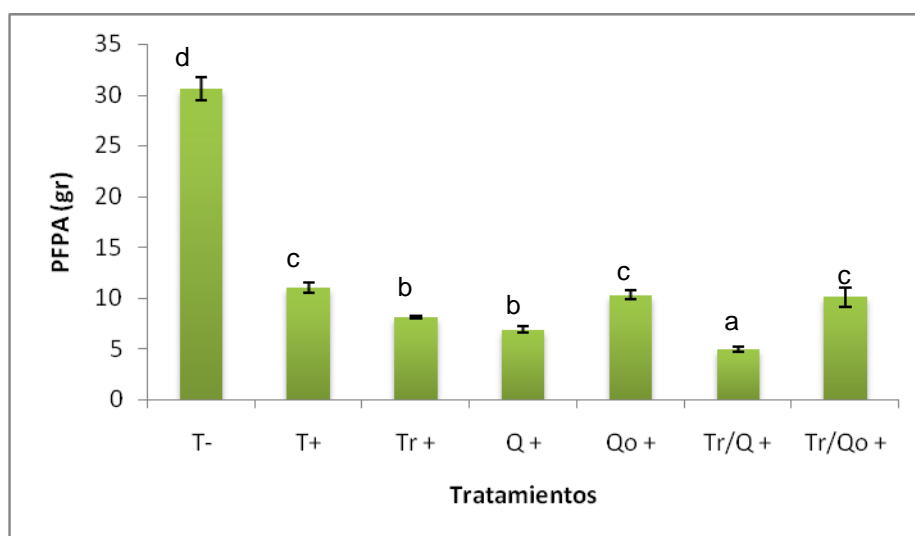


Figura 21. Peso fresco de la parte aérea (PFPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 23 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.3.3 Peso seco de la parte aérea

El peso seco de la parte aérea (PSPA) en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) fue menor que en plantas no inoculadas (T-). Por otra parte el tratamiento con quitina presentó significativamente mayor PSPA que el Testigo (+), mientras los otros tratamientos presentaron un PSPA igual al del Testigo (+) (Fig. 22).

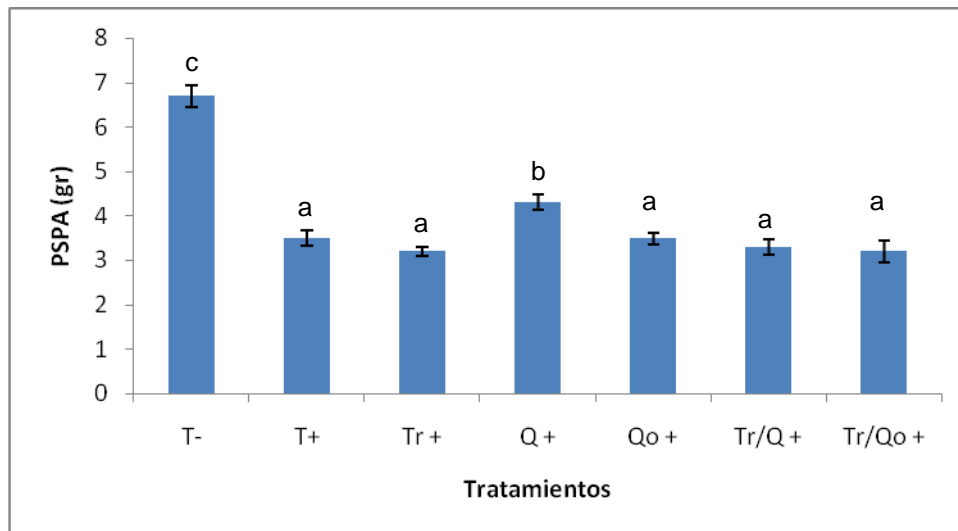


Figura 22. Peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 21 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error estándar y el número de repeticiones fue n=6.

#### 6.3.4. Peso fresco de la parte radicular

El peso fresco de la parte radicular (PFPR) en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) fue menor que en plantas no inoculadas (T-). Los tratamientos de quitina y la combinación *T. harzianum*/quitina presentaron significativamente menor PFPR que el testigo (+), mientras que los tratamientos de quitosano y *T. harzianum*/quitosano presentaron un PFPR estadísticamente similar al del Testigo (+) (Fig. 23).

