



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL

MICROENCAPSULACIÓN DE *Trichoderma viridae* CONTRA LOS
PRINCIPALES HONGOS FITOPATÓGENOS DE LA RIZÓSFERA DEL
JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

IZQUIERDO HERRERA PAOLA

Bajo la dirección de: DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2017



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
DIEPTO. DE EXAMENES PROFESIONALES

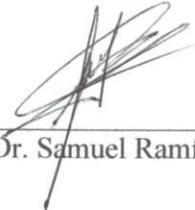


La presente tesis titulada **MICROENCAPSULACIÓN DE *Trichoderma viridae* CONTRA LOS PRINCIPALES HONGOS FITOPATOGENOS DE LA RIZÓSFERA DEL JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)**, fue realizada por **Paola Izquierdo Herrera**, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



Dr. Samuel Ramírez Alarcón

ASESOR:



Dr. Mateo Vargas Hernández

ASESOR:



Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR:



Dra. Leonor Miranda Jiménez

Chapingo, Estado de México, Junio de 2017

MICROENCAPSULACIÓN DE *Trichoderma viridae* CONTRA LOS PRINCIPALES HONGOS FITOPATÓGENOS DE LA RIZÓSFERA DEL JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

MICROENCÁPSULATION OF *Trichoderma viridae* AGAINST THE MAIN PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF THE RHIZOSPHERE OF TOMATO (*Solanum lycopersicum*)

RESUMEN

Encontrar alternativas tecnológicas que permitan un control más eficiente de las enfermedades de los cultivos permite un menor impacto al medio ambiente. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar dos procesos de encapsulación de *T. viridae* que permitieran preservar lo más eficientemente posible los mecanismos de control biológico y reproducción de estos propágulos contra los principales hongos fitopatógenos de la rizósfera del cultivo de jitomate (*Fusarium oxysporum f. e. capsici* (Fu) y *Phytophthora capsici* (Phy)), en condiciones de laboratorio y en condiciones de invernadero. El proceso de encapsulación en bicapa (Bc) arrojó un 66% en comparación con el proceso de encapsulación en combinación de polímeros (Cc) el cual fue de 80 %, Bc tuvo una encapsulación doble de un 59 %, la forma de Bc es irregular y de Cc es esférica; la velocidad de dispersión de BC es hasta un 30 % menor que Cc, mientras que la capacidad de conservación es mayor en Bc por un 63 %. El 79 % de las cápsulas de Bc miden entre 300 y 570 μm ; para Cc el 68 % se encuentran en el rango de 225 a 360 μm . Las cápsulas en Bc se encuentran en los rangos de peso de 24 a 154 μg /cápsula, mientras que las cápsulas en Cc pesan entre 229 y 376 μg /cápsula. En la confrontación *in vitro* Bc tiene buenos resultados contra *Phy* al dominar de un 15 hasta un 29 % en su velocidad de crecimiento; Cc mantiene un avance de crecimiento superior a *Fu* en un 7 % y de un 16 % superior contra *Phy*, En las plantas de jitomate Bc actúa como un buen estimulante de crecimiento y un estimulante de biomasa, además, presenta buen control sobre *Phy* y Cc presenta un buen control sobre *Fu*.

Palabras clave: Cápsulas en bicapa, cápsulas en combinación de polímeros, *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, *Phytophthora capsici*, rizosféra.

ABSTRACT

Finding technological alternatives that allow a more efficient control over crop diseases allows less impact on the environment. The objective of this study was to develop two processes of encapsulation of *T. viridae* that allowed to preserve as efficiently as possible the mechanisms of biological control and reproduction of these propagules against the main phytopathogenic fungi of the rhizosphere of tomato crop (*Fusarium oxysporum f. sp. capsici* (Fu) and *Phytophthora capsici* (Phy)), under laboratory conditions and under greenhouse conditions. The bilayer encapsulation process (Bc) yielded 66% compared to the encapsulation process in polymer combination (Cc) which was 80%, Bc had a double encapsulation of 59%, the Bc form was irregular and Cc is spherical; The dispersion rate of BC is up to 30% lower than Cc, while the storage capacity is higher in Bc by 63%; 79% of the Bc capsules measure between 300 and 570 μm ; For Cc 68% are in the range of 225 to 360 μm . Bc capsules are in the weight ranges of 24 to 154 μg / capsule, while the capsules in Cc weigh between 229 and 376 μg / capsule. In the *in vitro* confrontation Bc has good results against *Phy* by dominating its speed of growth by 15 to 29%; Cc maintains a progress of growth superior to *Fu* by 7% and *Phy* by 16%. In the tomato plants Bc acts as a good growth and biomass stimulant; in addition, it shows good control over *Phy* and Cc has good control over *Fu*.

Key words: Capsules in bilayer, capsules in combination of polymers, *Fusarium oxysporum f. sp. Capsici*, *Phytophthora capsici*, rhizosphere.

Datos biográficos



Paola Izquierdo Herrera. Originaria de Texcoco, Estado de México. Nació el 29 de junio de 1987 en Texcoco, Estado de México. Realizó sus estudios de primaria en la escuela “Centro Escolar Nezahualcoyotl”, en Texcoco, la secundaria en la Oficial No. 538 “Nezahualpilli”, en la población de San Simón, Texcoco, Estado de México. Los estudios de nivel medio Superior los realizó en la Preparatoria Oficial No. 47, en el municipio de Papalotla, Estado de México. Los estudios de licenciatura los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, graduándose en 2012 como Ingeniera Agroindustrial. Se desempeñó como prestadora de servicios en la Coordinación de Fomento Agropecuario del Distrito de Desarrollo Rural 075 Texcoco de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2012- 2013). Posteriormente realizó estudios de posgrado en la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo (2014-2016)

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca brindada durante el periodo de mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, en especial al **Departamento de Parasitología Agrícola** y el Programa de **Posgrado en Protección Vegetal**, por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica y profesional.

Al **Dr. Samuel Ramírez Alarcón**, por su inagotable disposición para apoyarme en todo lo necesario para cumplir las metas de esta investigación.

Al **Dr. Santo Morales Vidal**, por su incondicional apoyo en cada etapa de la investigación, así por la asesoría brindada y el material otorgado en las diferentes etapas del proceso de investigación y experimentación.

Al **Dr. Mateo Vargas Hernández**, Por su apoyo y asesoría en la parte de estadística para obtener una interpretación certera de los datos obtenidos en cada experimento llevado a cabo.

Al **Dr. Marcelo Acosta Ramos**, por su apoyo en la etapa de laboratorio, así como la asesoría brindada para la comprensión y el procesamiento de datos en los diferentes experimentos llevados a cabo.

A la Dra. **Leonor Miranda Jiménez**, por su inapreciable apoyo en la etapa de microencapsulación, desde las asesorías hasta la aplicación de los conocimientos, además de permitirme seguir aprendiendo del tema, y usar las instalaciones a su cargo para lograr las metas de esta esta investigación.

A **Tecnologías AgriBest** por la brindarme un espacio así como el uso de equipo y reactivos necesarios para llevar a buen término este proyecto de investigación, del mismo a todo su equipo de trabajo el cual, indudablemente, es el recurso más valioso de esta empresa.

A todos los profesores del posgrado que contribuyeron a mi formación académica, a su dedicación e interés por formar profesionales comprometidos por la ciencia y sociedad mexicana.

A todos mis compañeros que tuve la fortuna de conocer, colegas de profesión y de vida, especialmente a **Angélica María Quíroz Millán** por brindarme su amistad y siempre estar dispuesta a apoyarme en todo lo que estuviera en sus manos, además de permitirme ser su compañera en proyectos que permitieron expandir mi perspectiva personal y profesional; a **Joana Meyer Flores** por el apoyo dado en esta etapa de la vida, demostrando entereza y compromiso por la superación personal; a **José de Jesús Bojórquez Vega**, por ser más que un compañero sino un camarada demostrando que el trabajo en equipo es la habilidad más valiosa en cualquier que podamos aprender y de la cual podamos hacer uso para tener éxito en cualquier proyecto que llevemos a cabo.

A **Maribel Espejel Cervantes**, secretaria de la Coordinación de la Maestría en Protección Vegetal, sin la cual esta meta no hubiera sido posible cumplirla, su compromiso con la comunidad y su amable ayuda ha representado un apoyo invaluable a la formación y cristalización de muchas metas alcanzadas hoy día.

Dedicatorias

A mis padres **José Izquierdo Carrillo y Guadalupe Herrera Espinosa**, por siempre estar apoyándome en cada proyecto que he emprendido, estar dispuestos a guiarme con su experiencia de vida y estar dispuestos a apoyarme con un consejo acertado.

A mis hermanos, **Omar Izquierdo Herrera, Mijail Izquierdo Herrera y José Izquierdo Acosta**, por ser parte importante de mi formación profesional y humana, sin sus enseñanzas ni su incansable búsqueda de superación este camino no sería posible.

A mi familia de corazón, **Ricardo Nava Barajas y María Juana Barajas**, el amor la confianza y el apoyo incondicional han sido herramientas fundamentales para mi superación profesional y personal.

A mi hermana de otra madre, **María del Roció López Cruz**, a quien admiro y respeto y quien es mi ejemplo de fortaleza y determinación.

Índice general

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iii
Datos biográficos.....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatorias.....	vii
Índice general.....	viii
Índice de figuras.....	x
Índice de cuadros.....	xi
Capítulo 1. Revisión de literatura.....	1
1.1 El cultivo de jitomate.....	1
1.1.1 Importancia mundial.....	1
1.1.2 Importancia nacional.....	4
1.1.3 Principales agentes fitopatógenos del suelo en el cultivo.....	5
1.1.3.1 <i>Phytophthora capsici</i>	6
1.1.3.1.1 Importancia.....	6
1.1.3.1.2 Taxonomía.....	6
1.1.3.1.3 Morfología.....	6
1.1.3.1.4 Síntomas.....	7
1.1.3.1.5 Ciclo de la enfermedad.....	7
1.1.3.2 <i>Fusarium oxysporum f.e. capsici</i>	8
1.1.3.2.1 Importancia.....	8
1.1.3.2.2 Taxonomía.....	9
1.1.3.2.3 Morfología.....	9
1.1.3.2.4 Síntomas.....	10
1.1.3.2.5 Ciclo de la enfermedad.....	10
1.2 Manejo de enfermedades.....	11
1.2.1 Manejo biológico.....	11
1.2.1.1 <i>Trichoderma spp.</i>	11
1.2.1.1.1 Descripción.....	11
1.2.1.1.2 Especies principales.....	12
1.2.1.1.3 Mecanismos de control.....	13
1.2.1.1.3.1 Micoparasitismo.....	13

1.2.1.1.3.2 Antibiosis (Metabolitos secundarios)	14
1.2.1.1.3.3 Competencia por nutrientes	14
1.2.1.1.4 Usos en la agricultura	14
Capítulo 2. Caracterización de microencapsulados en bicapa y combinación de polímeros de <i>Trichoderma viridae</i>	16
2.1 Introducción	16
2.2 Objetivos	18
2.3 Materiales y métodos	19
2.3.1 Microencapsulación	19
2.3.2 Caracterización	21
2.4 Resultados y discusión	23
2.4.1 Microencapsulación	23
2.4.2 Caracterización	25
2.5 Conclusiones y recomendaciones	36
Capítulo 3. Confrontación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de cápsulas en bicapa y cápsulas en combinación de polímeros contra los principales hongos fitopatógenos de la rizósfera en cultivo de jitomate	39
3.1 Introducción	39
3.2 Objetivos	41
3.3 Materiales y métodos	41
3.3.1 Confrontación <i>in vitro</i>	41
3.3.2 Confrontación <i>in vivo</i>	43
3.4 Resultados y discusión	45
3.4.1 Confrontación <i>in vitro</i>	45
3.4.2 Confrontación <i>in vivo</i>	50
3.5 Conclusiones y recomendaciones	56
Referencias Bibliográficas	60

Índice de figuras

Figura 1. Producción mundial de jitomates frescos (2010-2013)(FAOSTAT, 2016)	1
Figura 2. Principales productores de jitomate rojo fresco a nivel mundial (FAOSTAT, 2016).	2
Figura 3. Países exportadores de jitomate rojo fresco (FAOSTAT, 2016).....	3
Figura 4. Países importadores de jitomate rojo fresco (FAOSTAT, 2016).....	4
Figura 5. Estados productores de jitomate rojo fresco (SIAP, 2016).....	5
Figura 6. Equipo en el que se elaboraron las cápsulas; Microencápsulador BÜCHI	21
Figura 7. Conteo de propágulos antes (solución de alginato y solución de grenetina) y después del proceso de encápsulación (cápsulas y líquido de captura) en bicapa.	24
Figura 8. Conteo de propágulos antes (solución de polímeros) y después (cápsulas y líquido de captura) del proceso de encápsulación en combinación de polímeros.	25
Figura 9. Diferentes formas de las cápsulas en bicapa y la forma del núcleo de grenetina.	26
Figura 10. Cápsulas en combinación de polímeros, se observa la forma y la cantidad de propágulos en las cápsulas	27
Figura 11. cápsulas en bicapa; (a) cápsula sin núcleo de grenetina, (b) cápsula con núcleo de grenetina visible	28
Figura 12. Crecimiento de micelio de <i>T. viridae</i> encápsulado en bicapa y encápsulado en combinación de polímeros a lo largo de 3 meses. Letras iguales, expresan que no hay diferencia significativa.....	29
Figura 13. Velocidad de liberación de propágulos de <i>T. viridae</i> encápsulados en bicapa y en combinación de polímeros. Barras con letras iguales no son diferentes.....	30
Figura 14. Distribución de tamaños obtenidos en el proceso de cápsulas en bicapa....	32
Figura 15. Distribución de tamaños de cápsulas en el proceso de encápsulación en combinación de polímeros	33
Figura 16. Rango de peso por cápsula y distribución porcentual en cápsulas en bicapa	34
Figura 17. Rango de peso por cápsula y distribución porcentual de cada uno de ellos de cápsulas en combinación de polímeros.....	35
Figura 18. Experimento <i>in vitro</i> , donde se midió el progreso de crecimiento de micelio.	42
Figura 19. Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma viridae</i> sin encápsular contra <i>Fusarium oxysporum f.e. capsici</i> y <i>Phytophthora capsici</i>	47
Figura 20. Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma viridae</i> encápsulado en combinación de polímeros contra <i>Fusarium oxysporum f. e. capsici</i> y <i>Phytophthora capsici</i>	49
Figura 21. Confrontación <i>in vitro</i> <i>Trichoderma viridae</i> encápsulado en bicapa contra <i>Fusarium oxysporum f. e. capsici</i> y <i>Phytophthora capsici</i>	50

Índice de cuadros

Cuadro 1 Escala usada para determinar severidad (Aldana, 2009)	44
Cuadro 2 Crecimiento de la parte aérea y de la parte subterránea sometidas a tratamientos de <i>Trichoderma viridae</i> encapsulada 41 días después de la inoculación de los fitopatógenos.	52
Cuadro 3 Medición de incidencia y severidad (%) en plantas de jitomate sometidas a tratamientos de <i>T. viridae</i> encapsulado a los 41 días después de la inoculación de fitopatógenos de la rizósfera.....	54
Cuadro 4 Peso de biomasa seca y fresca de la parte aérea y subterránea (g) de plantas de jitomate sometidas a tratamientos de <i>T. viridae</i> encapsulados a los 41 días después de la inoculación con hongos fitopatógenos de la rizósfera.....	56

Capítulo 1. Revisión de literatura

1.1 El cultivo de jitomate

1.1.1 Importancia mundial

Como se muestra en la figura 1 se puede apreciar la importancia del cultivo en México y en el mundo. El jitomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Actualmente el jitomate se considera el segundo vegetal más importante en el mundo después de la papa (FAO, 2017).

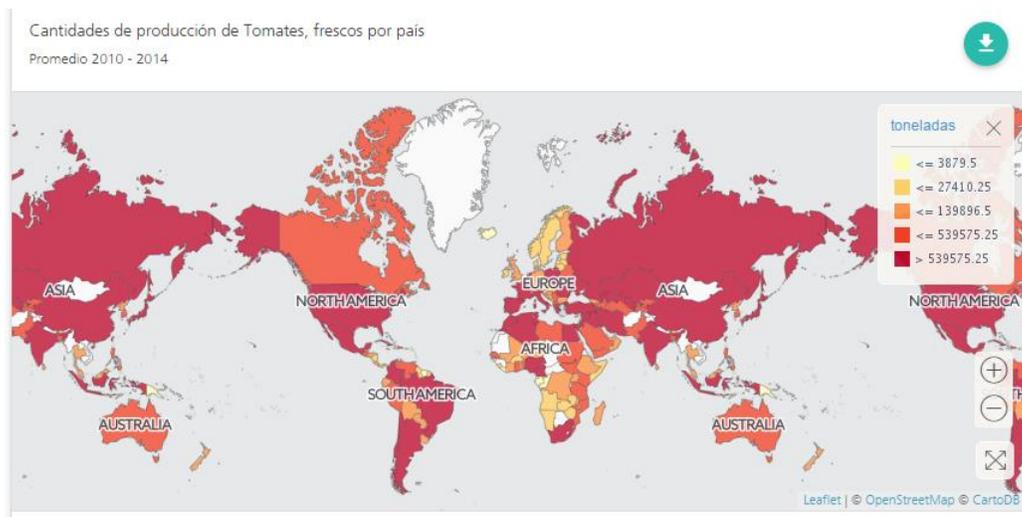


Figura 1. Producción mundial de jitomates frescos de los años 2010 a 2013 (FAOSTAT, 2016)

Los principales productores mundiales de este cultivo en orden de importancia a partir de datos de la FAO hasta 2013 fueron China con una producción de poco más de 50 millones de toneladas que corresponde a un 31% de la producción mundial, el segundo lugar corresponde a la India, la cual produjo 18 millones 200 mil toneladas que representan el 11% de la producción mundial, en México, la producción registrada en 2013 representa el 2% (3,282,583 toneladas) de la producción mundial de jitomates frescos, ubicándolo en el 10º lugar, debajo de países como Turquía y Egipto como de muestra en la figura 2 (FAO, 2017).