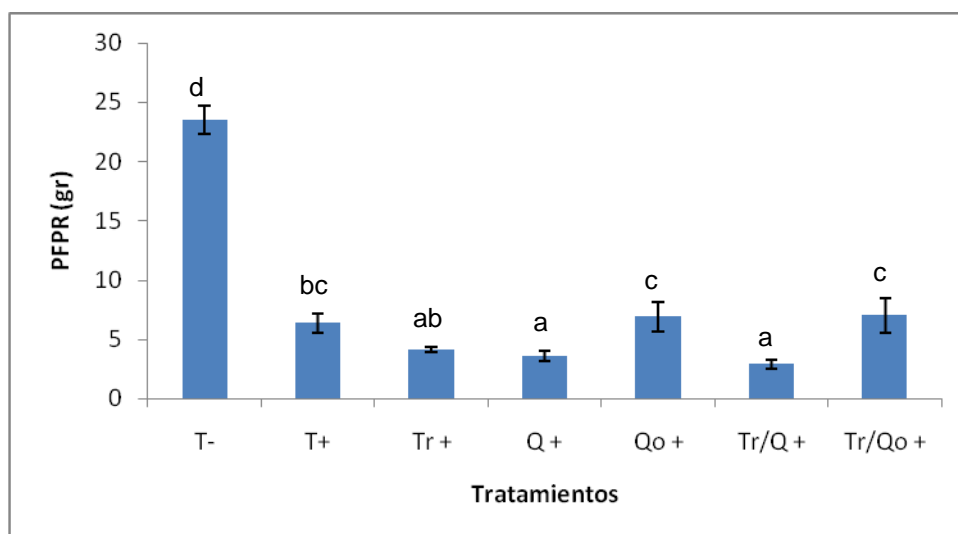


Figura 23. Peso fresco de la parte radicular (PFPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 21 días después de la inoculación con el patógeno.

### 6.3.5. Peso seco de la parte radicular

El peso seco de la parte radicular (PSPR) en plantas inoculadas con *P. capsici* (T+) fue menor que en plantas no inoculadas (T-). El tratamiento de *T. harzianum*/quitina presentó menor PSPR que el testigo (+), mientras que los tratamientos de quitosano y *T. harzianum*/quitosano presentaron un PSPR estadísticamente similar al del Testigo (+) (Fig. 24).

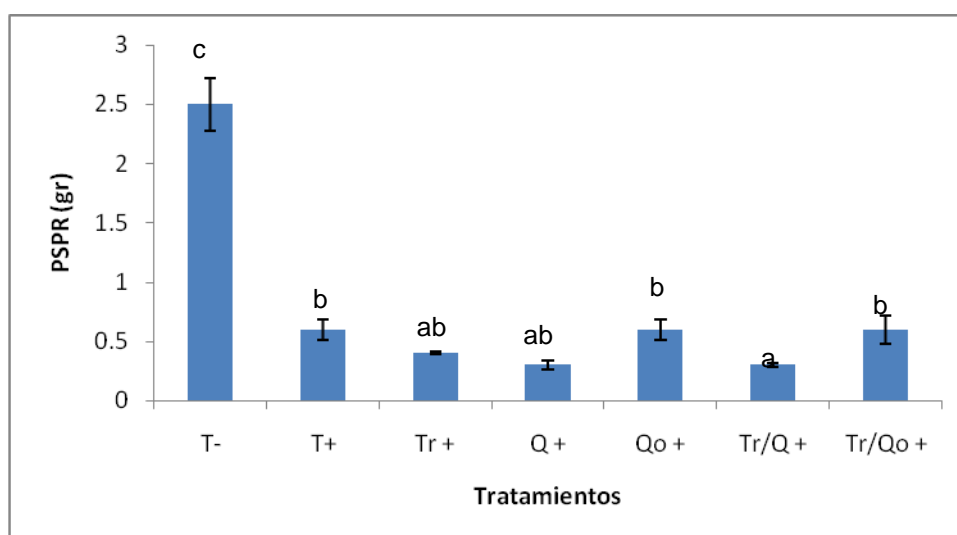


Figura 24. Peso seco de la parte radicular (PSPR) de plantas de chile crecidas en suelo estéril con productos alternativos para el biocontrol de *P. capsici*. Datos tomados 21 días después de la inoculación con el patógeno. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error estándar y el número de repeticiones fue n=6.

### 6.3.6. Severidad de la enfermedad

Los tratamientos de quitina y la combinación *T. harzianum*/quitina presentaron un índice de severidad significativamente mayor que el Testigo (+) 21 días después de la inoculación, con la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia de  $\zeta$ . Los tratamientos de quitosano y *Trichoderma harzianum*/quitosano presentaron una respuesta estadísticamente parecida a la del Testigo (+) (Fig. 25 y 26).

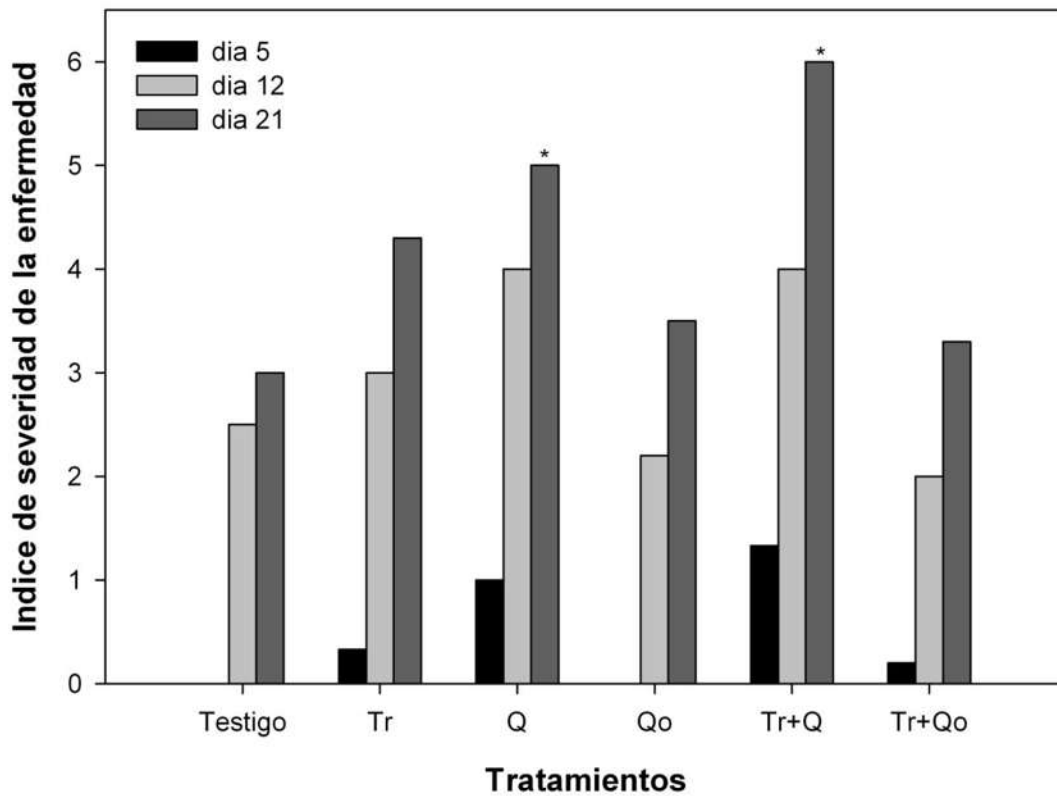


Figura 25. Índice de severidad en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* utilizando diferentes tratamientos de productos alternativos para el control biológico de este patógeno. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas con respecto el testigo positivo.



Figura 26. Síntomas de marchitez ocasionados por *P.capsici* en plantas de chile tratadas con productos alternativos para el biocontrol, 21 días después de la inoculación.

### 6.3.7. Porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*

El tratamiento de *Trichoderma harzianum*/quitina (+) presentó un menor porcentaje de raíces infectadas por *P. capsici* que el Testigo (+), mientras que en el tratamiento de *Trichoderma harzianum* (+) fue estadísticamente parecido al del Testigo (+) (Fig. 27 y 28).