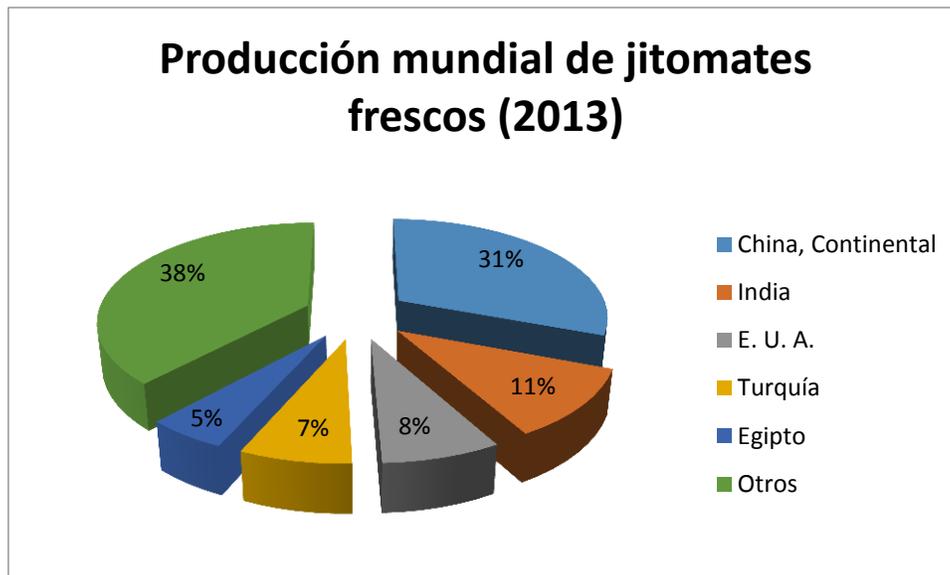


Figura 2. Principales productores de jitomate rojo fresco a nivel mundial (FAOSTAT, 2016).

La globalización ha permitido la distribución de distintos productos agrícolas por las vías de comercialización internacionales, de este modo cultivos como el jitomate pueden estar en estantes en diferentes mercados alrededor del mundo. Las importaciones y exportaciones son indicadores económicos de importancia tanto para los países que proveen del producto como para los que lo solicitan; debido al hecho de que a partir de la demanda se establecen criterios de calidad, de producción y de precios de comercialización para satisfacer las demandas mundiales (Trapaga, 2001).

En cuanto a exportaciones de jitomates frescos; México es el primer exportador a nivel mundial reportando para 2013 una cantidad superior a 1 millón 500 mil toneladas de este cultivo (20% de las exportaciones mundiales) con valor de 1835.2 US\$/t; le siguen los Países Bajos que para ese mismo año reportaron exportaciones de jitomate superiores a un millón de toneladas (13% de las exportaciones mundiales) con valor de 1697.2 US\$/t, y en tercer lugar se encuentra España el cual reportó, para 2013, la cantidad de 1 millón 4 mil toneladas (13% de las exportaciones mundiales del cultivo de jitomate) con valor de 1313.2 US\$/t., como se puede observar en la figura 3 (FAO, 2017).

Es importante recalcar que Estados Unidos es el principal socio comercial que compra jitomate a México, la principal variedad que se consume en dicho país es el jitomate bola, seguido del saladette y del cherry, siendo las variedades principalmente cultivadas en México (Getachew, 2006).

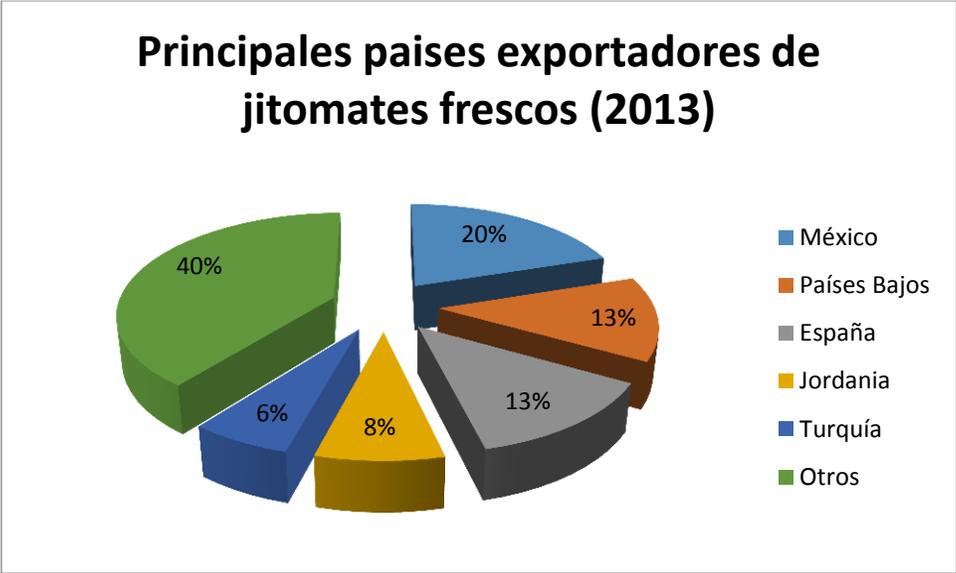


Figura 3. Países exportadores de jitomate rojo fresco (FAOSTAT, 2016).

Para el caso del cultivo de jitomate (Figura 4), el primer importador a nivel mundial es Estados Unidos que para 2013 importó millón 537 mil 403 toneladas (21% de del total de importaciones mundiales del cultivo de jitomate) con valor de 1344.1 US\$/t, en segundo lugar se encuentra La Federación Rusa que para ese mismo año reportó importaciones del cultivo de jitomate por 855 mil 953 toneladas (12%) con valor de 1290.3 US\$/t y en tercer lugar se encuentra el Alemania con 739 mil 361 toneladas (10%) con valor de 1,862.2 US\$/t. (FAO; 2017).

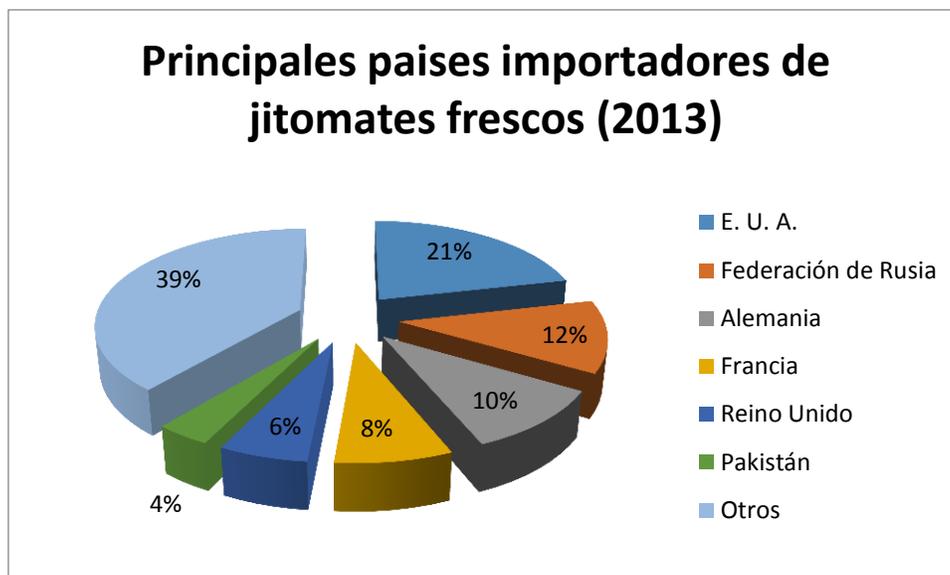


Figura 4. Países importadores de jitomate fresco (FAOSTAT, 2016)

1.1.2 Importancia nacional

Se estima que para la producción de 75,000 hectáreas de jitomate se emplean a 172 mil trabajadores de campo. El cultivo del jitomate trae aparejado consigo mismo una fuerte fluctuación migratoria de personas originarias de estados como Oaxaca, Zacatecas, Guanajuato, Guerrero y Veracruz, principalmente; por ser éstos estados que aportan una proporción considerable de trabajadores agrícolas a las principales regiones de cultivo del jitomate (Ramírez, 2015).

A nivel nacional los principales estados productores de Jitomate para el año 2016 (datos obtenidos hasta el mes de septiembre) ubican en primera posición a Sinaloa con 551,055 ton (31%), seguido de San Luis Potosí con una producción de 179,784 toneladas (10%) y en tercer lugar se ubica Zacatecas con una producción de 132,433 toneladas (7%) y entre los tres producen cerca del 50% de la producción de jitomate a nivel nacional (Figura 5). El estado que mejor rendimiento presenta en la producción de jitomate es Querétaro el cual registra 312.425 t/ha, debido, principalmente a su grado de tecnificación lo cual le provee de una ventaja en rendimiento, en comparación con Sinaloa, por ejemplo, el cual tiene un rendimiento de 47.841 t/ha (SIAP, 2017).

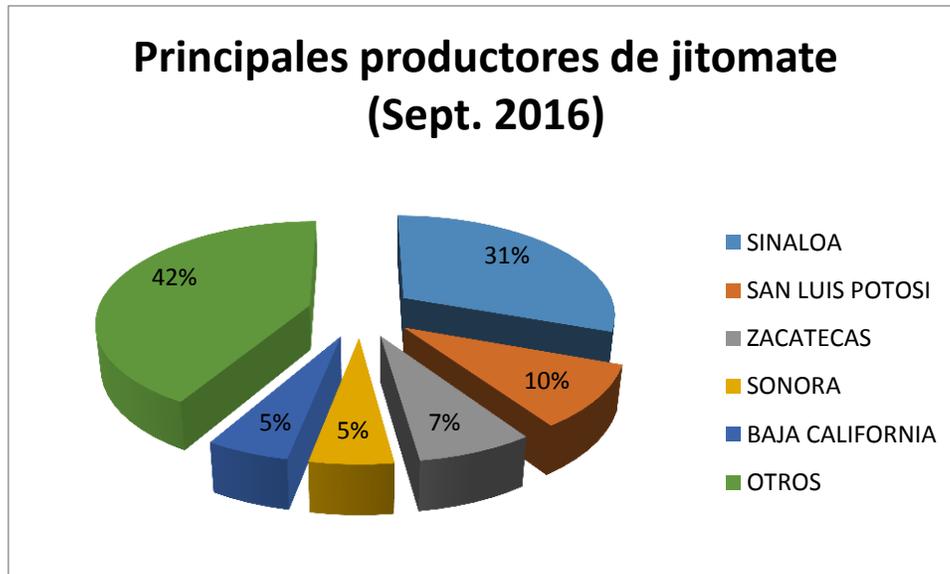


Figura 5. Estados productores de jitomate fresco (SIAP, 2016).

1.1.3 Principales agentes fitopatógenos del suelo en el cultivo

El problema de plagas y enfermedades es uno de los más serios para los agricultores y al que se enfrentan año con año, causando pérdidas considerables en cultivos de importancia comercial, como lo es el jitomate (Chaves, 2010).

Las enfermedades principales se pueden dividir en enfermedades de follaje (*Phytophthora infestans*, *Leveillula taurica* y *Alternaria solani*) y enfermedades de tallo y raíz (*Pytium sp*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum fs lycopersici* y *Phytophthora capsici*) y dependiendo de la severidad de dichos patógenos la perdida puede ser mínima o provocar daños importantes al cultivo y a la economía del productor (Chaves, 2010).

Dentro de las enfermedades las de la base del tallo y raíz suelen ser severas debido a que no solo se infecta la planta sino también el suelo, por lo que no es suficiente eliminar la planta enferma sino que también se hace necesario considerar tratamientos de desinfección al suelo, además si la planta es atacada por una enfermedad de raíz se pierde toda el individuo en comparación con enfermedades de follaje que se puede controlar con relativa facilidad

1.1.3.1 *Phytophthora capsici*

1.1.3.1.1 Importancia

Detectado en México en 1952 por Jorge Galindo, atacando plantaciones de chile en la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México y pueblos aledaños. Debido al aspecto de las plantas infectadas, le nombro "Marchitez del chile", Este hongo ocasiona daños de hasta el 80% en regiones productoras de jitomate en México. También afecta al cultivo de calabaza, pepino, sandía, melón, chile y berenjena (CATIE, 1993).

1.1.3.1.2 Taxonomía (Kirk et. al., 2001)

Dominio: Eucaryota

Reino: Straminipila

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Genero: *Phytophthora*

Especie: *P. capsici* Leonian

1.1.3.1.3 Morfología

P. capsici produce esporangioforos en simpodio simple. Esporangios de forma ovoide, elongada, elipsoidal, fusiforme y piriforme, 60 µm de largo por 36 µm ancho en promedio, generalmente papilados, aunque a veces se presentan con semipapilados. Ocasionalmente se pueden presentar de 2 a 3 papilas por esporangio con un grosor que oscila entre 1.4 a 9.2 µm. Micelio heterotálico, anteridio anfígeno, oogonio esférico o subesférico de 23 a 50 µm de diámetro,

oosporas pletóricas, semitransparentes de 25 a 35 μm , con pared gruesa de 2 a 6 μm . Micelio que puede llegar a ser toruloso de 5 a 8 μm de ancho (Leonian, 1922).

Los esporangios producen zoosporas a 12 $^{\circ}\text{C}$ o germinan directamente a temperaturas mayores de 18 $^{\circ}\text{C}$ (Romero, 1988). Diversos estudios han mostrado la gran complejidad genética del género y con gran variabilidad genética; en 1991, Oudemans y Coffey analizaron 84 cepas aisladas de todo el mundo y lograron ubicar al menos tres grupos: A) CAP1. Subgrupo 1. En su mayoría aislamientos de solanáceas y cucurbitáceas, B) CAP2. Subgrupo 2. Mayoritariamente aislamientos de cultivos tropicales (pimienta negra, cacao, papaya, macadamia y hule) y C) CAP3. Subgrupo 3. Aislamientos de cacao (Chew *et al.*, 2010).

1.1.3.1.4 Síntomas

Marchitez leve a los tres días, y a los cuatro días se marchita completamente. En el tallo en el área del cuello se observa necrosamiento marcado, cuando se corta a ese nivel, se detecta una coloración café oscuro. Las plantas enfermas presentan una banda parda oscura que ciñe el cuello, debido a esto, se marchitan y mueren (Chew *et al.*, 2010).

En las hojas y ramas, se presentan lesiones como tizones de color verde amarillento y después de color café. En los frutos se observan manchas acuosas de color verde claro cubiertas de micelio del hongo. (Chew *et al.*, 2010).

1.1.3.1.5 Ciclo de la enfermedad

Las oosporas son la fuente de inóculo primario, sobreviven más de dos años en el suelo en ausencia de hospedante. El micelio es una fuente importante de inóculo secundario y se ha observado que no sobrevive a más de 7 días en suelo seco. El patógeno vive como saprófito en los restos de materia orgánica y con humedad constante produce esporangios y zoosporas que se distribuye por agua. Las zoosporas son los propágulos más efectivos ya que pueden nadar o arrastrarse por la corriente de agua. Después de determinado tiempo las zoosporas se enquistan para después emitir un tubo germinativo que penetra los tejidos por

medio de apresorios. La lluvia y el drenaje favorecen la infección, por lo que la enfermedad se presenta después del trasplante. La infección inicia por heridas o lenticelas. El marchitamiento se debe a una secreción de toxinas y el taponamiento de vasos conductores. Las lesiones en ramas y hojas se presentan por el inoculo diseminado por salpique del agua de lluvia. Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo son: Alta humedad en suelo y temperaturas frescas, en algunas zonas productoras, la última etapa del cultivo es la más afectada, ya que coincide con la época más lluviosa. En semilla el patógeno solo forma micelio y no sobrevive más de un mes (CATIE, 1993).

1.1.3.2 *Fusarium oxysporum f.e. capsici*

1.1.3.2.1 Importancia

En 1995-98, en numerosos campos de Sinaloa se detectaron plantas de chile con clorosis, flacidez, defoliación parcial y pudrición de raíces y cuello, que en ocasiones ascendió 10-15 cm sobre la base del tallo, afectando la corteza, médula y el sistema vascular; con frecuencia, en la base del tallo se observaron canchales y el desarrollo de micelio blanco y esporodocios de color cremoso. Las plantas murieron generalmente en etapa de fructificación. A partir de las plantas enfermas de campo e invernadero, se aisló consistentemente a *Fusarium oxysporum* (Fo) (datos no publicados). En 1993, García *et al.* reportaron una nueva enfermedad en plántulas de *C. annum* (pimiento morrón), atribuida a *Fusarium oxysporum* y a la cual denominaron pudrición de la corona del chile (PCCH) (Redondo, 1977).

Las pérdidas ocasionada por *F. oxysporum* se estiman entre el 5 y el 15%, pero en cultivos como la soya se reportan hasta el 90%; de 93% en garbanzo y de 21% en clavel (Quiñones, 1980).

1.1.3.2.2 Taxonomía (Kirk et. al., 2001)

Dominio: Eucaryota

Reino: Eumycota

Phylum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Genero: Giberella

Especie: *Nectria haematococa* (Anamorfo:
Fusarium solani)

1.1.3.2.3 Morfología

Fusarium oxysporum se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa- dextrosa agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelio caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Booth, 1970) y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias (Redondo, 1977).

El hongo produce tres clases de esporas: Microconidias, son esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Macroconidias, son esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; y

Clamidosporas, estas son esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales o intercalares, gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Redondo, 1977).

1.1.3.2.4 Síntomas

Lo primero que se observa a campo es un amarillamiento en las hojas basales, posteriormente se marchitan se secan pero permanecen adheridas a la planta. Esta sintomatología va progresando hacia la parte superior de la planta a veces sólo toma un sector de la misma. Al comienzo las plantas muestran marchites en las horas más calurosas del día recuperándose al final del mismo pero finalmente se marchitan y mueren. Las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón (Chew, *et al.*, 2008).

1.1.3.2.5 Ciclo de la enfermedad

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en tejidos muertos del hospedante, estimulados por los exudados secretados por las raíces de las plantas recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis y entran a los vasos del xilema, también las hifas pueden penetrar a través de las heridas hechas en forma mecánica o por nematodos, insectos o miriápodos. Sin embargo, la penetración directa a través de las raíces es el método más común de penetración del patógeno (Chew, *et al.*, 2008) Una vez dentro de la planta, el hongo se mueve hacia el tejido vascular por colonización intracelular a los vasos del xilema y los invade cuando están maduros (Chew, *et al.*, 2008). El patógeno coloniza por crecimiento del micelio o por medio de transporte pasivo de microconidias (Chew, *et al.*, 2008). Este último contribuye a una colonización no uniforme, lo que puede hacer que el material de propagación aparentemente sano resulte afectado (Chew, *et al.*, 2008).

1.2 Manejo de enfermedades

1.2.1 Manejo biológico

1.2.1.1 *Trichoderma spp.*

1.2.1.1.1 Descripción

Las especies del genero *Trichoderma* representa a hongos filamentosos que pertenecen a la clase Euascomycetes. Este hongo se caracteriza por predominar en los ecosistemas terrestres (Suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos), algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbiote de plantas y otras son microparásitas. Los requerimientos de este hongo filamentosos son pocos aunque se ve favorecido por la materia orgánica además de que temperaturas entre un rango de 25 a 30 °C también contribuye a su crecimiento (García *et. al.*, 2006).

Las especies de *Trichoderma* pueden ser identificadas por su morfología distintiva, rápido crecimiento y por la coloración verde o blanco brillante de los conidios. Los conidióforos son hialinos con ramificaciones pareadas que se forman de las hifas en ángulos de 90° y llegan a tener aspecto piramidal y típicamente termina en una o pocas fialides (Kubicek y Harman, 2002).

Las fialides son hialinas, en forma de matraz, se adhieren a los conidióforos por la parte más amplia, pueden ser solitarias o dispuestas en racimos y producen los conidios en el extremo, los conidios son unicelulares y tienen una longitud y anchura menor a los 5 µm, pueden ser globosos, subglobosos, elipsoidales u oblongos, con pigmentación usualmente verdosa (Samuels, 2006).

Las clamidosporas generalmente están presentes especialmente en el micelio sumergido, de manera intercalar o terminal, son globosas o elipsoidales y pueden ser incoloras o de tonos amarillo o verde pálido y en ocasiones con paredes gruesas, no mayores a 15 µm de diámetro (Kubicek y Harman, 2002).

1.2.1.1.2 Especies principales

El género *Trichoderma* tiene cerca de diez especies consideradas como antagonistas de las cuales destacan:

T. harzianum: se le puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su amplia distribución. En el estadio temprano de *T. harzianum* el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. La esporas crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA) a 25 °C. Como hongo antagonista de muchos hongos patógenos puede realizar control biológico sobre agentes patógenos vegetales (Küçük y Kivanç, 2004)

T. koningii: es de los microorganismos más estudiados como agente de biocontrol de enfermedades en plantas. Por su amplia distribución este hongo se puede aislar de tejidos vegetales en descomposición, de los cuales obtiene los monosacáridos que necesita para satisfacer sus requerimientos energéticos. En estudios realizados *in vitro*, se determinó el efecto antagonista que ejerce sobre micelio, esporas y estructuras de resistencia de hongos fitopatógenos que habitan el suelo, como *Rhizoctonia spp.* y *Fusarium spp.* (Durnam *et. al.*, 1999).

T. pseudokoningii, sus colonias crecen rápidamente, con micelio aéreo escaso, inicialmente de color crema, poco a poco, con mechones de color verdoso de la esporulación, inicialmente en el margen, más tarde a toda la colonia; a menudo las colonias se tornan de color amarillento. Las hifas son hialinas, de hasta 10 µm de ancho. Los conidióforos son ramificados de forma piramidal, con ramas cortas cerca de la punta y las ramas más largas en la parte inferior; de ramificación en ángulo recto. Las fiálides se encuentran dispuestas en verticilos indistintos de 1-4, delgado, en forma de matraz, hinchado cerca de la mitad, con cuello relativamente largo, 5.5-8.0 x 2.5-3.5 µm. Los conidios son elipsoidales a cilíndricos, de color verde azulado de paredes lisas en masa, de 3,5-4,5 x 2,0-2,5 µm. Las

clamidosporas, cuando está presentes, son hialinas de paredes lisas, subesférica, hasta el 10 μm de ancho (Harman, 2001).

T. viridae, en este microorganismo las colonias crecen rápidamente y esporulan en 5 días a 30°C en Agar glucosado de Sabouraud, Agar papa-dextrosa y Agar malta. Las colonias son algodonosas al inicio y luego se compactan y esporulan tomando color verde de textura granular y formando parches concéntricos. Presenta hifas hialinas septadas, conidioforos, fiálides y conidios. Los conidióforos son hialinos, ramificados y pueden ocasionalmente se dispone en forma piramidal. Las fiálides son en forma de botella unidas a los conidioforos en ángulo recto. Las fiálides pueden encontrarse solitarias o dispuestas en grupos. Las conidias miden 3 μm de diámetro aproximadamente de forma redonda u ovalada (Mathivanan *et. al.*, 2005).

1.2.1.1.3 Mecanismos de control

Debido a su amplio espectro de especies frente a las que presentan antagonismo, es de los microorganismos que más se han estudiado. Entre los mecanismos de control que se han clasificado esta la producción de compuestos antibióticos, la competición de nutrientes y por último el micoparasitismo (Ezziyyani *et. al.*, 2011).

1.2.1.1.3.1 Micoparasitismo

Trichoderma, organismo que siente la presencia de otro hongo al secretar sustancias degradadoras de pared celular, contiene, mayormente, quinasas, glucanasas y proteasas (Vinale *et. al.*, 2008). Cuando estas sustancias degradan la pared celular del hongo patógeno se liberan moléculas que son detectadas por *Trichoderma*, el cual crece en dirección del patógeno; cuando *Trichoderma* entra en contacto directo con el hongo se adhiere y enrolla alrededor del patógeno y forma estructuras similares a los apresorios que permiten la penetración (Benítez *et al.*, 2004). Adicionalmente produce metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que causan vacuolización, granulación, degradación del citoplasma y lisis celular (Ezziyyani *et. al.*, 2011).

1.2.1.1.3.2 Antibiosis (Metabolitos secundarios)

Entre las sustancias antibióticas que podemos encontrar están la Glicoxina y la Gliovirina, las cuales han demostrado ser excelente inhibidor específico para oomicetos (Viale *et. al.*, 2008). Algunos estudios han demostrado que *Trichoderma* también produce hormonas como auxinas y giberelinas, lo cual favorece el crecimiento de la planta e induce y respuesta y resistencia contra patógenos (Argumedo- Delira *et. al.*, 2009).

1.2.1.1.3.3 Competencia por nutrientes

El uso eficiente de los nutrientes disponibles en el sustrato está basado en la habilidad para obtener ATP metabolizando diversos azúcares como la celulosa, glucanos y la quitina. Adicionalmente, *Trichoderma* secreta moléculas de bajo peso molecular que son quelantes específicos para iones de hierro, esenciales para la viabilidad, llamadas sideroforos, los cuales son principalmente ácidos hidroxámicos (Verma *et. al.*, 2007).

1.2.1.1.4 Usos en la agricultura

El género *Trichoderma* se distingue por ser de los hongos más estudiados y utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, esto por su ubicuidad, su facilidad de aislamiento, cultivo y crecimiento en diversos sustratos, además de no atacar a plantas superiores (Ezziyyani *et. al.*, 2004).

Existe una gran variedad de estudios que demuestran la efectividad de las diferentes especies de *Trichoderma* como agentes de control hongos y oomicetos que causan diversas enfermedades. Dependiendo de la cepa, su uso en la agricultura puede ser diverso, como la colonización de la rizósfera, control de patógenos mediante diversos mecanismos, mejora en la salud de la planta y una estimulación en el crecimiento de las raíces (Harman *et. al.*, 2004).

Existen gran número de productos comerciales y patentes de *Trichoderma* distribuidos en más de 100 países y se estima que ha creado un mercado a nivel

mundial de más de un billón de dólares (Lorito y Woo, 2015). El primer producto registrado y utilizado en invernaderos y viñedos fue el aislado T39 de *T. harzianum* (Trichodex®) en Israel (Hajieghrari *et. al.*, 2008).

Capítulo 2. Caracterización de microencapsulados en bicapa y combinación de polímeros de *Trichoderma viridae*

2.1 Introducción

La encapsulación se define como una técnica por la que gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa (Araneda y Valenzuela, 2009), esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Fuchs *et al.*, 2006). De igual manera el término de microencapsulación en la industria alimentaria, cuando se encápsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, aunque los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se emplean indistintamente (Yañez *et al.*, 2002).

El proceso de microencapsulación se puede llevar a cabo por diferentes métodos agrupados en tres métodos generales (Chandramouli *et al.*, 2003). El proceso de Secado por aspersion es un proceso físico. Entre los métodos químicos existentes se encuentran la polimerización interfacial e incompatibilidad polimérica (recomendado para materiales solidos). Entre los métodos fisicoquímicos se pueden encontrar opciones como coacervación (conveniente para evitar pérdidas por oxidación o volatilización), elaboración de liposomas y gelificación iónica (Mandal *et al.*, 2006).

La elección de la metodología a usar dependerá de factores como la disponibilidad de equipo, el material a encápsular y el polímero de encapsulación (Mandal *et al.*, 2006).

El tipo de agente encapsulante empleado tendrá influencia sobre la estabilidad de la emulsión antes de secar, sobre el tamaño de partícula, las propiedades y sobre la vida útil del material encapsulado deshidratado. Los agentes encapsulantes más utilizados en microencapsulación son (Chandramouli *et al.*, 2003).

Materiales inorgánicos como el silicato de sodio ha demostrado ser un poderoso encapsulante de materiales peligrosos, en procesos de biorremediación, convirtiendo productos solubles en insolubles, volátiles en no volátiles. Asimismo, los compuestos orgánicos quedarán recubiertos por el silicato, reduciendo su potencial riesgo de contaminación. Los componentes activos adecuadamente encapsulados cambian sus propiedades físico-químicas, haciéndoles resistentes a la acción del viento, lluvia y ataques ácidos (Lussier *et. al.*, 2003).

Lípidos como ceras, parafinas, aceites o grasas. Se utilizan sobre todo para formación de liposomas. Algunos de los más efectivos son los aceites hidrogenados como el aceite de palma, algodón y soja, que son excelentes formadores de películas capaces de cubrir partículas individuales, proporcionando una encapsulación uniforme (Gharsallaoui *et. al.*, 2007).

Proteínas como gluten, caseína, albúmina, soja, caseinatos y gelatina, siendo esta última de las proteínas más utilizada. Estos agentes encapsulantes poseen alta capacidad emulsionante, generando microcápsulas de tamaño inferior a 2 micrómetros, pero su solubilidad en agua a baja temperatura, el potencial para reaccionar con grupos carbonilos y su alto coste limitan su utilización (Gharsallaoui *et. al.*, 2007).

Gomas como alginato de sodio. Son hidrocoloides extraídos de algas. Debido a sus características de viscosidad, solubilidad y capacidad emulsionante, se utilizan preferentemente como componentes de membrana que reaccionan con iones para inducir formación de geles estables. No son adecuados para retener moléculas no lipídicas de bajo peso molecular (Bertolini *et. al.*, 2001).

Los polímeros, por su bajo coste, fácil adquisición, susceptibilidad a innumerables modificaciones químicas y potencialmente degradables (Resinas vinílicas o Acrílicas, colofonia, polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona, povidona o PVP) (Bertolini *et. al.*, 2001).

Carbohidratos este grupo es numeroso en compuestos, debido a su alta solubilidad acuosa, carácter no higroscópico, vida media alta a temperatura

ambiente y bajo coste son muy utilizados como agentes encápsulantes (ejem. sacarosa, almidón, dextrinas, celulosa y quitosano) (Dutta *et al.*, 2009).

La microencapsulación, proporcionan ventajas en áreas como la agricultura en aplicación de plaguicidas en sus formas convencionales (polvo, emulsiones, cebos y pulverizables), estos se emplean directamente en el área requerida, contaminando ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos y, en consecuencia, afectando a la población humana y animal, tanto por contacto directo como indirecto. Una preocupación de la industria de plaguicidas es desarrollar productos más seguros para el trabajador y el medioambiente. En este sentido, la introducción de procesos de microencapsulación, por ejemplo, permite modificar algunas propiedades físico-químicas de los pesticidas mediante formación de dos estructuras, los sistemas reservorio o capsular y los sistemas matriciales (Sainz *et al.*, 2003).

Otra ventaja es la encapsulación de microorganismos benéficos para plantas. El uso de los productos biológicos es una alternativa a los químicos convencionales en agricultura y en auge en los últimos años (Pérez, 2010). En particular los elaborados a base de microorganismos benéficos son los que presentan atractivos beneficios a los cultivos debido a sus múltiples efectos sobre los fitopatógenos (Ibarra *et al.*, 2006). Actualmente algunas técnicas biotecnológicas como inmovilización celular y enzimática se han convertido en una herramienta de manejo de los microorganismos y sus subproductos, lo cual permite mantener o mejorar su actividad protegiéndola de los factores adversos como luz, oxígeno o ataque de otros microorganismos (Alvarez *et al.*, 2009).

2.2 Objetivos

Elaborar microcápsulas con *T. viridae* en dos diferentes presentaciones (bicapa y combinación de polímeros)

Evaluar las características de ambas presentaciones de microcápsulas

Evaluar la viabilidad de *T. viridae* microencapsulado *in vitro*.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Microencapsulación

El proceso de microencapsulación se realizó en el laboratorio de Ganadería en el Colegio de Posgraduados *Campus* Montecillo.

Sepas de *Thichoderma viridae* se obtuvieron de sepas previamente aisladas en laboratorios de Tecnologías Agribest S. A de C. V. Para la encapsulación en bicapa, se disolvió por separado cada polímero (grenetina y alginato de sodio) en agua desionizada, previamente calentada (70 ± 1 °C); para el caso de alginato de sodio se preparó una solución al 1.8% (p/v) y para la grenetina pura se preparó una solución al 10% (p/v); posteriormente se retiró de la parrilla y se esperó a que ambas soluciones llegaran a temperatura aproximada de 34 ± 2 °C, con la finalidad de agregar la solución de microorganismos previamente preparada a 8×10^8 conidios* mL^{-1} y se agitó lentamente hasta obtener una solución homogénea y con conidios uniformemente distribuidos. Previamente se preparó la solución de captura, en donde se disolvió cloruro de calcio al 2% (p/v) y se metió a refrigeración por cerca de 1 hora antes de su utilización.

Una vez preparadas las soluciones se vertieron, cada mezcla, en los frascos del equipo (Figura 6), los cuales constan de tapa con dos orificios (uno para el tubo por que pasa la solución al dispositivo de dispersión del líquido y otro para ejercer presión positiva sobre el líquido y empujarlo hacia dicho dispositivo dispersante), se montó el equipo colocando la boquilla interna (núcleo) con apertura de 200 μm y para la cobertura externa una boquilla con apertura de 300 μm . En el dispositivo de encapsulación; se establecieron los parámetros (presión de 209 ± 1 mba, temperatura de 35 ± 2 °C, vueltas de apertura para el paso de solución, para alginato 1.5 y para grenetina 1). Una vez dispuesto el equipo, la solución de cloruro de calcio se colocó debajo del flujo para obtener las microcapsulas manteniendo con agitación suave durante el proceso para evitar aglutinamiento.

Para el caso de la combinación de polímeros se siguen los mismos pasos descritos hasta adicionar la solución de conidios del microorganismo, para ambos

(alginato de sodio y grenetina) se prepararon a una concentración del 2% (p/v). Ya preparadas las soluciones se procedió a combinarlas en el frasco del equipo de encapsulación pasándolas por filtro para evitar el paso de partículas que puedan obstruir la boquilla. Las condiciones para la obtención de partículas en combinación de polímeros fueron las siguientes: boquilla con apertura de 300 μm , presión a 209 ± 1 mba, 0.5 ± 0.1 vueltas de apertura, a una temperatura de 35 ± 2 °C y el líquido de captura en las mismas condiciones antes descritas.

Se tomaron datos de entrada y de salida del proceso de encapsulación para medir distintos parámetros de rendimiento, se monitoreó el proceso controlando pesos de muestra y volúmenes. Se tomaron muestras de la mezcla de los polímeros antes de ser encapsulados y se tomaron muestras del líquido de captura después de obtener las microcapsulas.

Adicionalmente se pesaron muestras de cápsulas (0.005 ± 0.002 g, en promedio) con el fin de realizar conteo de Neubauer para determinar rendimiento de encapsulación del microorganismo.

Se realizó un Análisis de Varianza individual de las salidas de cada tipo de cápsulas (cápsulas y líquido de captura) y una comparación de medias, mediante el uso del software SAS. Los datos se analizaron con un modelo Lineal General correspondiente a un diseño en Bloques Completos al Azar y se compararon las medias con una prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD, por sus siglas en ingles).



Figura 6. Equipo en el que se elaboraron las cápsulas (en bicapa y en combinación de polímeros); Microencapsulador BÜCHI

2.3.2 Caracterización

Para la caracterización se tomaron en cuenta la forma y el tamaño. Para tal efecto se tomó una muestra de cápsulas, poniéndolas en un portaobjeto y se fijó con cinta adhesiva, la muestra se observó por medio de un microscopio con una cámara adaptada para sacar fotos con la ayuda del programa Zen 2 lite para la medición de estructuras, el cual es un software para captura y análisis de imágenes microscópicas. Se midió el largo y ancho de 30 cápsulas elegidas al azar dentro de la muestra, esto se realizó en 45 repeticiones; en el caso de las cápsulas en bicapa se tomó el largo y ancho tanto de la capa externa como de la capa interna. La forma fue medida de manera visual clasificándolas en forma “esférica”, “ovoide” e “irregular”. Los datos obtenidos se sometieron a una prueba de normalidad para identificar la distribución de tamaños y se analizaron estadísticamente usando un modelo de bloques completos al azar y comparación de medias con una prueba de LSD. Adicionalmente se pesaron 50 muestras de cada tipo de cápsulas (0.0175 ± 0.075 g), posteriormente, con el uso de un microscopio se contaron las cápsulas, esto para poder calcular el peso promedio por cápsula. Con los datos obtenidos se realizó un análisis usando un modelo de Bloque Completos al Azar y se realizó una comparación múltiple de medias usando una prueba de LSD. La fórmula usada para determinar el peso por cápsula fue:

$$\text{Peso de capsula (g/cap)} = \frac{\text{peso de la muestra (g)}}{\text{cantidad de cápsulas en la muestra}}$$

Del mismo modo, para el caso de las cápsulas en bicapa se determinó el porcentaje de cápsulas dispuestas de dicha forma, es decir, la cantidad de cápsulas que efectivamente presentaran el núcleo de grenetina y la cubierta externa de alginato, lo cual se realizó tomando 30 muestras de aproximadamente 0.0125 g, posteriormente se contó el total de cápsulas contenidas en la muestra con ayuda de un microscopio estereoscópico, y luego se hizo el recuento de las cápsulas que contienen el núcleo de grenetina, éste se distingue debido a que las cápsulas presentan un estructura de color blanquecino opaco dentro de la estructura de la cápsula; para optimizar el conteo se agrega a la muestra 4 gotas de agua destilada y con ayuda de una aguja de jeringa se separan las cápsulas para el conteo posterior.