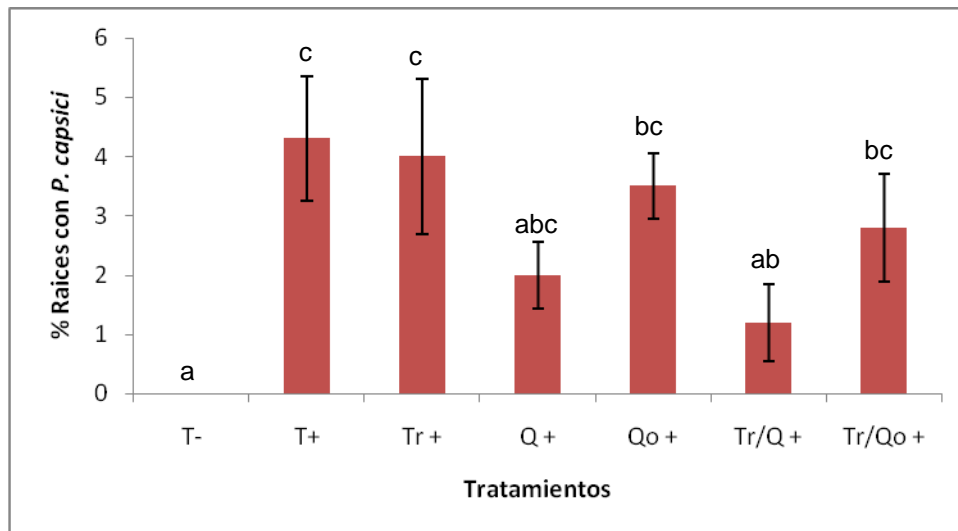


Figura 27. Porcentaje de infección de raíces de plantas de chile inoculadas con *P.capsici*, sembradas en diferentes tratamientos con productos alternativos para el biocontrol. Los tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes, las barras representan el error estándar y el número de repeticiones fue n=6.

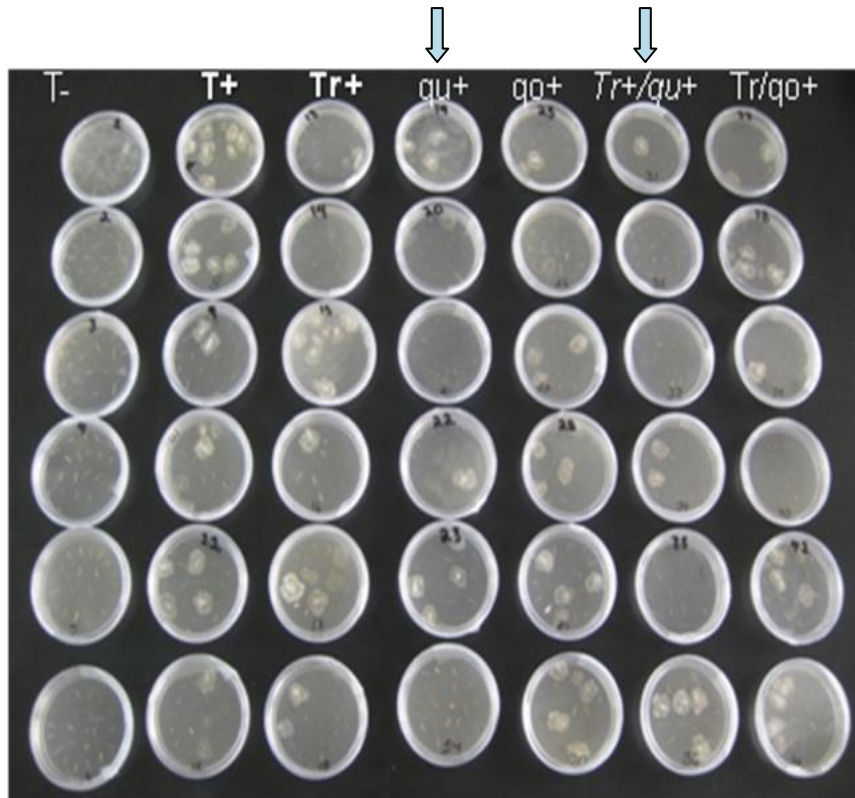


Figura 28. Colonias de *P. capsici* obtenidas en medio selectivo, a partir de raíces de chile inoculadas y sometidas a diferentes tratamientos alternativos de biocontrol del patógeno.

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron los compuestos orgánicos quitina y quitosano y el agente de control biológico *Trichoderma harzianum*, individualmente y en combinación, para determinar su eficacia en el control de *Phytophthora capsici*. Los experimentos se llevaron a cabo en invernadero, utilizando plantas de chile serrano variedad Camino real en sustrato estéril y no estéril, aplicando los productos antes y después de la inoculación del patógeno. Los resultados mostraron que ninguno de los productos analizados controlaron la enfermedad causada por *P. capsici* en plantas de chile. Por el contrario, se observó que quitina favoreció el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici*, lo cual se vio reflejado en el índice de severidad.