La fórmula usada para la determinación del porcentaje de encapsulamiento en bicapa fue la siguiente:

$$\% \text{ encapsulamiento en bicapa} = \frac{\text{Número de capsulas en bicapa}}{\text{No. total de capsulas}} \times 100$$

También se midió la velocidad de liberación de las cápsulas en combinación de polímeros y en bicapa a lo largo de tres meses, con la finalidad para analizar si las cápsulas conservan la misma capacidad de liberación en un periodo de 60 días y si existe diferencia entre tipos de cápsulas; para ello se tomó una cápsula y se sembró en una placa de Petri con PDA con antibiótico (Ramfipicina; 0.001 g/L y ampicilina; 0.25 g/L), y se midió el crecimiento diametral del micelio por 5 días, este procedimiento se realizó con 5 repeticiones y cada repetición contó con 5 placas. Los resultados se analizaron en tres fases diferentes, la primera fue usando un modelo estadístico correspondiente a un diseño en Parcelas Divididas para obtener una análisis generalizado del experimento, en la segunda etapa se analizó como un Experimento Factorial para obtener un análisis sobre cada lapso de 30 días en los cuales se llevó a cabo el experimento y por último se analizaron los datos individualizados para cada tratamiento en cada día de medición por cada

lapso en el que se realizó el experimento, usando un modelo estadístico correspondiente a un Diseño Completamente al Azar, adicionalmente se compararon las medias por medio de una prueba de LSD, esto con la ayuda del software SAS System.

También se evaluó la capacidad de las cápsulas de conservar viables los propágulos en un lapso de 60 días, con el fin de saber si la cobertura efectivamente protege de las condiciones ambientales al microorganismo *T. viridae*. Para ello se sembró una cápsula en cultivo PDA y un posterior conteo de propágulos por medio del conteo por Cámara de Neubauer en los días 3, 4 y 5 después de la siembra; los resultados obtenidos se analizaron de la misma forma que en que se analizaron los datos de velocidad de dispersión.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Microencapsulación

Tanto para cápsulas en bicapa como cápsulas en combinación de polímeros se realizaron conteos de Neubauer de soluciones de polímeros antes del proceso de encapsulación y después de este.

En cuanto al análisis de varianza del proceso se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.009$) entre la proporción de encapsulación en las cápsulas en bicapa y las de combinación de polímeros, lo cual es congruente con lo que se presenta gráficamente.

Las figuras 7 y 9 muestran las concentraciones de esporas antes y después del proceso de encapsulación. El porcentaje de encapsulación determina la cantidad real de material que está dentro de las cápsulas, a partir de este dato se puede determinar la eficiencia del proceso y por lo tanto si es un método viable para aplicar a gran escala.

Para encapsulación en bicapa se obtuvo 67% de encapsulación de *T. viridae* (figura 7) este porcentaje no es tan alto como el que se reporta en encapsulaciones de alginato con el mismo método (por aspersion), la cual puede

reportar porcentajes de encapsulación del 96 al 100% (Bastos *et. al.*, 2009), sin embargo estos reportes solo son con una capa; en el caso de encapsulación en bicapa deben, también, involucrarse las características del segundo polímero (grenetina), el cual repercutirá en el resultado final.

En este caso la estructura molecular del alginato de sodio al endurecerse forma redes y por consecuencia se forman poros sin embargo los microorganismos quedan atrapados inmediatamente en la red del polímero, lo cual hace que la encapsulación sea altamente efectiva; por otro lado la grenetina, a pesar de que también forma redes moleculares, necesita de condiciones de temperatura cercanas a los 4 ± 1 °C además de que el líquido en el que se obtienen las perlas debe ser de naturaleza oleosa (aceite, p. e.) lo que da tiempo a las cápsulas de grenetina de endurecerse y atrapar mayor cantidad de microorganismos (Kwak *et. al.*, 2001).

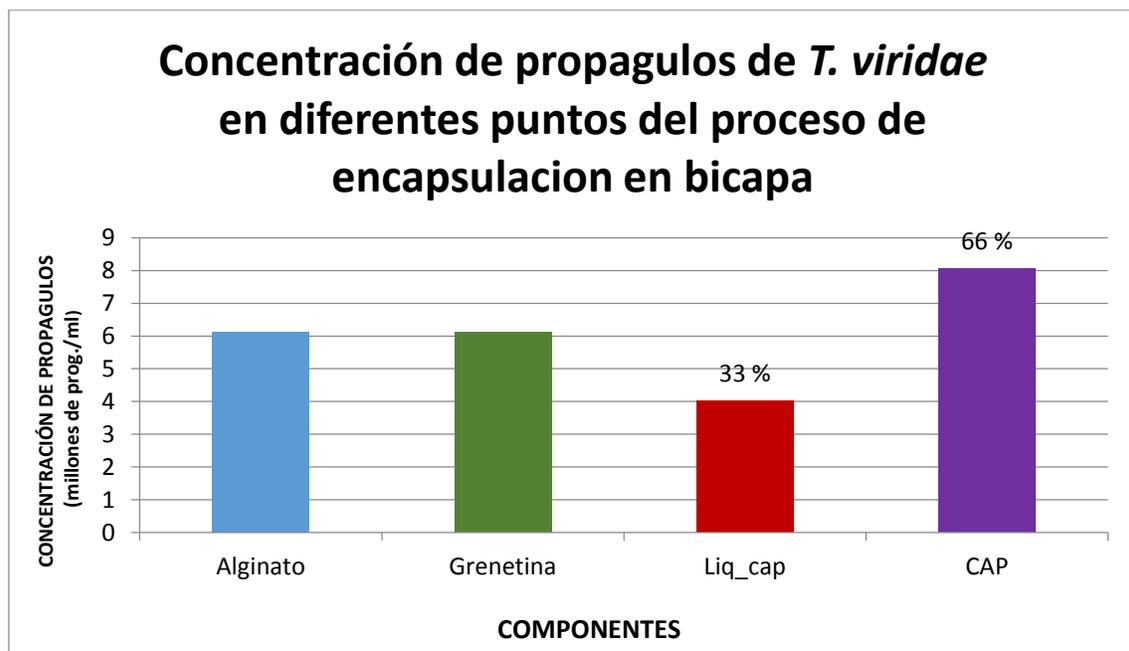


Figura 7 Conteo de propágulos antes (solución de alginato y solución de grenetina) y después del proceso de encapsulación (cápsulas y líquido de captura) en bicapa.

Para el caso de cápsulas en combinación de polímeros, presenta un porcentaje de encapsulación del 81%, lo cual representa un valor cercano a valores de

encapsulación con alginato, lo que indica que las redes poliméricas se endurecen a buena velocidad (15% superior a las cápsulas en bicapa) aunque no iguala a los valores que reportan los autores sobre encapsulación con alginato sólo; una de las causas es la grenetina, la cual juega un papel importante en el resultado obtenido, en este sentido, al combinar la grenetina y el alginato de sodio la redes no pierden las cualidades del alginato, como es la velocidad de endurecimiento y adquieren la complejidad de construcción de la red, produciendo poros más pequeños y por lo tanto un mayor porcentaje de encapsulación en comparación con cápsulas en bicapa.

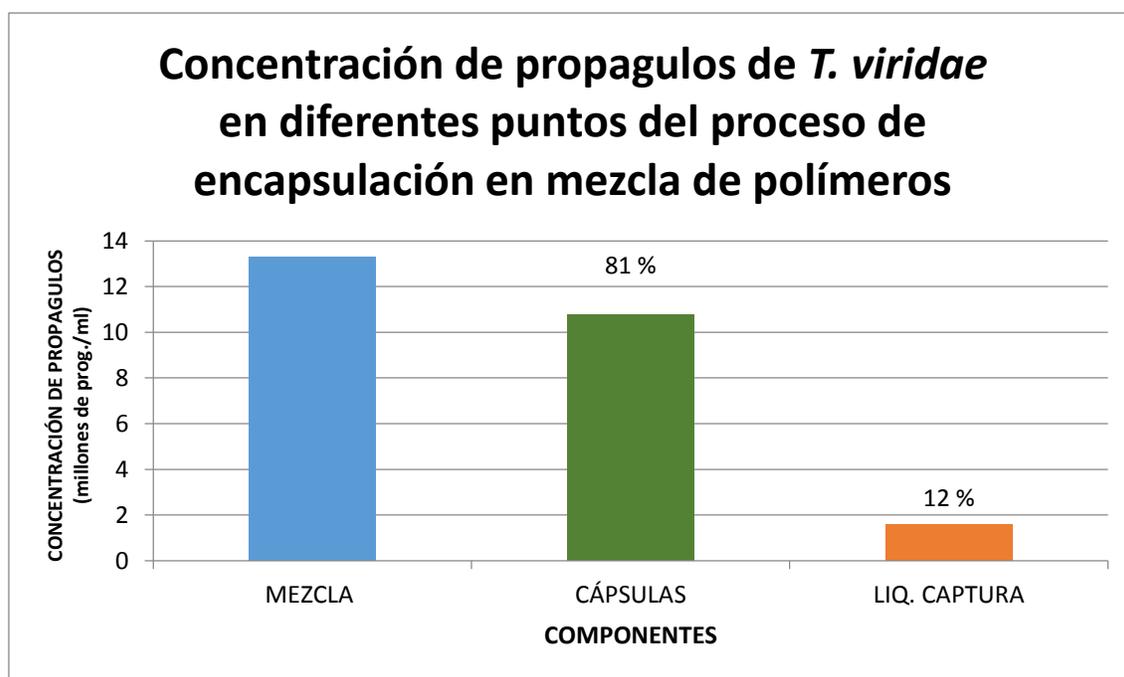


Figura 8 Conteo de propágulos antes (solución de polímeros) y después (cápsulas y líquido de captura) del proceso de encapsulación en combinación de polímeros.

2.4.2 Caracterización

La forma es una característica relativamente importante para la elaboración de cápsulas, puesto que puede representar una ventaja o desventaja; por ejemplo, una cápsula que en ves que este esférica este ovoide puede ampliar el área de

contacto y por lo tanto hay posibilidad mayor para la liberación, o por el contrario, las cápsulas con forma más esférica tiene la oportunidad de llegar a su destino sin que se desvíen o se queden atorados en vías intermedias (Rivas, 2010).

En el caso particular de las cápsulas en bicapa, se presentan las condiciones ideales para el endurecimiento óptimo del alginato, sin embargo para la gretina solo la variable de temperatura se cumple, lo cual provoca que el endurecimiento de la gretina no se lleve a cabo a la misma velocidad del alginato de calcio, lo cual ocasiona el escurrimiento de la gretina por los poros del alginato, antes mencionados, provocando disminución el en porcentaje de encapsulación. Este fenómeno repercute, al igual que variables como la presión o temperatura, en la forma de las cápsulas; debido a que la gretina se endurece de manera más lenta con respecto al alginato de sodio, hace que la red de alginato se estire por el movimiento interno de la gretina resultando en estructuras irregulares, u ovoides en la mayoría de los casos (Figura 9).

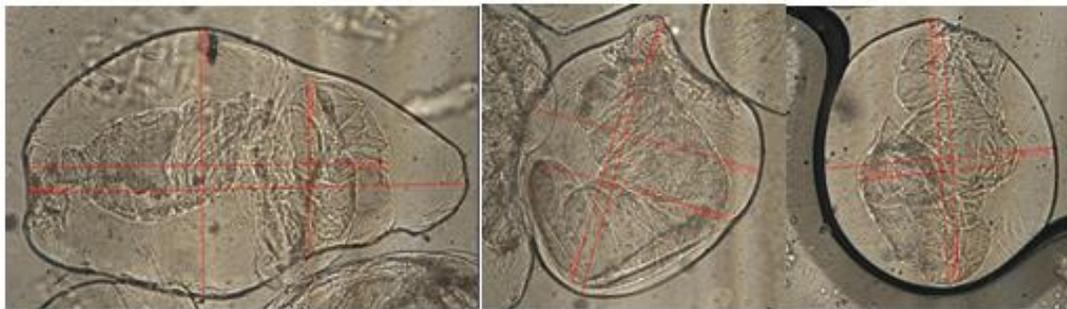


Figura 9 Diferentes formas de las cápsulas en bicapa y la forma del núcleo de gretina.

Como se puede observar en la figura 10 las cápsulas obtenidas con la combinación de polímeros, las cápsulas presentan forma homogénea además se puede observar una mayor cantidad de propágulos encapsulados a diferencia de la cubierta en las cápsulas en bicapa, es decir, en este caso la gretina genera redes más intrincadas y por lo tanto poros más pequeños, esto es, al combinar ambos polímeros se conserva la velocidad de endurecimiento del alginato y como consecuencia la construcción de cápsulas tiene forma esférica más uniforme, por otro lado se entreteje una red más intrincada con poros más pequeños debido a la

estructura de grenetina, atrapando, de esta manera, mas propágulos al momento del contacto con el líquido de captura dejando libre solo el 12% de propágulos.

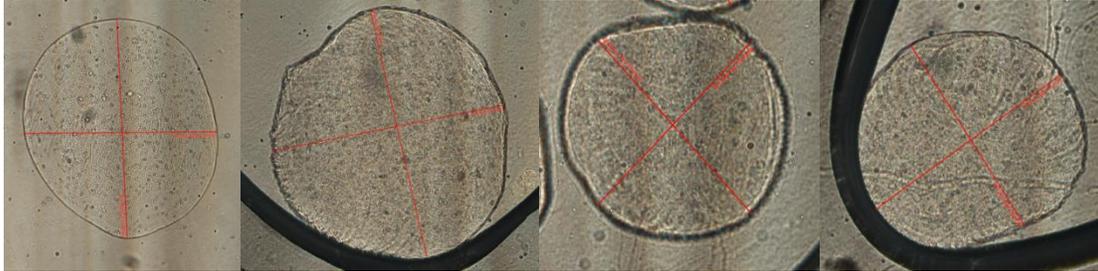


Figura 10 Cápsulas en combinación de polímeros, se observa la forma y la cantidad de propágulos en las cápsulas

El proceso de encapsulación en bicapa se lleva a cabo normalmente en la elaboración de liposomas en las cuales se forman cápsulas de uno o varias capas de fosfolípidos atrapando sustancias lipofílicas (comúnmente), la cantidad de capas, entre otras variables definen la velocidad de liberación del compuesto encapsulado (Yañez *et. al.*, 2002). Usar doble encapsulación en sistemas de aspersión con microorganismos tiene como objetivo darle mayor protección contra variables ambientales adversas así como maximizar el aprovechamiento de los beneficios de estos microorganismos, sin embargo, al ser un proceso trasladado se deben tomar en cuenta la eficiencia del proceso, en este caso, el porcentaje de encapsulación doble; el proceso mostró porcentaje de encapsulación promedio del 58.7% el cual es bajo en comparación con la encapsulación por liposomas.

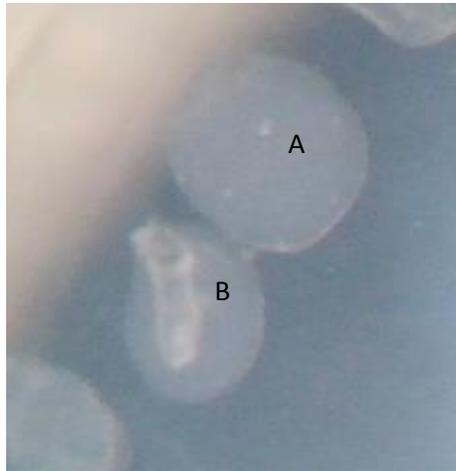


Figura 11 cápsulas en bicapa; (a) cápsula sin núcleo de grenetina, (b) cápsula con núcleo de grenetina visible

La microencapsulación se desarrolló como una técnica para proteger las diferentes sustancias y microorganismos de interés por lo tanto una de las características importantes es la capacidad de mantener viables los productos de interés (Favaro *et. al.*, 2010).

Cuando el objetivo es encapsular microorganismos lo que se persigue es que dichos organismos sean protegidos por condiciones de entorno adversas o incluso otros microorganismos. Este aspecto cobra importancia en el ramo de la agricultura debido a que los microorganismos están expuestos a condiciones ambientales (radiación solar, temperaturas extremas, humedad o sequía, etc.).

Las cápsulas, debido a la diferencia del proceso llevado a cabo, es importante medir su capacidad de protección en la viabilidad de los microorganismos. En la figura 12 se observa el conteo de esporas con separación de 30 días entre ellos, su progreso y como el tiempo de elaboración repercute en la viabilidad de los propágulos encapsulados.

El análisis de varianza mostro diferencia significativa ($\alpha = 0.0008$) entre los meses en los que se llevó a cabo el experimento, lo que indica un cambio de las cápsulas entre el día en que se elaboraron y el tiempo en que se usan de igual manera se mostro diferencia significativa ($\alpha = <0.0001$) entre los tratamientos (cápsulas en

bicapa y cápsulas en combinación de polímeros), a través de los lapsos de 30 días entre siembra de cápsulas y los días de medición.

En lo que respecta a las cápsulas en bicapa se puede observar mejor desempeño con respecto de las cápsulas en combinación de polímeros, por ejemplo la diferencia entre las últimas mediciones entre el mes 1 y 3 de las cápsulas en bicapa solo es de un 19% de disminución de vigor, en comparación con un 63% menos de vigor en el crecimiento de micelio entre las mismas mediciones en los mismos meses, lo cual indica que las cápsulas en bicapa preservan de mejor manera a comparación de las cápsulas en combinación de polímeros; es claramente visible en la última medición del tercer mes donde la diferencia entre el crecimiento de micelio de *T. viridae* encapsulado en bicapa es claramente superior en 75% más vigor que la encapsulación con combinación de polímeros.

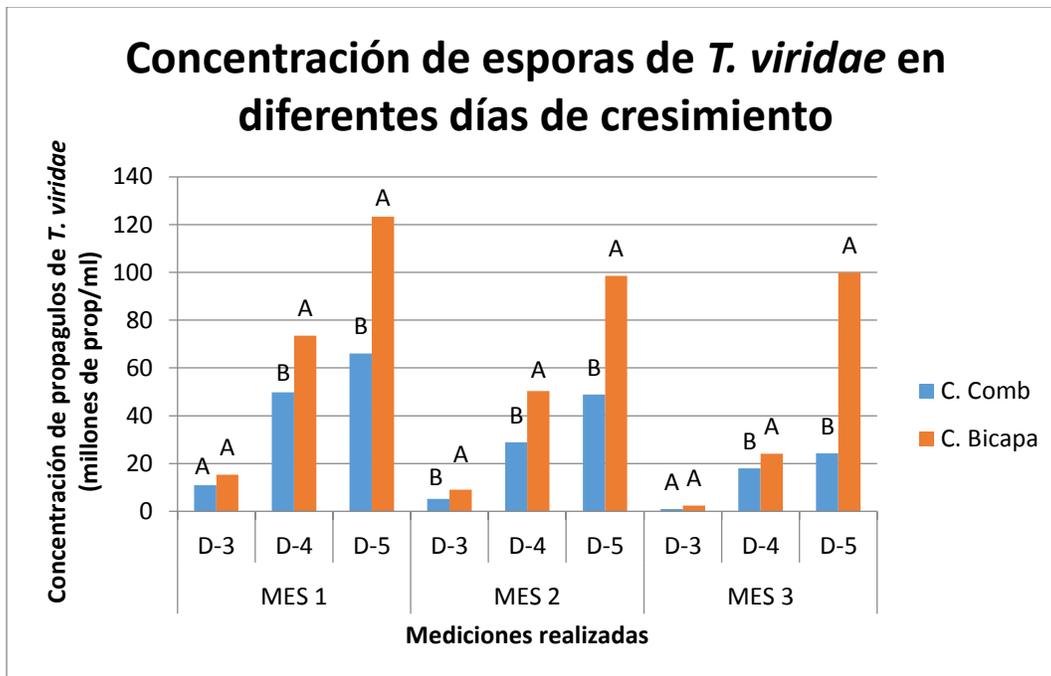


Figura 12 Crecimiento de micelio de *T. viridae* encapsulado en bicapa y encapsulado en combinación de polímeros a lo largo de 3 meses. Letras iguales, expresan que no hay diferencia significativa

Otra característica que se evalúa en el proceso de microencapsulación es la velocidad de liberación de las cápsulas, esta característica es importante ya que determina la efectividad del producto obtenido.

El experimento mostro diferencia significativa ($\alpha = < 0.0001$) entre los lapsos de tiempo entre los que se llevó a cabo los experimentos, lo cual nos indica que si existe una diferencia medible a lo largo del tiempo, del mismo modo también hubo diferencia significativa ($\alpha = < 0.0001$) entre los días de medición a excepción de los días 1 y 2 en el mes 3, esto debido al proceso de envejecimiento de los propágulos de *T. viridae* y por último en el análisis individualizado mostro diferencia significativa ($\alpha = < 0.0001$) entre los tratamientos en cada día de medición en diferentes momentos; donde se muestra una clara diferencia en el último mes donde se observa diferencia visible.

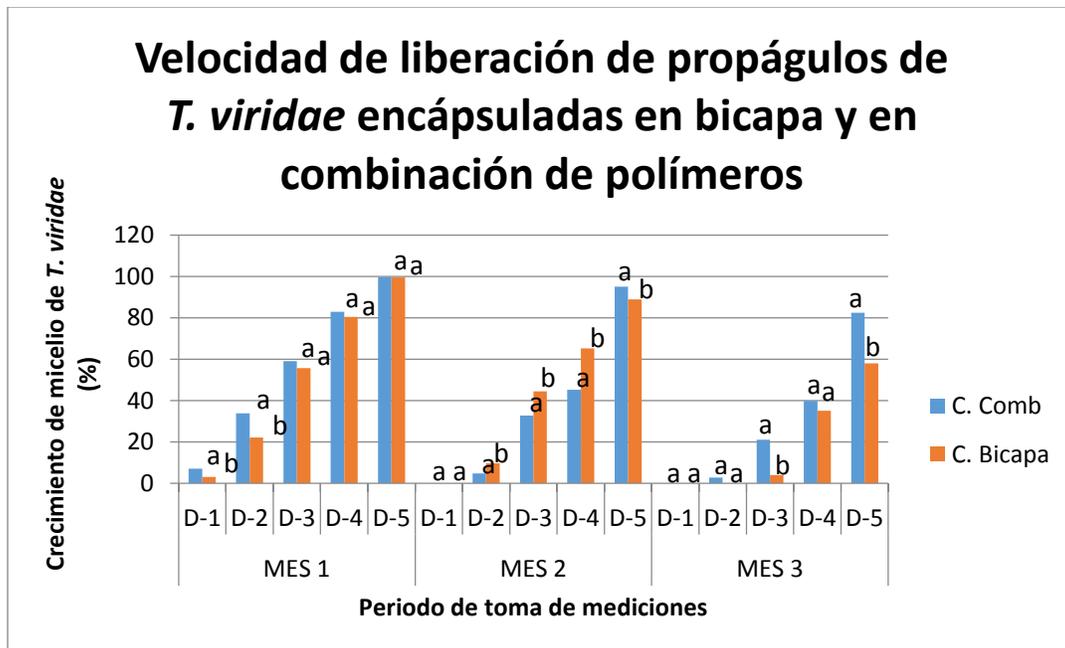


Figura 13. Velocidad de liberación de propágulos de *T. viridae* encapsulados en bicapa y en combinación de polímeros. Barras con letras iguales no son diferentes.

En la figura 13 se observa la velocidad de liberación, tanto en cápsulas en bicapa (naranja) como en cápsulas en combinación de polímeros (azul). Se aprecia como la velocidad de las cápsulas en combinación de polímeros es ligeramente superior a la velocidad que se observa en el caso de las cápsulas en bicapa, las cuales

registran diferencia entre la velocidad de 6 hasta un 30% entre los picos máximos de crecimiento de micelio.

Este comportamiento puede deberse a la misma constitución de las cápsulas; ya que mientras en las cápsulas de bicapa el núcleo se disuelve a menor temperatura y por lo tanto la liberación es más rápida, traspasando la cubierta de alginato por los poros que forman; también hay que considerar la estructura del alginato, que funge como cubierta y que se encuentra como único componente de dicha coraza, permitiendo una retención de tiempo mayor y retrasa la liberación de todos los propágulos, conservándolos dentro de la cápsula.

Por otro lado, las cápsulas en combinación de polímeros, al tener ambos compuestos mezclados permite una liberación relativamente más rápida de los microorganismos, debido a que se generan huecos de mayor tamaño una vez que la gelatina se hidrata y se disuelve por efecto de la combinación de temperatura y humedad.

Otra característica importante que se evalúa en la construcción de cápsulas es el tamaño; esta depende de la boquilla del encapsulador así como de la velocidad y presión con que se está manipulando la mezcla. El tamaño determina su posterior uso y el equipo con que se manipularían, de tal forma si las cápsulas son grandes (500 – 1000 μm), el uso o el equipo se tendría que adaptar para que las mismas cápsulas no obstruyeran el paso.

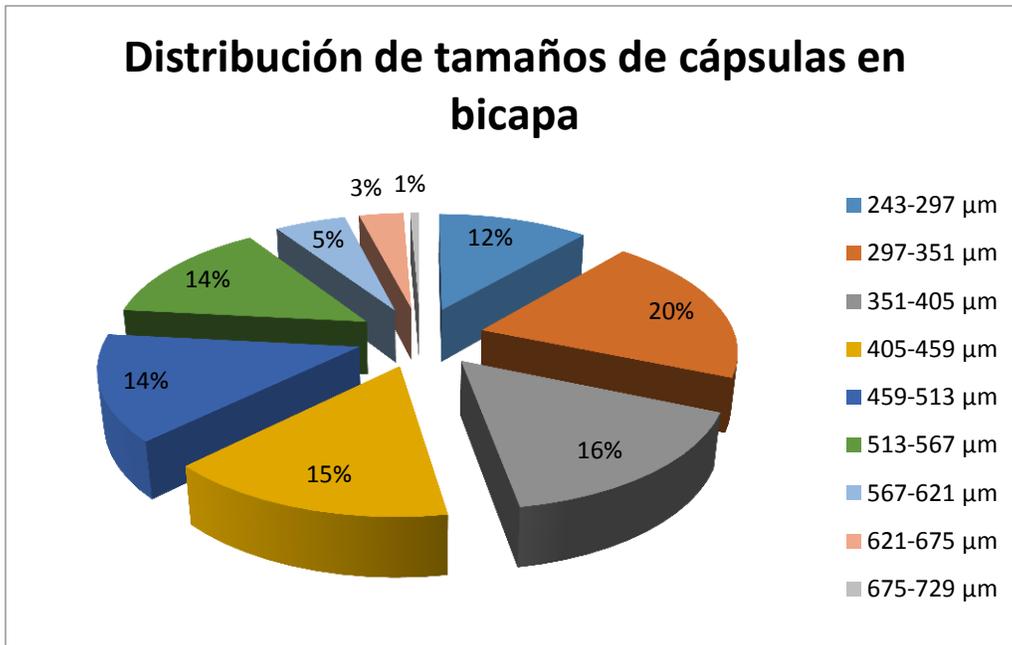


Figura 14 Distribución de tamaños obtenidos en el proceso de cápsulas en bicapa.

En la figura 14 se observa la distribución de tamaños existentes en las cápsulas obtenidas en bicapa, se aprecia una distribución uniforme que oscila entre tamaño de 300 y hasta 570 μm , lo cual puede explicarse con el comportamiento interno que tiene la grenetina con respecto al alginato; la grenetina al tener la velocidad de endurecimiento más lento en comparación al alginato y por la velocidad de agitación en el líquido de captura da oportunidad de que la cápsula pierda su forma regular y de paso una forma de mayor tamaño e irregular dando como resultado la variabilidad de tamaños que se ven en la gráfica, esto constituye el 79% del total de la muestra, lo cual quiere decir que la elaboración de cápsulas en bicapa arroja cápsulas de tamaño superior a los 300 μm , que es el tamaño de la boquilla externa del encapsulador.

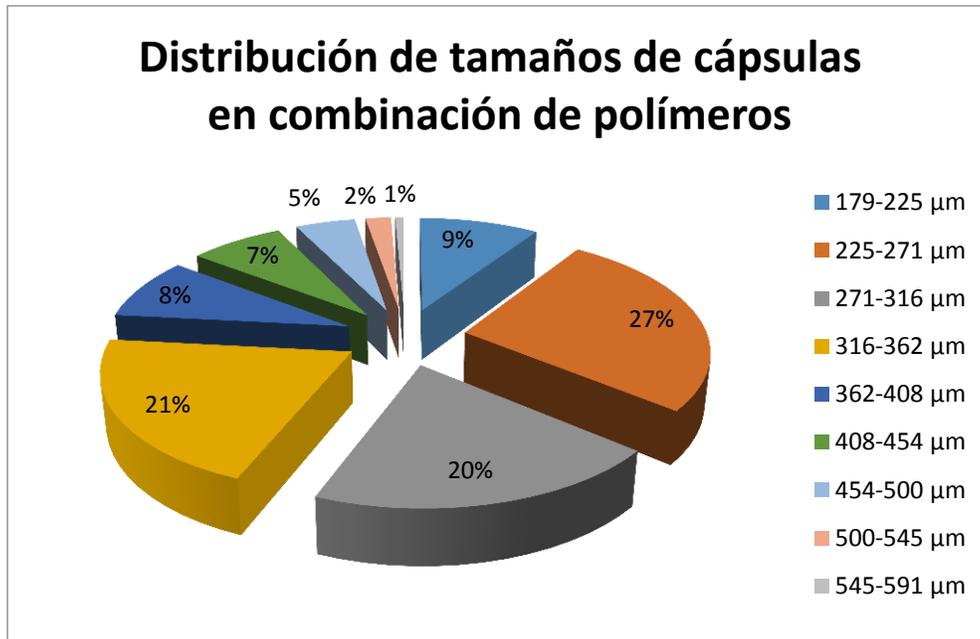


Figura 15 Distribución de tamaños de cápsulas en el proceso de encapsulación en combinación de polímeros

En la figura 15 se observa la distribución de tamaños en el proceso de elaboración de cápsulas en combinación de polímeros; como se aprecia en la gráfica los tamaños predominantes de cápsulas oscilan entre los 225 y 360 µm lo cual constituye el 68% del total de las cápsulas, es decir, el tamaño que en general se encontró en este proceso está en el rango antes mencionado.

El análisis estadístico demostró que si existe diferencia significativa ($\alpha = < 0.0001$) entre los dos tratamientos (bicapa y combinación de polímeros) lo cual es congruente con lo presentado gráficamente. Al comparar ambas graficas se aprecia como es en el proceso de elaboración de cápsulas en combinación de polímeros donde se obtienen las cápsulas más pequeñas, mientras que en el proceso de elaboración de cápsulas en bicapa las cápsulas tienden a ser cerca de 75% más grandes con respecto a las cápsulas en bicapa, este fenómeno es explicado por la interacción de ambos polímeros y su posición en la estructura de la cápsula; la estructura de las cápsulas en combinación de polímero se beneficia con las características de endurecimiento del alginato al contacto con el cloruro de

calcio en disuelto en el líquido de captura, mientras que en el caso de las cápsulas en bicapa la gretina actúa directamente con el proceso de endurecimiento del alginato lo cual permite que se deforme la cápsula además de agrandarla, resultando en cápsulas de mayor tamaño al esperado.

Otra característica que se evaluó fue el peso de las cápsulas, la importancia al evaluar el peso es debida a su relación con la densidad de las cápsulas, además de formar parte de la descripción general del producto, ayuda a saber la cantidad de cápsulas que contiene por dosis y con datos como propágulos por cápsula se puede obtener la cantidad de microorganismos por dosis.

El análisis estadístico del experimento mostro diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre los dos tratamientos (cápsulas en bicapa y en combinación de polímeros).

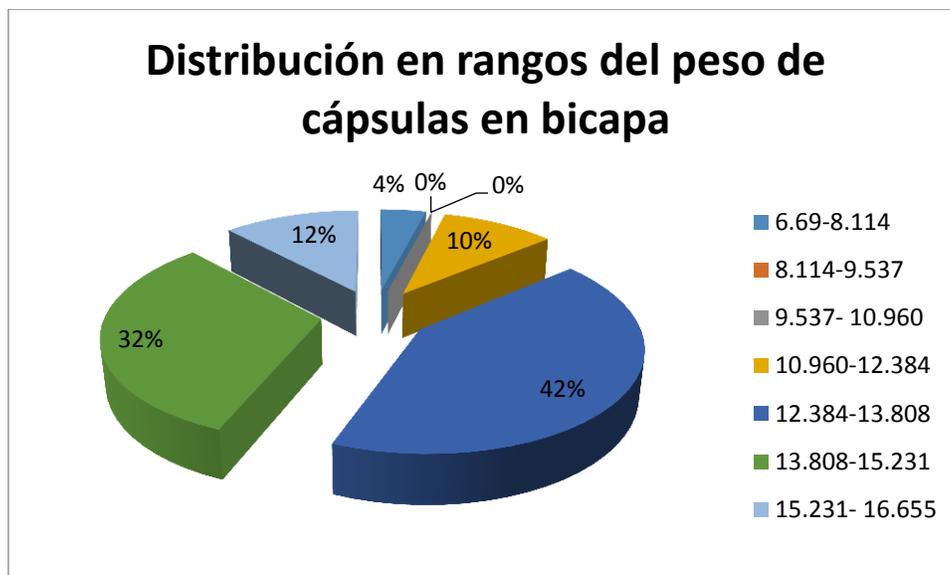


Figura 16 Rango de peso por cápsula y distribución porcentual en cápsulas en bicapa

Como se puede observar en la figura 16, la mayor concentración de peso esta entre los rangos de 124 y hasta 152 µg/ cápsula, constituyendo el 74% del total de la muestra, mientras que el restante 26% pueden llegar a pesar hasta los 166.55 µg/ cápsula. Escalando el resultado a una muestra de 100 g significa que podemos encontrar aproximadamente 751,427 y considerando que cada cápsula tiene en promedio 1.24×10^7 microorganismos benéficos, implica que en eso 100 g

de muestra se tiene en promedio 9.35×10^{12} microorganismos, lo cual lo hace un mecanismo favorecedor que concentra de manera efectiva los microorganismos.