Las plantas testigo inoculadas con *P. capsici* mostraron síntomas de marchitez, hojas colapsadas y necrosis en el tallo (Erwin y Ribeiro, 1996) de 5 a 20 días después de la inoculación. Se recuperó a *P. capsici* de raíces infectadas utilizando medio selectivo, corroborándose que funcionó satisfactoriamente el patosistema *P. capsici* - chile serrano utilizado en este proyecto.

La severidad de la enfermedad causada por *P. capsici* fue similar en sustrato estéril y no-estéril mostrando que el patosistema utilizado puede funcionar con y sin la influencia de la microbiota general del suelo. Además los resultados indicaron que la microbiota nativa del sustrato utilizado no afectó el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici*.

La severidad de la enfermedad también se pudo ver influenciada por el tamaño de las plantas. En el experimento 2 en el que las plantas fueron menores a 15 cm al momento de la inoculación, con respecto a las utilizadas en el experimento 3, todas murieron en menor tiempo, sin importar el tratamiento aplicado. Debido a lo anterior no se recomienda utilizar plantas pequeñas para este tipo de estudios.

### ***Trichoderma harzianum***

Varias especies del género *Trichoderma* son reconocidas como agentes de control biológico contra fitopatógenos de las raíces en diferentes cultivos (Papavizas *et al.*, 1982). Sin embargo, un estudio realizado con *T. harzianum* aplicado al suelo en el cultivo de chile no controló *P. capsici* en invernadero (Sid-Ahmed *et al.*, 2007). Esto coincide con en el presente trabajo en el que no se detectó una diferencia en el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici* en chile con *T. harzianum* y el testigo positivo independientemente del tiempo de la inoculación con el patógeno y en suelo estéril y no-estéril. Por otro lado, el producto comercial de *T. harzianum* utilizado en el presente trabajo ha mostrado antagonismo contra el crecimiento de *P. capsici* en suelo sin plantas en combinación con aplicación de rastrojo de maíz (Gutiérrez Núñez, 2014). Es importante mencionar que la aplicación individual de *T. harzianum* no redujo la densidad de la población de *P. capsici* en el trabajo de Gutiérrez-Núñez (2014) sugiriendo que el efecto de control biológico de *T. harzianum* depende de la presencia de material orgánica para favorecer su crecimiento. Sin embargo, la inoculación de *T. harzianum* en combinación con la aplicación de rastrojo de maíz no detuvo el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici* en un ensayo con plantas de chile serrano de la misma variedad que las utilizadas en este estudio (Gutiérrez-Núñez, 2014).

### **Quitina y quitosano**

Compuestos orgánicos como quitina y quitosano son utilizados en el manejo biológico de la salud de las plantas en general (El Hadrami *et al.*, 2010). Sin embargo, en plantas de chile Sid-Ahmed *et al.* (2003) mostraron que al aplicar quitina al suelo el índice de severidad de la enfermedad causada por *P. capsici*, fue igual al del testigo positivo. En el presente trabajo la aplicación de quitina aceleró el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici* en plantas de chile, siendo al parecer esta la primera vez que se reporta este efecto.

Aunque la quitina aceleró el desarrollo de la enfermedad tanto en sustrato estéril como no estéril en el presente estudio, el número de colonias de *P. capsici* recuperadas no fue mayor en relación al testigo sin este compuesto orgánico. Esto podría explicarse por la pudrición tan avanzada que presentaban las raíces en los tratamientos con quitina, en los que el patógeno ya no estaba creciendo activamente. Como era de esperarse debido al acelerado desarrollo de la enfermedad esto repercutió en la disminución de los valores de las variables de salud vegetal de las plantas de chile, tanto en sustrato estéril como no estéril. El porqué quitina redujo el crecimiento vegetal y aceleró el desarrollo de la marchitez de chile no es posible saberlo con las mediciones realizadas en el presente trabajo.

Al quitosano se le ha relacionado con la activación de la síntesis de compuestos de defensa en la planta (El Hadrami *et al.*, 2010). Sin embargo, esto no se vio reflejado en los tratamientos en los que se utilizó quitosano en este estudio. Existe la posibilidad de que con una cepa del patógeno tan agresiva y con una alta concentración del inóculo, estos compuestos no logren controlar la colonización del patógeno. Por otra parte con los derivados del quitosano se ha logrado un mejor control de enfermedades causadas por hongos (El Hadrami *et al.*, 2010) por lo que sería recomendable probar algunos derivados de este compuesto en estudios futuros.