En el caso de las cápsulas en combinación de polímeros cerca del 70% de las cápsulas oscilan entre 229 y 376 μg / cápsula (Figura 17), esto implica un peso mayor con respecto al peso de las cápsulas en bicapa (aproximadamente 50% más) y por lo tanto la cantidad de cápsulas por mediciones de peso será menor, con respecto a las cápsulas en combinación de polímeros. Adicionalmente, se puede decir que la densidad de las cápsulas en bicapa es menor a la densidad de las cápsulas en combinación de polímeros

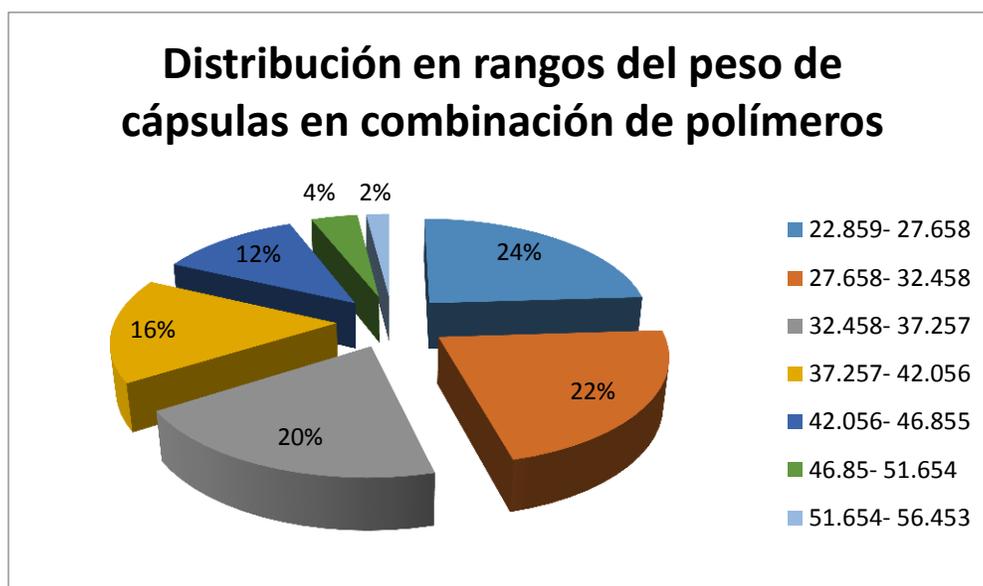


Figura 17 Rango de peso por cápsula y distribución porcentual de cada uno de ellos de cápsulas en combinación de polímeros

Una de las razones por las cuales las cápsulas en bicapa son menos pesadas con respecto a las cápsulas en combinación de polímeros, es la edad de las cápsulas, esto quiere decir, en el caso de las cápsulas en bicapa se debe recordar que el núcleo está constituido de grenetina, la cual en condiciones de temperatura (33 - 34 °C) y/o humedad suficiente puede disolverse en un lapso de tiempo relativamente corto, en el caso de ambas cápsulas, el experimento se llevó a cabo con cápsulas de aproximadamente 70 días (poco más de 2 meses) después de su

elaboración, además las cápsulas estuvieron sumergidas en agua, estas condiciones contribuyeron a que la grenetina se disolviera poco a poco y provocara la disminución de peso de estas cápsulas; por el lado contrario a pesar de que las cápsulas en combinación de polímeros también estuvieron sometidas a las mismas condiciones las pérdidas de peso no son tan marcadas, esto puede deberse a la interacción del alginato con la grenetina, ya que los enlaces o las redes que pueden llegar a formar en conjunto puede dar como resultado una estructura fuerte pero flexible, lo cual permite que la grenetina no se disuelva en condiciones de humedad tan rápidamente como lo hace estando en bicapa, lo cual contribuye a la estabilidad física del producto terminado.

2.5 Conclusiones y recomendaciones

La velocidad de dispersión es una medida importante para la descripción del producto final en el caso de esta investigación las cápsulas en combinación de polímeros resultó tener una velocidad de liberación mayor con respecto a las cápsulas en bicapa, esto se debe a la estructura de las mismas cápsulas, mientras las cápsulas en combinación se desintegran en una sola fase, y tomando en cuenta que por la grenetina se disuelven a una menor temperatura y en condiciones de menor humedad, mientras que las cápsulas en bicapa tienen por separada estas características, por lo tanto, primero se disuelve la grenetina y se escapa por los poros del alginato, y por último la capa de alginato se disuelve más lento y por lo tanto repercute en la velocidad de liberación de los propágulos.

La característica de preservación de la sustancia de interés es el objetivo probablemente más importante que persigue el proceso de encapsulación, y entre mayor tiempo dure viable la sustancia el proceso habrá cumplido dicho objetivo; en el caso de las cápsulas en bicapa demostraron tener una estructura más sólida de conservación de los microorganismos a comparación de las cápsulas en combinación de polímeros puesto que la diferencia entre pérdida de vigor entre bicapa y combinación de polímeros es de poco más de 40 %, esto quiere decir que en un lapso de 3 meses las cápsulas en bicapa conservan 40 %

mejor viabilidad de *T. viridae* en comparación de las cápsulas en combinación de polímeros.

Es recomendable retomar la investigación en virtud de encontrar un líquido de soporte adecuado para evitar el desgaste de las cápsulas puesto que si bien al principio la velocidad de liberación es estadísticamente igual el tiempo merma la estructura de las cápsulas haciendo evidente la diferencia entre las velocidad de un tipo de cápsula y otra. Adicionalmente, encontrar un líquido de soporte adecuado contribuirá en la conservación de los microorganismos y por consecuencia un buen equilibrio del producto final.

En el caso de las cápsulas en bicapa reportan tamaños relativamente grandes (hasta 600 μm aunque existe mayor concentración de tamaños que van de 350 a 500 μm), los cuales limitarían el equipo agrícola a usar, o en su defecto adaptar equipo agrícola al tamaño de las cápsulas, por otro lado las cápsulas en combinación de polímeros reportan tamaños relativamente más pequeños en comparación con (valores desde 180 hasta 600 μm , con mayor concentración de entre 320 y 360 μm). Adicionalmente las cápsulas en combinación de polímeros son las que poseen una forma esférica más regular en comparación con las cápsulas en bicapa, lo cual hace de las cápsulas en combinación de polímeros más fácil de manejar en cuanto a aplicaciones agrícolas.

Es recomendable probar otros polímeros con el fin de estabilizar y homogenizar el tamaño y la forma en microencapsulación en bicapa o explorar otros procedimientos que den mejores resultados.

En el caso de las cápsulas en bicapa registran pesos menores con respecto a las cápsulas en bicapa, lo cual indica menor densidad. Probablemente debido a la estructura física de las cápsulas, pues, mientras las cápsulas en bicapa está dividida por capas y cada capa posee sus características fisicoquímicas, el caso de la combinación de polímeros las estructuras químicas y las características físicas se combinan y forman nuevas.

Es recomendable hacer más pruebas de elaboración de cápsulas para obtener pesos más homogéneos además de registrar el peso a lo largo de un periodo estándar de tiempo para obtener registros de pérdidas de peso y si estas se pueden controlar con procesos de elaboración, líquidos de soporte o polímeros.

La combinación de la estructura más pesada con un porcentaje de encapsulación mayor equilibra las características de las cápsulas en combinación de polímeros con respecto a las cápsulas en bicapa que es una cápsula menos pesada y con menos porcentaje de encapsulación, sin embargo, la velocidad de liberación superior de las cápsulas en combinación permite una acción del microorganismo más rápida con respecto a las cápsulas en bicapa. Por otro lado las cápsulas en bicapa proveen mayor protección a los microorganismos, permitiendo que el producto sea útil en posteriores ocasiones a comparación de un producto con cápsulas en combinación de polímeros.

Dependiendo del uso y del propósito de la microencapsulación de *T. viridae* las cápsulas en bicapa o en combinación de polímeros son una buena opción para control biológico, sin embargo, aún pueden realizarse mejoras en cada etapa.

Capítulo 3. Confrontación *in vitro* e *in vivo* de cápsulas en bicapa y cápsulas en combinación de polímeros contra los principales hongos fitopatógenos de la rizósfera en cultivo de jitomate

3.1 Introducción

El jitomate es una especie que se agrupa dentro de las hortalizas, que son plantas herbáceas con órganos o tejidos comestibles para la alimentación humana y que son fuente importante de vitaminas, minerales y proteínas. Esta hortaliza requiere de cuidados intensivos, por lo que demanda mucha mano de obra por unidad de superficie cultivada (SACEM, 2002).

La extensión que ocupa el cultivo del jitomate a nivel mundial es de 4.803.680 hectáreas, que han llegado a producir 161'79 millones de toneladas de jitomate (FAOSTAT, 2012).

En México, la superficie total destinada para el cultivo de jitomate rojo es de 48,287 hectáreas, los principales estados productores de esta hortaliza son Sinaloa el cual contribuye con la tercera parte de la producción nacional, por otro lado San Luis Potosí y Zacatecas, reúnen el 47% de la producción total (SIAP, sept 2016).

El cultivo de jitomate es uno de los productos hortícolas más importantes en la producción agrícola, este cultivo generó una ganancia, en 2013, superior 15 mil 46 millones de pesos, lo cual lo ubica como el sexto cultivo que genera más ganancias en el sector agrícola (SIAP, 2013).

Entre las principales variedades que produce México, la variedad Saladette la cual representa el 50% de la producción nacional siendo esta la variedad más importante producida en el país, seguida de la variedad bola la cual representa el 13% de la producción nacional (SIAP, 2013). Aunque el consumo en fresco es el principal uso que se le da a esta hortaliza, datos del SIAP, en el año 2013 se destinaron 480 toneladas a industrias de elaboración de salsas, jugos conservas y pastas, lo cual representó una derrama económica de \$ 1,392,000 pesos.

La importancia económica del cultivo es en gran medida, debido a las relaciones comerciales que México tiene con los distintos países, entre los cuales destaca Estados Unidos (más de 75% se destina al mercado de este país), puesto que de la producción total, nueve de cada diez kilos van a parar a los mercados internacionales (Trapága, 2001). La demanda de este producto ha permitido a los agricultores la adopción de técnicas y tecnologías que permitan obtener frutos de mayor calidad fitosanitaria y comercial, que puedan competir a nivel mundial con las características que el consumidor final busca en dichos productos; para ello se requiere de estrategias multidisciplinarias que permitan mayor control del cultivo así como mejor aprovechamiento de los recursos tanto del espacio como de los recursos hídricos, entre otros; y en el caso como el cultivo de jitomate el grado de tecnificación es de importancia para cumplir con los estándares de calidad que el mercado requiere, de ahí que, actualmente, cerca del 100% de la producción de jitomate está bajo la modalidad de un sistema de riego; mientras que una cuarta parte de la producción nacional se realiza bajo condiciones de invernadero, lo cual representa una ventaja en la producción al proporcionar mecanismos de control de distintas variantes importantes para el cultivo como la temperatura, la luminosidad, entre otros, además de maximizar el uso del espacio disponible (ISNAR, 1998).

Además de las variantes físicas que pueden repercutir de manera negativa al cultivo, también los agentes biológicos son un factor importante que se debe tomar en cuenta. El excesivo uso de agroquímicos es un problema importante, puesto que además de presentar riesgo ecológico a mediano y largo plazo, el uso de químicos acelera el proceso de resistencia de organismos patógenos. Las plagas y enfermedades son los principales problemas que impactan en el cultivo del jitomate, incrementando los costos de producción por el uso de productos químicos para su control. Como alternativa a los agroquímicos se han desarrollado estrategias ecológicas entre las que destacan el uso de microorganismos con distintas capacidades de protección y aunque en la actualidad existen diversos productos de control biológico aún existen limitantes como la viabilidad de los microorganismos, es por ello que la constante investigación busca obtener

productos que permitan al microorganismo benéfico potencializar su vida de anaquel y extender su capacidad protectora (ISNAR, 1998).

3.2 Objetivos

Evaluar el efecto que tienen las cápsulas en bicapa de *T. viridae* contra *F. oxysporum f.e. lycopersici* y *P. capsici in vitro*

Evaluar el efecto que tienen las cápsulas en combinación de polímeros de *T. viridae* contra *F. oxysporum f.e. lycopersici* y *P. capsici in vitro*

Evaluar el efecto de las cápsulas en bicapa de *T. viridae* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero contra *F. oxysporum f.e. lycopersici* y *P. capsici*.

Evaluar el efecto de las cápsulas en combinación de polímeros de *T. viridae* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero contra *F. oxysporum f.e. lycopersici* y *P. capsici*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Confrontación *in vitro*

Para esta etapa del estudio se debe tener con antelación placas con los hongos fitopatógenos de interés; para tal caso se tomaron placas con medio de cultivo PDA de *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f. e. capsici* ya purificadas las cuales fueron proporcionadas por la colección de hongos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola apoyado por estudiantes del posgrado de Protección Vegetal; de estas, se cortaron discos de medio con micelio en el de 5 mm de diámetro para propagarlos en medio de cultivo limpio. Después de tres días se obtuvieron placas con crecimiento máximo de micelio, el cual se usó para el experimento de confrontación.

Con las placas de los hongos fitopatógenos (*Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f. e. capsici*) llenas y listas para usarse se procedió a cortar discos de medio de cultivo con micelio del microorganismo, de 5 mm con micelio activo y se sembró en placas con medio de cultivo PDA con antibiótico (Ramfipicina; 0.001

g/L y ampicilina; 0.25 g/L), aproximadamente a 0.5 cm de distancia de la pared de la placa y en la pared contraria a esta se sembró *T. viridae* en cada presentación dispuesta (*Trichoderma* sin encapsular, cápsula en bicapa y cápsula en combinación de polímero); el experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Posgrado del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo manteniendo las placas a temperatura constante de 20 ± 1 °C.

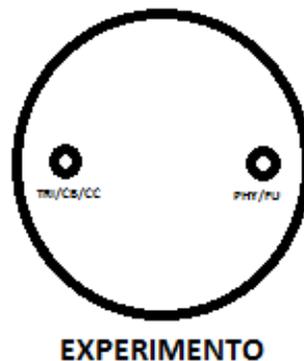


Figura 18 Experimento *in vitro*, donde se midió el progreso de crecimiento de micelio.

Para la medición se registró el crecimiento cada 12 h marcando el crecimiento del micelio hasta ese momento y posteriormente se sacan fotos de cada placa marcada, hasta que los micelios de los patógenos y del microorganismo encapsulado entraron en contacto. Para obtener el área se usaron dos softwares distintos, el primero es el programa GIMP 2; editor de imágenes y con el cual se transformaron las fotos para que el área a medir fuese aislada. El segundo es IMAGE TOOL el cual cuenta los pixeles de una imagen y los convierte en mediciones de área.

Cada confrontación se realizó 54 veces tomando en cuenta los respectivos controles de cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS System. Se realizó un análisis de varianza con un modelo de Diseño Completamente al Azar y pruebas de comparación de medias por prueba de LSD.

3.3.2 Confrontación *in vivo*

Se colocaron en varias cajas de Petri discos de medio de cultivo con micelio de *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y se incubaron por tres días a una temperatura de 35 °C con el propósito que desarrollaran micelio viable e infectivo.

Para la propagación de plantas se sembraron semillas de jitomate en almacigo con tierra de campo esterilizada, bajo condiciones de invernadero, en el momento en que surgen las primeras hojas se trasplantaron a bolsas de plástico. Cuando las plantas alcanzaron 15 días de desarrollo se procedió a inocular la planta con las cápsulas. En total se usaron 50 plantas para el experimento.

La aplicación del tratamiento se realizó en diciembre del 2016, donde se pesaron 15 muestras de 2 gramos de cada tipo de cápsulas y se adicionaron a plantas de jitomate haciendo cuatro horadaciones cerca del tallo y vertiendo las cápsulas en dichas perforaciones, posteriormente se taparon con tierra y se humedeció la planta. Posteriormente 8 días después de la inoculación con las cápsulas se procedió a inocular las plantas con *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, respectivamente. El procedimiento consistió en tomar varias placas con micelio de *Phytophthora capsici*, el cual fue vertido en un recipiente junto con 100 ml de agua destilada y esterilizada y se licuo hasta tener una mezcla homogénea, posteriormente se tomó una muestra para realizar un conteo de Neubauer y así obtener la concentración de los propágulos del hongo fitopatógeno, y se ajustó, de ser necesario, a 10^6 propágulos/ml; para el caso de *Fusarium oxysporum f. e. capsici* se recurrió al mismo procedimiento con la diferencia de usar 80 mL, esto para obtener la concentración de 10^6 propágulos/ml, la inoculación de los hongos fitopatógenos en las plantas se realizó heridas en el cuello de la planta y en las raíces cercanas a la base, posteriormente se vertió, con la ayuda de una jeringa, la solución de propágulos sobre la herida, además de hacer una horadación cerca de las raíces con el fin de lastimarlas y así maximizar la oportunidad de contagio.

Las mediciones se realizaron a los 21, 31 y 41 días después de la inoculación (ddi) de los hongos fitopatógenos; las mediciones que se realizaron fueron:

Severidad: de Marchitez de planta de jitomate (*Phytophthora capsici*). Se determinó tomando 10 muestras de la planta y se evaluó usando la escala visual propuesta por Aldana (2009) (Cuadro 1), una vez obtenidas las evaluaciones, se usó la fórmula de Townsed y Heuberger para transformar el conjunto de datos de los tratamiento en medida de porcentaje. Para el caso de *Fusarium oxysporum f. e. capsici* se adaptó la escala anterior.

Cuadro 1 Escala usada para determinar severidad (Aldana, 2009)

INDICE	DESCRIPCIÓN
0	Planta no infectada
1	Planta que muestra daño ligero
2	Planta que muestra daño moderado
3	Planta completamente marchita (seca)

$$PI = \frac{\sum_{j=1}^{N=5} (n * V)}{\text{Categoría mayor} * N} * 100$$

Dónde:

PI = Porcentaje de infección

n = Número de plantas en cada categoría

V = Valor numérico de cada categoría

N = Número de plantas en la muestra

Incidencia. La toma de datos se realizó a los 41 (ddi) y se midió en raíz; la cual se dividió en 5 partes y se consideró el número total de secciones de raíz que presentan síntomas típicos tanto en el tratamiento contra *Phytophthora capsici* como en los tratamientos contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, con respecto al número total de secciones. Adicionalmente se tomaron mediciones de grosor de tallo, altura del mismo, peso en fresco y seco, tanto de la parte aérea (tallo y

hojas) como de la subterránea (raíz); esto para evaluar si los antagonistas tuvieron algún efecto sobre el vigor de la planta.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de con un modelo correspondiente a un Diseño Completamente al Azar individualizado por día y una comparación de medias con prueba LSD ($p < 0.05$).

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Confrontación in vitro

El enfrentamiento de un microorganismo con otro a nivel de laboratorio es una buena medición de la efectividad del organismo de interés frente a un antagonista, una de las ventajas que ofrece este estudio en laboratorio es el hecho de tener las variables como temperatura y humedad controladas para que no repercutan significativamente sobre el experimento además de tener buen acercamiento con el comportamiento de los microorganismos que son de interés.