### **Combinación de *T. harzianum* y compuestos orgánicos**

Para una mejor efectividad de respuesta de *T. harzianum* se considera importante la aplicación de compuestos orgánicos que puedan servirle como nutrimentos favoreciendo su establecimiento y manteniendo su población activa por más tiempo. Sid-Ahmed *et al.* (2003) reportaron que *T. harzianum* y la combinación de *T. harzianum* y quitina no tuvo un efecto sobre la severidad de la marchitez (pudrición de raíz) de chile en invernadero, la cual fue igual a la del testigo positivo. En el presente estudio con la combinación de *T. harzianum* y el compuesto orgánico quitina el desarrollo de la enfermedad fue mayor.

Cabe señalar que en la combinación *T. harzianum*/quitosano se observó un porcentaje mayor de raíces colonizadas por *P. capsici* con respecto al testigo

positivo en sustrato estéril, aun cuando el peso de la raíz fue significativamente menor que en el testigo positivo. Esto puede ser indicativo de que estos dos agentes en combinación favorecen el desarrollo del patógeno en las condiciones que se realizó este estudio aunque no repercutió en un mayor desarrollo de la enfermedad causada por el patógeno. Desafortunadamente en el presente estudio no se midieron las poblaciones de *T. harzianum* en el suelo lo que limita a dar una explicación de que fue lo que pasó en estos casos. Por lo anterior, en los siguientes estudios debe determinarse el número de colonias en el sustrato.

Diversos estudios muestran que la combinación de *T. harzianum* y otros microorganismos como *Streptomyces rochei* y *Burkholderia cepacia* es benéfica para el control de la pudrición de raíz causada por *P. capsici* (Ezziyyani et al., 2007 y 2009), por lo que futuros estudios deben contemplar una combinación de microorganismos.

## 8. CONCLUSIONES

Los productos alternativos utilizados en este estudio, incluyendo un producto comercial del agente de control biológico *T. harzianum* y compuestos orgánicos (quitina y quitosano), individualmente y en combinación, no controlaron la marchitez causada por *P. capsici* en plantas de chile.

La aplicación de quitina aceleró el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici* en plantas de chile y disminuyó el desarrollo vegetal en plantas inoculadas por lo que su uso como alternativa de control biológico, no es recomendable bajo las condiciones utilizadas en este estudio.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abd-El-Kareem, F. 2002. Integrated treatments between bioagents and chitosan on root rot diseases of pea plants under field conditions. *Egyptian Journal of Applied Science* 17:257-279.
- Abd-El-Kareem, F., Abd-Alla, M. A. and El-Mohamedy, R. S. 2002. Induced resistance in potato plants for controlling early blight disease under field condition. *Egyptian Journal of Applied Science* 17: 51-66.
- Abd-El-Kareem, F., El-Mougy, N. S., El-Gamal, N. G. and Fotouh, Y. O. 2006. Use of chitin and chitosan against tomato root rot disease under greenhouse conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2(4): 147-152.
- Agrios, G. N. 2001. *Fitopatología*. Editorial Limusa. México DF. 838 pp.
- Ahmad, J. S. and Baker, R. 1987. Competitive saprophytic and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 358-362.
- Allan, C. R. and Hardwiger, L. A. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology* 3: 285–287.
- Baker, K. F. and Cook, R. J. 1974. *Biological control of plant pathogens*. Freeman, San Francisco.
- Baker, R., Elad, Y. and Chet, Y. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology* 74:1019-1021.
- Bartnicki-Garcia, S. 1970. Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. Pages 81-103, in: *Phytochemical Phylogeny*, J.B. Harborne, ed. Academic Press.
- Bautista-Baños, S., Hernández -López, M., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087–1092.
- 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.

- Belanger, R., Dufuor, N., Caron, J. and Benhamou, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* 5: 41-54.
- Benhamou, N., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1998. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with endophytic bacteria strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204:153–168.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. and Fallik, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22: 285-290.
- Bustamante, E. 1986. Problemas fitopatológicos de poscosecha. *Manejo Integrado de Plagas* 2: 39-45.
- Bustamante, E. y Rivas, P. G. 1999. Elementos e importancia del diagnóstico de problemas fitosanitarios 52: 1-15.
- Chet, I. 1990. Biological control of soilborne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. Pages 112-116, in: *Biological control of soil-borne plant pathogens*, D. Hornby ed. C.A.B. International.
- Chet, I. and Baker R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 70:994-998.
- Chet, I. and Ibar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37-43.
- Chet, I., Ibar, J. and Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. Pages 165-192, in: *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, D.T. Wicklow and B. Soderstrom, eds. New York: Springer Verlag.
- Chien, P. J. and Chou, C. C. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1964-1969.
- Cornell, University. 2014. <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/images/BIO/PHYTlifcycle.jpg> (Consultada Octubre de 2013).

- Cruz-A., M., y Cisterna-O., V. 1998. Control Integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento I. Efecto de hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas. Agricultura Técnica (Chile) 58 (2): 81-92.
- El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., and Asselin A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82:398-402.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., and Fouad, D. 2010. Chitosan in plant protection. Marine Drugs 4: 968-987.
- Elad, Y. and Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. Phytopathology 77: 190-195.
- Elad, Y., Katan, J. and Chet, I. 1980. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. Phytopathology 70:418-422.
- Erwin, D., y Ribeiro K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society.
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Requena, M. E., y Candela, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei-Ziyani*, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26:69-78.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea Gilabert, C. and 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.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea Gilabert, C., Requena, A. and Candela, M. E. 2009. Biological control of *Phytophthora capsici* root rot of pepper (*Capsicum annuum*) using *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma harzianum*. Journal of Applied Biosciences 13: 745 – 754.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Pérez Sánchez, C., Egea, G. C. y Candela, M. E. 2003. Mecanismos de biocontrol de la “tristeza” del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal. Palma de Mallorca, España.
- Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M., Pinto, V. M. 2007. Efecto de aplicaciones de fungicidas sobre la incidencia de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo.) del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 25:186-189.

- Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G. y Fernández-Pavía, Y. L. 2008. Enfermedades forestales y de cultivos agrícolas en el Estado de Michoacán. *Biológicas* 10: 28-38.
- González-Chavira, M. M., Torres Pacheco, I., y Guzmán Maldonado, H. 2002. Patógenos involucrados en la marchitez del chile. Proceedings of the 16th International Pepper Conference Tampico, Tamaulipas, México. November. pp. 10-12.
- Goodman, W. G. 1989. Chitin: A magic bullet. *The Food Insects Newsletter* 2 (1): 6-7.
- Granke, L.L., Windstam, S.T., Hoch, H.C., Smart C.D. y Hausbeck, MK. 2009. Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. *Phytopathology* 99 (11): 1258-1264.
- Guígon, L. C., y González, G. P. A. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1): 49-56.
- Gutiérrez-Núñez, M. S. 2014. Evaluación de *Trichoderma harzianum* y materia orgánica para el manejo biológico de *Phytophthora capsici* en suelo y planta de chile. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hirano, S. 1978. A facile method for the preparation of novel membranes from *N*-acyl and N-arylidine chitosan gels. *Agricultural and Biological Chemistry* 42: 1938.
- Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology* 8: 276–281.
- Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160: 859–863.
- Lamour, K. 2009. *Phytophthora capsici*: Sex, selection and the wealth of variation Pages 165-177, in: *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, interactions and Research Tools*. K. Lamour y S. Kamoun, eds. Wiley-Blackwell. USA.
- Li, H. and Yu, Y. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 269-274.

- Li Z., Long W., Zheng, J. and Lei, J. 2007. Isolation and identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong Province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation. *Frontiers of Agriculture in China* 1 (4): 377-381.
- McCormick, C. L., Anderson, K. W. and Hutchison, B. H. 1982. Controlled activity polymers with pendent bound herbicides. *Polymer Reviews* 22: 57-87.
- Palma, G., Casals, P. and Cárdenas, G. 2005. Synthesis and characterization of new chitosan-Oethyl phosphonate. *Journal of the Chilean Chemistry Society* 50: 719-724.
- Papavizas, G. C., Lewis, J. A. and Abd-Elmoity, T. H. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72:126-132.
- Paz-Lago, D., Cabrera, G., Ramírez, M., Pombo, R. y Gutiérrez, A. 1999. Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales* 20: 59-61.
- Pérez, M. L., Medina, L. J. O. y Salinas, G. J. G. 1990. Control genético y químico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) causada por el hongo *Phytophthora capsici* Leo. en la Región de Irapuato, Gto. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8(1): 71-76.
- Pozo, C. O. 1983. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el cultivo del chile. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D. F. 20 pp.
- Pozo, C., O., Montes, S. H. y Rendon, E. J. 1991. Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, AC. Chapingo, Méx., México. 219, 226- 228 p.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31: 603-632.
- Ristaino, J. B. 1990. Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. *Phytopathology* 80:1253-1259.
- Rodriguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L. y Bautista-Baños, S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 15: 307-317.