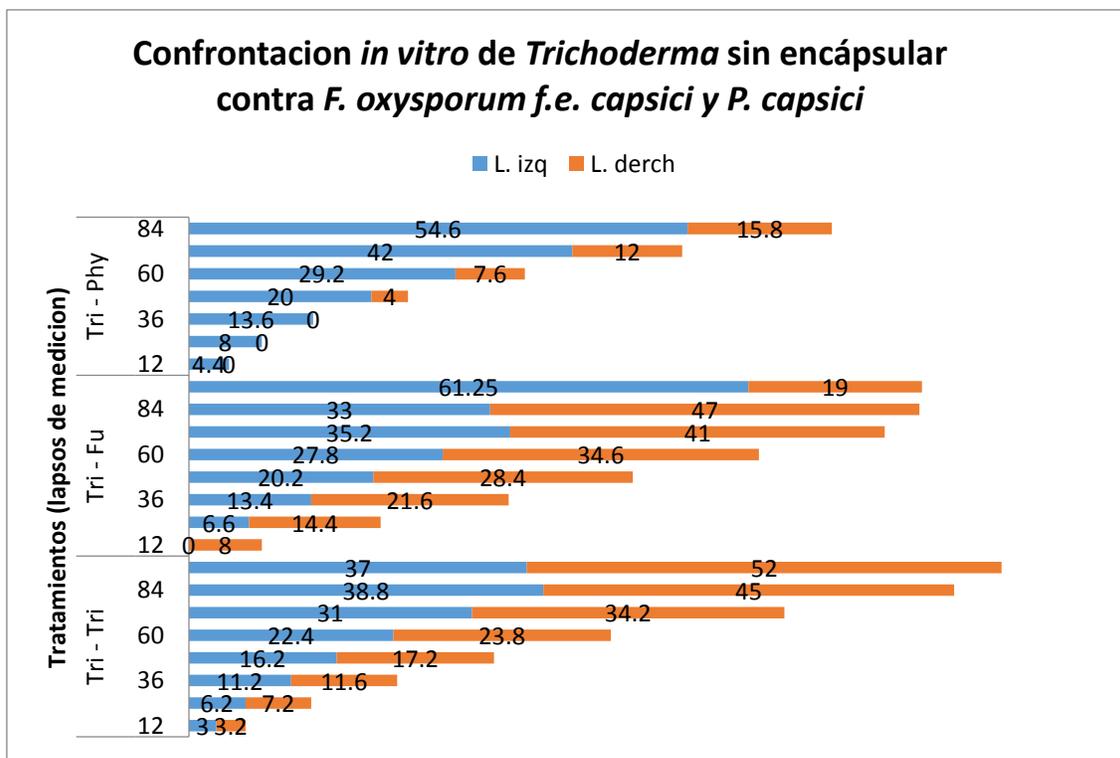
Trichoderma spp. ha demostrado ser un excelente organismo para control biológico debido a sus múltiples mecanismos de control, lo cual lo ha vuelto ampliamente utilizado en gran diversidad de cultivos y es por ello que es objeto de investigaciones para aumentar sus mecanismos y ampliar sus virtudes como control biológico. El experimento mostró diferencias significativas ($\alpha = < 0.0001$) entre los tratamientos.

En la figura 19 se observa el progreso de crecimiento del micelio de *Trichoderma* sin encapsular (barra azul) enfrentada contra los fitopatógenos de interés (*Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f.e. capsici*), correspondientemente (barra naranja). Se puede observar, en general, el crecimiento y por lo tanto la velocidad de crecimiento es superior en *Trichoderma viridae* con respecto a los fitopatógenos de interés, lo cual indica buena colonización de *Trichoderma* lo cual limita la disponibilidad de nutrientes para los patógenos y por lo tanto disminuye su diseminación.

En el caso del control (Tri vs Tri) se observa crecimiento simétrico entre ambas partes; es en la parte izquierda (barra azul) la que se encuentra rezagada en comparación con la parte derecha (barra naranja); el avance es constante en ambas partes, entre 6 y 7% por día.

En el segundo tratamiento (Tri – Fu) se observa avance constante y más rápido de *Fusarium* a comparación de *Trichoderma* sin encapsular, la diferencia entre el crecimiento de uno y otro es de 8%, es decir, el crecimiento de *Fusarium* se mantiene constantemente 8% más grande que el crecimiento de *Trichoderma*, lo cual se podría traducir en una dominancia por parte de *Fusarium*.

En el último tratamiento (Tri – Phy) se observó el crecimiento de *Trichoderma* sin encapsular superior al crecimiento de *Phytophthora capsici* manteniendo una diferencia promedio de 20%, es decir, el crecimiento de *Trichoderma* supero en 20% cada día al crecimiento de *Phytophthora capsici* con lo que se puede decir que el control de *Trichoderma* contra este fitopatógeno es efectivo, al crecer rápidamente y con ello limitar el desarrollo del fitopatógeno.



**Figura 19 Confrontación *in vitro* de *Trichoderma viridae* sin encapsular
contra *Fusarium oxysporum f.e. capsici* y *Phytophthora capsici*.**

En la figura 20 se puede observar la confrontación de *Trichoderma* encapsulado en combinación de polímeros contra *Fusarium oxysporum f.e. capsici* y *Phytophthora capsici*, respectivamente.

En una vista general se puede apreciar el crecimiento y la velocidad de crecimiento de los propágulos liberados por las cápsulas en comparación con el crecimiento de ambos fitopatógenos, lo cual indica que la velocidad de liberación es adecuada además que le brinda la ventaja suficiente para que los propágulos se conserven y se mantengan viables por más tiempo.

En el caso del tratamiento de cápsulas en combinación de polímeros (Cc), en el control (Cc – Cc) se observa un crecimiento más o menos simétrico con cierta ventaja de uno de los lados, esto puede deberse a una pequeña variación entre la velocidad de liberación de las cápsulas, debido a la cantidad de cada polímero por cápsula, este tema resulta interesante, puesto que sí, entre las cápsulas, no existe la misma proporción entre los polímeros esto podría modificar la velocidad con que

se disuelven; lo cual es una ventaja al presentar la opción de liberación rápida y constante.

En la primer confrontación de cápsulas en combinación de polímeros contra *F. oxysporum f. e. capsici* (Cc – Fu), se observa un crecimiento constante de los propágulos liberados de *Trichoderma* y el área mayor que abarca a comparación del crecimiento de *Fusarium*, el cual, en promedio se mantiene 7% inferior con respecto del crecimiento de *Trichoderma* y alcanzando en su punto máximo hasta 18% de crecimiento superior al desarrollo de *Fusarium*, lo cual se resume en una efectividad de control buena sobre este fitopatógeno.

En lo que respecta al segundo enfrentamiento, cápsulas en combinación de polímeros contra *Phytophthora capsici* (Cc – Phy) es el fitopatógeno es presenta un crecimiento inferior al crecimiento de *Trichoderma* encapsulado; en promedio el crecimiento de *Phytophthora* es 16% inferior al crecimiento promedio de *Trichoderma*, teniendo picos de diferencia de hasta 30%. La velocidad de liberación así como la protección que la red de polímeros le brindo a los propágulos permitió un avance efectivo en el crecimiento del micelio con respecto al crecimiento del antagonista.

En general las cápsulas en combinación de polímeros presentan buenas características para la confrontación contra fitopatógenos bajo condiciones de laboratorio, presentan un crecimiento vigoroso logrando un avance de cerca del 50% en 4 días lo cual es una ventaja poderosa frente a los fitopatógenos.

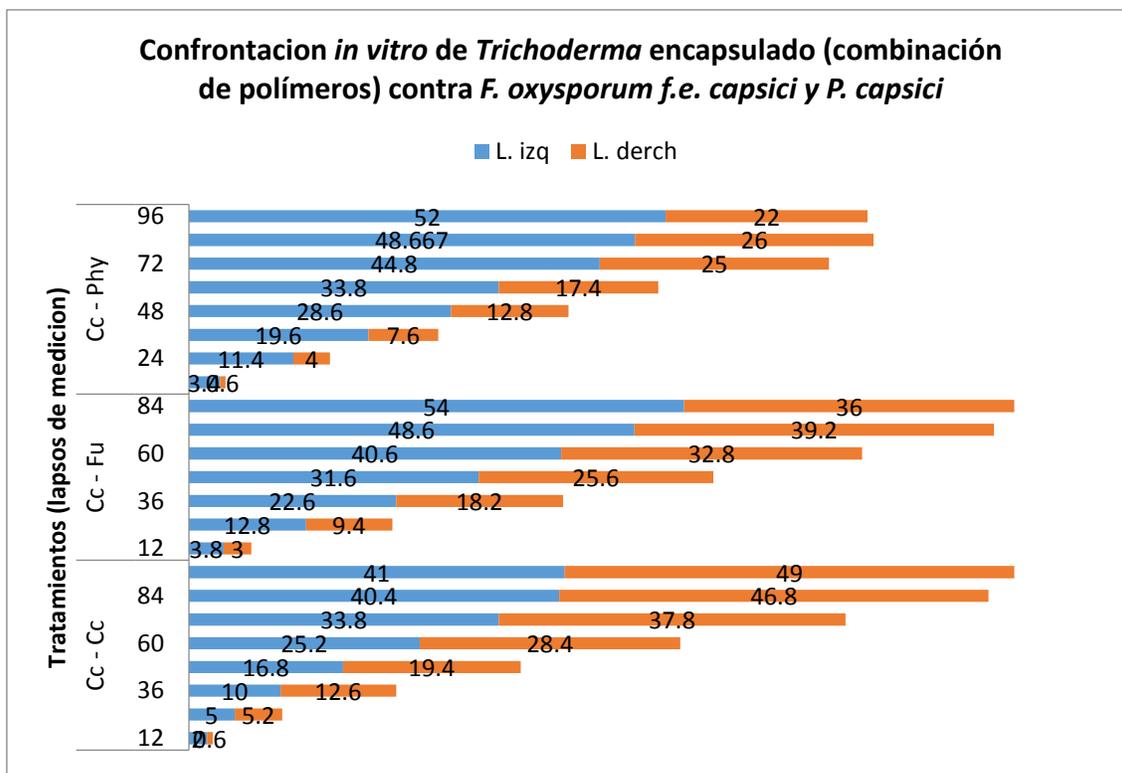


Figura 20 Confrontación *in vitro* de *Trichoderma viridae* encapsulado en combinación de polímeros contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y *Phytophthora capsici*.

En la figura 21 se observa la confrontación de *Trichoderma* encapsulado en bicapa contra los principales fitopatógenos de la rizósfera del cultivo de jitomate, en una vista general el crecimiento micelial de *Trichoderma* (barra azul) con respecto a sus antagonistas (barra naranja) presenta una velocidad de liberación lenta.

En el caso de la confrontación control, cápsulas en bicapa contra cápsulas en bicapa (Bc – Bc), se observa una predominancia del lado derecho (barra naranja), lo que puede deberse al tamaño de la cápsula así como la velocidad en disolverse para liberar los propágulos, esto puede ser ventajosa al presentar una liberación a diferentes tiempos, sin embargo la capacidad de disolución del alginato a un tiempo más prolongado puede repercutir en la protección en una etapa inicial.

En el segundo caso, cápsulas en bicapa contra *F. oxysporum f. e. capsici* (Bc – Fu) se observa una total supremacía en el crecimiento de micelio de *Fusarium*, con respecto al crecimiento de *Trichoderma* encapsulado; *Fusarium* crece en

promedio 47% con respecto a *Trichoderma* llegando a máximos de 100%, es decir, *Fusarium* puede llegar a crecer y dominar el área inhibiendo por completo el crecimiento de *Trichoderma*, y por lo tanto, anulando sus características protectoras.

En el tercer y último caso, cápsulas en bicapa contra *Phytophthora capsici* (Bc – Phy), se aprecia un crecimiento superior de *Trichoderma* (barra azul) con respecto al crecimiento de *Phytophthora capsici* (barra naranja), la velocidad es constante, en promedio, creciendo 7% diario con respecto a *Phytophthora* el cual registra un crecimiento diario de 3%. Por otro lado *Trichoderma* mantiene el crecimiento superior en relación de *Phytophthora*, en promedio, 15%, teniendo picos de diferencia de hasta 29%, este resultado es positivo, puesto que presenta un control de área sustancial.

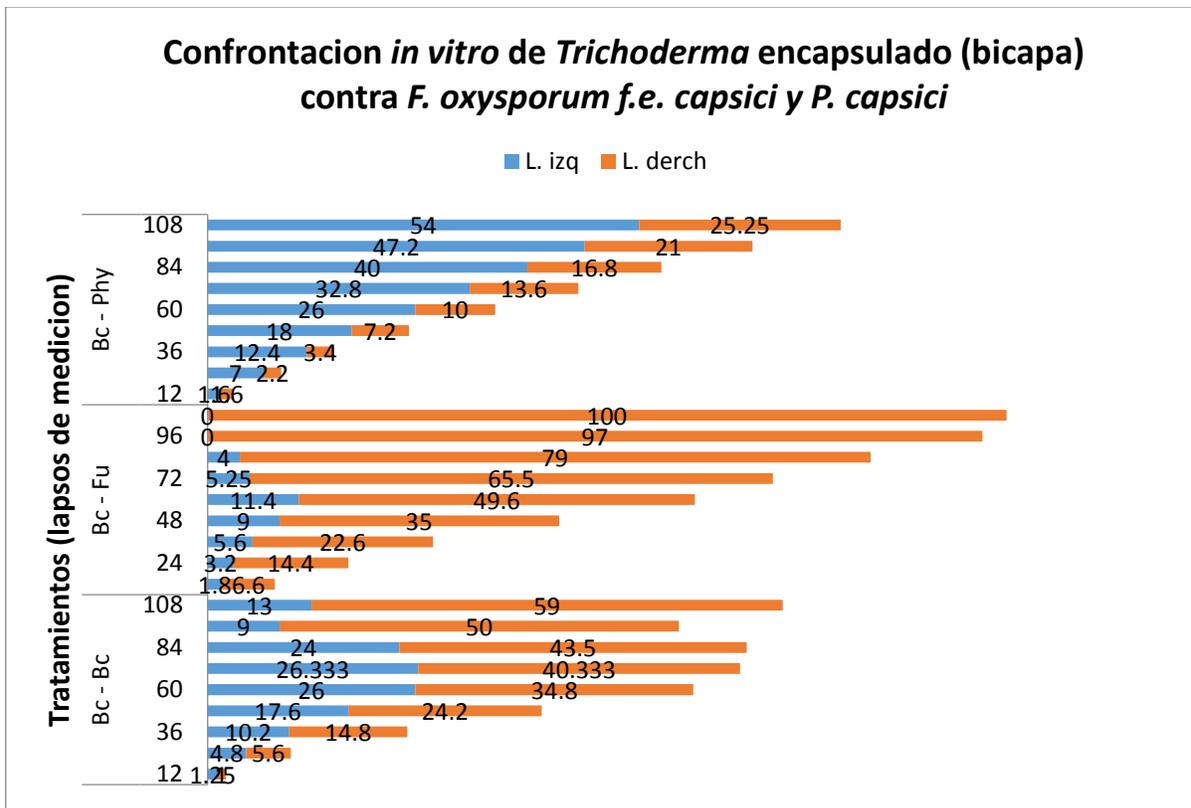


Figura 21 Confrontación *in vitro* *Trichoderma viridae* encapsulado en bicapa contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y *Phytophthora capsici*.

3.4.2 Confrontación *in vivo*

En esta etapa los tratamientos principales (cápsulas en bicapa y cápsulas en combinación de polímeros) se enfrentaron contra los fitopatógenos de la rizósfera, *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y *Phytophthora capsici*, en plantas de jitomate.

Los tratamientos aplicados en dichas plantas mostraron diferencias significativas en las variables de longitud de tallo ($\alpha = 0.0009$) y raíz ($\alpha = 0.0077$), severidad ($\alpha = < 0.0001$), incidencia ($\alpha = < 0.0001$), biomasa húmeda ($\alpha = < 0.0001$) y seca ($\alpha = 0.0011$) de la parte aérea (tallos y hojas) y biomasa en húmedo de la parte subterránea (raíz) ($\alpha = 0.0059$).

En el caso del crecimiento (parte aérea y parte subterránea) se observa en el cuadro 2 una eficacia de las cápsulas en bicapa para estimular el crecimiento aéreo y subterráneo, del mismo modo se observa las mismas capacidades de estimulación al enfrentarlo contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y *Phytophthora capsici*, al contrario de las cápsulas en combinación de polímeros, las cuales registraron un retroceso en su crecimiento, reportando cerca de un 23% de diferencia entre ambos testigos (TBc y TCc, respectivamente). Respecto al crecimiento aéreo, al enfrentarse contra los fitopatógenos la diferencia de crecimiento entre los mismos testigos, fue de 10% cuando se enfrenta a *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y de 6% al enfrentarse contra *Phytophthora capsici*.

Cuadro 2 Crecimiento de la parte aérea y de la parte subterránea sometidas a tratamientos de *Trichoderma viridae* encapsulada 41 días después de la inoculación de los fitopatógenos.

Tratamientos	Altura de tallo (cm)	Largo de raíz (cm)
TA	23.8 bcde	32.2 abc
TR	20.4 e	29 bcd
TCc	23.4 cde	32.4 abc
TBc	30.4 a	34.4 ab
TPhy	27.6 ab	27.2 cd
TFu	22.4 de	25 d
Bc vs Fu	26.8 abc	36.2 a
Bc vs Phy	24.8 bcd	37.4 a
Cc vs Fu	24 bcde	33.8 abc
Cc vs Phy	23.2 cde	28 bcd

TA: Testigo absoluto, TR: Testigo con raspadura, TCc: Testigo con cápsulas en combinación de polímeros, TBc: Testigo con cápsulas en bicapa, TPhy: Testigo inoculado con *Phytophthora capsici*, TFu: Testigo inoculado con *Fusarium oxysporum f. e. capsici*. Medias por columnas con las mismas letras no son estadísticamente diferentes LSD ($\alpha = 0.05$).

Caso similar sucede con el crecimiento radicular, demostrando mayor capacidad de estimulación con el tratamiento de las cápsulas en bicapa las que presentan cerca de 5% de crecimiento superior con respecto al testigo de las cápsulas en combinación de polímeros. En el caso de los enfrentamientos fueron las cápsulas en bicapa las que mostraron mejor eficacia como estimulantes en de crecimiento de raíz frente a las cápsulas en combinación de polímeros; de este modo se observa cerca de 7% de crecimiento de raíz con el tratamiento de cápsulas en bicapa con respecto al tratamiento de cápsulas en combinación de polímeros, ambos enfrentados contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici*. La mayor capacidad de estimulación de crecimiento radicular se observa al enfrentar ambos tratamientos contra *Phytophthora capsici*, en el cual el tratamiento en cápsulas en bicapa estimula en 25% más el crecimiento radicular, respecto al tratamiento de cápsulas en combinación de polímeros.