- Roller, S. and Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47:67–77.
- Sid-Ahmed A., Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C. and Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus spp.* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 633-637.
- Sid-Ahmed, A., Pérez-Sánchez, C. and Candela, M.E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824.
- Sneh, B. and Y. Henis. 1972. Production of antifungal substances active against *Rhizoctonia solani* in chitin amended soil. *Phytopathology* 62: 595-600.
- Strashnov, Y., Elad, Y., Sivan, A. and Chet I. 1985. Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology* 34: 146-151.
- Teixeira, M. A., Paterson, W. J. Dunn, E. J., Li, Q. Hunter, B. K. and M. F. Goosen. 1990. Assessment of chitosan gels for the controlled release of agrochemicals. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 29: 1205-1209.
- Xu, J. G., Zhao, X. M., Ha, X. W. and Du, Y. G. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 220-228.
- Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.
- Yu, R. and Hang, Y. D. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L (+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters* 11: 597-600.
- Yu, T., Li, H. Y., Zheng, X. D. 2007. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology* 114:261–266.

## Anexos

### Anexo 1. Macro y micronutrientes utilizados en plantas de chile con tratamientos.

No	Nutriente	Fórmula	Concentración g/L	mg/Kg de sustrato	mL de solución/kg sustrato	mL de solución aplicados por planta
1	Sulfato de potasio	$K_2SO_4$	25.0	75.0	3	9
2	Cloruro de calcio	$CaCl_2$ $2H_2O$	25.0	75.0	3	9
3	Sulfato de cobre	$CuSO_4$ $5H_2O$	0.7	2.1	3	9
	Sulfato de zinc	$ZnSO_4$ $7H_2O$	1.8	5.4		
	Sulfato de manganeso	$MnSO_4$ $H_2O$	3.5	10.5		
	Sulfato de cobalto	$CoSO_4$ $7H_2O$	0.13	0.39		
	Sulfato de Magnesio	$MgSO_4$ $7H_2O$	15.0	45.0		
	Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4$ $2H_2O$	0.06	0.18		
4	Nitrato de amonio	$NH_4NO_3$	28.57	86.2	3	9
5	Fosfato de potasio	$KH_2PO_4$	43.93		3	9

## **Anexo 2. Agar Harina de Maíz Selectivo para *Phytophthora***

Para 1 L de medio de cultivo

- 1) Disolver 17 gr de agar harina de maíz (AHM) en un litro de agua destilada. El AHM debe agregarse primero y posteriormente el agua.
- 2) Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 20 minutos.
- 3) Enfriar el medio en baño María a 49°C por 30 minutos.
- 4) Vaciar en cajas petri en campana de flujo laminar.

Enfriar un poco el medio y agregar 2 ml de los siguientes antibióticos por cada litro de medio de cultivo:

- PCNB
- Natamicina (Delvocid)
- Ampicilina
- Rifampicina
- Hymexazol

NOTAS: Se debe considerar el volumen de los antibióticos al momento de agregar el agua destilada al medio de cultivo, por ejemplo si se prepara 1L de medio se agregan solamente 990 ml de agua destilada puesto que 10 ml corresponden a los antibióticos.

- Adicionar los antibióticos completamente descongelados y asegurarse de que la temperatura del medio se ha estabilizado a 49°C.
- Cubrir la rifampicina y el PCNB con papel durante el descongelamiento, son altamente sensibles a la luz.
- Una vez gelificado el medio, cubrir las cajas petri con papel aluminio antes de almacenarlas para evitar la degradación de los antibióticos por la luz.

MODO DE PREPARACION DE LOS ANTIBIÓTICOS Y FUNGICIDAS PARA MEDIO SELECTIVO

	Ubicación	Concentración 1L de medio de cultivo	Para 20 ml STOCK	Para 10 ml STOCK
PCNB Antifungico	ID M19/Gaveta 4	0.19 g/L	1 g	0.5 g
Delvolid Antifungico		0.02 g/L	0.2 g	0.1 g
Ampicilina Antibacterial		0.27 g/L	2.7g	1.35 g
Rifampicina Antibacterial		0.01 g/L	0.1 g	0.05 g
Hymexazol Antifungico		0.075 g/L	0.75 g	0.375 g