Con respecto a la medición de severidad se tomó en cuenta la parte aérea. La medición se expresó en porcentaje. En el cuadro 3 se observa como los tratamientos de cápsulas en bicapa enfrentada contra *Phytophthora capsici* (Bc vs

Phy) y cápsulas en combinación de polímeros enfrentada contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici* (Cc vs Fu) son los que presentan menor porcentaje de severidad a comparación de los testigos de los fitopatógenos (TPhy y TFu).

Las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum f. e. capsici* (TFu) reportaron el mayor porcentaje de severidad, mientras que las plantas a las que permanecieron sin tratamiento (TA) y las plantas a las que se le provoco una herida en la base de la misma (TR) no presentaron indicios de severidad.

Se puede observar como las plantas que solo fueron tratadas con cápsulas en bicapa (TBc) fueron las que presentaron menor porcentaje de severidad a comparación de las plantas tratadas solo con las cápsulas en combinación de polímeros (TCc), la cual represento un a diferencia de 2,6 puntos porcentuales; lo cual indica un efecto relativamente más alto de protección contra posibles fitopatógenos presentes de *T. viridae* encapsulado en bicapa a comparación de un encapsulamiento en combinación de polímeros, por otro lado esta protección también se podría traducir en estimulación en el vigor de la planta, de este modo la planta al ser tratada con *T. viridae* encapsulado en bicapa al podría estimular el vigor de esta.

Por otro lado se puede observar como los tratamientos donde las plantas se inocularon con *Fusarium oxysporum f. e. capsici* y, previamente los tratamientos (Cc y Bc), es en el enfrentamiento de cápsulas en bicapa contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici* (Bc vs Fu) donde se presenta el mayor grado de severidad en comparación del tratamiento de las cápsulas en combinación de polímeros contra el fitopatógeno antes mencionado (Cc vs Fu), esta diferencia es de cerca del 23%, lo cual indica que en lo que respecta a la protección contra *Fusarium oxysporum f.e. capsici* en este cultivo es *T. viridae* encapsulado en combinación de polímeros más efectivo que el mismo microorganismo encapsulado en bicapa, esto puede deberse a la velocidad de liberación el cual demostró ser más rápido con respecto a las cápsulas en bicapa, permitiendo una colonización más rápida. Por otro lado, el enfrentamiento contra *Phytophthora capsici* es *T. viridae* encapsulado en bicapa la que presenta mejor protección con respecto a las

cápsulas en combinación de polímeros, con una diferencia del 26%, este comportamiento puede deberse a la cualidad de las cápsulas en bicapa de preservar más efectivamente al microorganismo y por lo tanto permitir una colonización más efectiva y prolongada.

Cuadro 3 Medición de incidencia y severidad (%) en plantas de jitomate sometidas a tratamientos de *T. viridae* encapsulado a los 41 días después de la inoculación de fitopatógenos de la rizósfera

Tratamientos	Severidad en parte aérea	Incidencia en raíz
TA	0 d	4 d
TR	0 d	0 d
TCc	4.6 cd	0 d
TBc	2 d	0 d
TPhy	55.4 a	76 a
TFu	58.8 a	60 b
Bc vs Fu	36.4 b	28 c
Bc vs Phy	10.2 cd	32 c
Cc vs Fu	12.6 c	24 c
Cc vs Phy	36 b	52 b

TA: Testigo absoluto, TR: Testigo con raspadura, TCc: Testigo con cápsulas en combinación de polímeros, TBc: Testigo con cápsulas en bicapa, TPhy: Testigo inoculado con *Phytophthora capsici*, TFu: Testigo inoculado con *Fusarium oxysporum f. e. capsici*. Medias por columnas con las mismas letras no son estadísticamente diferentes LSD ($\alpha = 0.05$).

Respecto a la incidencia se puede observar en el cuadro 3 como son los tratamientos donde solo se inocularon las plantas con cápsulas en bicapa o cápsulas en combinación de polímeros no se detectó la presencia de síntomas típicos de alguna enfermedad en la raíz; por otro lado podemos observar que los picos más altos en presencia de síntomas de enfermedad son en las plantas que solo fueron inoculadas con los fitopatógenos de interés (TPhy y TFu) por lo cual podemos decir que la inoculación se llevó a cabo de manera correcta.

Por otro lado observamos en la confrontación de los tratamientos contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, ambos tratamientos (Bc vs Fu y Cc vs Fu) presentan los porcentajes más bajos, en tratamientos de confrontación; lo cual implica que ambos tratamientos son igualmente efectivos para retardar la presencia de síntomas en raíz de este fitopatógeno; en este sentido podemos observar, además, las confrontaciones de ambos tratamientos contra *Phytophthora capsici*

mostraron un porcentaje más alto, sin embargo, el que menor efectividad tuvo fue el tratamiento de cápsulas en combinación de polímeros contra *Phytophthora capsici* el cual mostro poco más del 50% de incidencia, esto podría deberse a la baja capacidad de estas cápsulas de prolongar la vida de los propágulos en un lapso de tiempo importante (Véase capítulo 2, caracterización).

Otra característica evaluada es biomasa, tanto en seco como en húmedo, de la parte aérea (tallo y hojas) y de la parte subterránea (raíz). En el cuadro 4 se puede observar los tratamientos y el comportamiento de cada uno de ellos.

En el caso del peso fresco de la parte aérea se puede observar como *T. viridae* encapsulado en bicapa presenta el mayor desarrollo de biomasa mientras que las plantas que solo fueron inoculadas con *Fusarium oxysporum f.e. capsici* presentan el menor valor de desarrollo; por otro lado de los tratamiento de confrontación, fue cápsulas en bicapa contra *Fusarium oxysporum f.e. capsici* el que mostró un desarrollo positivo de biomasa, aunque no presenta diferencia entre los otros tres tratamientos (Bc vs Phy, Cc vs Fu y Cc vs Phy)

En el mismo sentido, en el caso del peso en fresco de la raíz la que presento un valor más elevado de producción en biomasa fue el tratamiento en donde solo se inocularon las plantas con *T. viridae* encapsulado en bicapa seguido del testigo absoluto, mientras que el resto de los tratamientos no son estadísticamente diferentes lo cual indica que ningún tratamiento insidio de manera significativa en el desarrollo de biomasa de las raíces a diferencia de la parte aérea.

Cuadro 4 Peso de biomasa seca y fresca de la parte aérea y subterránea (g) de plantas de jitomate sometidas a tratamientos de *T. viridae* encapsulados a los 41 días después de la inoculación con hongos fitopatógenos de la rizósfera.

Tratamiento	Peso Húmedo (aérea) (g)	Peso Húmedo (raíz) (g)	Peso seco (aérea) (g)	Peso Seco (raíz) (g)
TA	9.6 bc	7.6 ab	1.9 bc	2.7 ab
TR	9.16 bc	4.24 b	1.68 c	1.4 bc
TCc	10.1 bc	5 bc	1.78 bc	1.38 bc
TBc	12.5 a	8.26 a	2.42 a	2.92 a
TPhy	13.68 a	4.24 b	2.46 a	1.42 bc
TFu	8.42 c	4.96 b	1.68 c	1.44 bc
Bc vs Fu	10.36 b	3.84 b	2.18 ab	1.9 abc
Bc vs Phy	10.222 bc	3.46 b	1.98 bc	1.3 c
Cc vs Fu	10.08 bc	4.1 b	1.9 bc	1.6 abc
Cc vs Phy	9.58 bc	4.34 b	1.66 c	1.66 abc

TA: Testigo absoluto, TR: Testigo con raspadura, TCc: Testigo con cápsulas en combinación de polímeros, TBc: Testigo con cápsulas en bicapa, TPhy: Testigo inoculado con *Phytophthora capsici*, TFu: Testigo inoculado con *Fusarium oxysporum f. e. capsici*. Medias por columnas con las mismas letras no son estadísticamente diferentes LSD ($\alpha = 0.05$).

En el caso del peso seco en la parte aérea se puede observar un comportamiento similar al presentado en el análisis con el peso en fresco; como se puede observar el valor más alto se obtuvo con las plantas inoculadas con las cápsulas en bicapa, y es en este caso que el valor más bajo obtenido es el tratamiento de las cápsulas en combinación de polímeros contra *Phytophthora capsici*.

En el caso del peso seco de la raíz el tratamiento que expresó mayor biomasa fue el tratamiento con las cápsulas en bicapa y el que tuvo la menor biomasa fue el tratamiento en confrontación de cápsulas en combinación de polímeros contra *Phytophthora capsici*.

3.5 Conclusiones y recomendaciones

En el caso del experimento de la confrontación *in vitro*; entre los controles (Tri – Tri, Cc – Cc y Bc – Bc) el crecimiento es uniforme, es decir, crecen a la velocidad con mínimas diferencias porcentuales (1%), la velocidad de crecimiento de micelio no se ve afectada por ninguno de los tratamientos, aunque existe un aumento de

crecimiento en Bc lo cual puede deberse a las proteínas disueltas en el líquido de soporte, lo cual puede fungir con alimento disponible (grentina).

El tratamiento que mostro mejor desempeño contra *Fusarium oxysporum f.e. capsici* fueron las cápsulas en combinación de polímeros (Cc), el cual mostro un crecimiento de micelio de *Trichoderma* de hasta 10% superior con respecto a *Trichoderma* sin encapsular y *Trichiderma* encapsulado en bicapa (Bc); este último es el peor tratamiento puesto que el crecimiento es el menor de los tres tratamiento representando una ventaja de desarrollo para el fitopatógeno. El crecimiento de *Fusarium* es parecido en los tres experimentos lo cual refleja que el crecimiento solo se ve afectado por el efecto de los tratamientos y no las posibles variables externas.

Entre los tres tratamientos que se enfrentaron a *Phytophthora capsici*, el que presentó mejores resultados fueron las cápsulas en combinación de polímeros (CC) con una diferencia de crecimiento que va del 2 al 8% con respecto a los otros dos tratamientos (*Trichoderma* sin encapsular (Tri) y cápsulas en bicapa (Cb)), sin embargo el que mostró un menor tamaño en el crecimiento de micelio contra *Phytophthora* fue en Tri, esto puede deberse al mecanismo de compuestos fungicidas volátiles, los cuales han demostrado influir en el crecimiento de los antagonistas de *Trichoderma*; este caso es parecido a Bc, a pesar de que registró el menor porcentaje de avance de crecimiento con respecto a los otros dos tratamientos.

Respecto a la capacidad de los tratamientos de promover el crecimiento tanto en la parte aérea como en la parte subterránea, las cápsulas en bicapa demostraron tener mejores resultados; el crecimiento de tallo alcanzo los mejores resultados al solo aplicar las cápsulas, sin intervención de algún fitopatógeno. Los resultados fueron similares en el crecimiento de raíz, donde los mejores resultados se alcanzaron con las cápsulas en bicapa sin la participación de alguno de los fitopatógenos de interés.

En cuanto los enfrentamientos, el resultado más favorable en cuanto a la promoción de crecimiento de tallo se obtuvo al confrontar a las cápsulas en bicapa contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, mientras que en el caso de promoción de crecimiento de raíz el mejor resultado se obtuvo en el experimento de confrontación de las cápsulas en bicapa contra *Phytophthora capsici*; de este modo se puede decir que son las cápsulas en bicapa, por su estructura y presentación, las más recomendables como un estimulante de crecimiento en plantas de jitomate en condiciones de invernadero.

Se recomienda profundizar en este experimento con otros fitopatógenos y/o cultivos para saber si este comportamiento es generalizado o existen limitantes.

Respecto a la evaluación de severidad los tratamientos que tuvieron mejores resultados fueron las cápsulas en bicapa enfrentadas contra *Phytophthora capsici* y las cápsulas en combinación de polímeros enfrentadas contra *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, mientras que para incidencia los mejores tratamientos que no mostraron diferencia estadística fueron las cápsulas en bicapa enfrentadas con *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f. e. capsici*, enfrentamiento por separado, y las cápsulas en combinación de polímeros confrontadas con *Fusarium oxysporum f. e. capsici*.

Es recomendable realizar estudios de severidad e incidencia en etapas tempranas de la planta con el fin de evaluar el efecto de las cápsulas contra los fitopatógenos en esta etapa y cuál es su efecto y conveniencia para los productores.

Respecto a la producción de biomasa de la parte aérea en fresco, el mejor resultado se obtuvo con las cápsulas en bicapa sin interferencia de alguno de los fitopatógenos de interés; respecto a los tratamientos de confrontación, los cuatro no tuvieron diferencia significativa, sin embargo, numéricamente los mejores resultados se obtuvieron con las cápsulas en bicapa enfrentadas con ambos fitopatógenos de interés (*Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f.e. capsici*). Resultados similares se obtuvieron en la evaluación del peso fresco de la parte subterránea, donde el mejor resultado se obtuvo con las cápsulas en bicapa, mientras que los tratamientos de confrontación no resultaron diferentes

estadísticamente, aunque numéricamente los que arrojaron los valores más altos fueron las cápsulas en combinación de polímeros confrontadas con ambos fitopatógenos de interés (*Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum f.e. capsici*).

La evaluación del peso seco de la parte aérea, fue congruente con la evaluación en peso fresco, donde las cápsulas en bicapa obtuvieron valores altos de biomasa en seco, mientras que los tratamientos de confrontación no resultaron ser estadísticamente entre ellos a excepción del tratamiento de cápsulas en combinación de polímeros contra *Phytophthora capsici*, el cual generó el valor más bajo, estadística y numéricamente. Resultados similares se obtuvieron al evaluar el peso de la biomasa seca de la parte subterránea (raíz), donde el mejor resultado se obtuvo con la inoculación de las cápsulas en bicapa, únicamente, mientras que el resto de los tratamientos resultaron ser estadísticamente iguales, a excepción del tratamiento de cápsulas en bicapa contra *Phytophthora capsici*, el cual expuso la menor cantidad de biomasa seca de raíz.

Es recomendable profundizar en los estudios de antagonismo en los encapsulados para ajustar velocidades de liberación y si la capacidad de liberación constante es lo más apropiado en campo, además de profundizar en la posibilidad de convertir al polímero como un agente que contribuya al control de microorganismos sin afectar al organismo encapsulado, ya que algunos polímeros, como el quitosano, han mostrado características biosidas con ciertos microorganismos.

Referencias Bibliográficas

- Aldana V. 2009. Manejo químico en diferentes aislados de *Phytophthora capsici* Leo., en Chile (*Capsicum annuum* L.) jalapeño en invernadero. UACH, Pararitología Agrícola. México.
- Alvarez, G. S., M. L. Foglia, G. J. Copello, M. F. Desimone, and L. E. Díaz. 2009. Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 639-646
- Argumedo- Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. y Peña-Cabriaes J. J. 2009. Revisión/ Review El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 25(4): 257-269
- Araneda C. y Valenzuela F. 2009. Microencápsulacion de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. Revista Ciencia Ahora. 22: 9- 19.
- Bastos, D., K. Araujo and M. Leao. 2009. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-capsul based edible film. Journal of Microencápsulation 26(2): 97-103.
- Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C. y Codón A. C. 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. Internacional Micobiology. 7 (4): 249.260.
- Bertolini A. C., Siani A. C. y Grosso R. F. 2001. Stability of monoterpenes encápsulated in Gum Arabic by spray drying. Journal og Agricultural and Food Chemistry. Vol 49: 780- 785.
- CATIE. 1993. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de chile dulce. Serie Técnica. Informe Técnico No. 201. Turrialba, Costa Rica. Editorama, S.A. San José, Costa Rica. 143
- Chandramouli, V., Kailasapathy, P., Peiris, P. Y Chin, J. 2003. Studies on coencápsulation of probiotic bacteria. In Proceedings IXth International workshop on bioencápsulation. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.

- Chaves B. A. 2010. Identificación, control de plagas y enfermedades en hortalizas con uso de extractos naturales, hongos antagonistas y entomopatógenos. INTA-PLATICAR. Cartago. Colombia.
- Chew, M.I.Y., Vega, P.A., Palomo, R.M. y Jiménez, D.F. 2008. Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). Folleto Técnico Num. 15. Campo Experimental La Laguna – INIFAP. Torreón, Coahuila, México. 32 p.
- Chew, M.I.Y., Gaytán, M.A. y Palomo, R.M. 2010. Control químico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.). Agrofaz 10:369-373.
- Durman S, Menéndez A, Godeas A. 1999. Evaluation of *Trichoderma spp.* as antagonistic of *Rhizoctonia solani in vitro* and as biocontrol in greenhouse tomato plants. Revista Argentina de Microbiología 31: 13-18.
- Dutta P., Tripathi S., Mazutti G y Dutta J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Journal Food Chemistry 114: 1173-1182.
- Ezziyyani M., Perez S. C., Ahmed A. S., Requena M. E. y Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.). Anales de Biología. 26: 35-45.
- Ezziyyani M., Hamdache A., Requena A., Egea-Gilabert C. y Candela M. E. 2011. Mejora de la capacidad anti fúngica in vitro e in vivo de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. Anales de Biología 33: 67-77.
- FAOSTAT. 2012. Datos de producción del cultivo de jitomate rojo. www.faostat.com. Fecha de consulta 27/dic/2016
- FAO. 2017. Producción mundial de jitomates frescos 2013. www.faostat.com. Fecha de consulta: 17/ene/2017.
- FAO. 2017. Exportación e importación mundial de jitomates frescos 2013. www.faostat.com. Fecha de consulta: 17/ene/2017.
- Favaro, C., A. Santana, E. Monterrey, M. Trindade and F. Netto. 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. Food Hydrocolloids 24(4): 336-340.

- Fuchs M., Turchiuli C., Bohin M., Cuvelier M., Ordonnaud C., Peyrat M. y Dumoulin E. 2006. Encápsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75: 27- 35.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. y Saurel R. 2007. Applications of spray drying in microencápsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40: 1107 – 1121.
- García R., Riera R., Zambrano C. y Gutiérrez L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa de hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad* 10:115-121.
- Getachew a. 2006. Productos para la Agricultura y Recursos Naturales. Instituto de Marketing Estrategico. Universidad del Estado de Michigan. Michigan. E.E. U.U.
- Hajieghrari B., Torabi-giglou M. y Mohammadi M. R. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*. 7 (8). 359- 378.
- Harman G. 2001. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). <http://www.Biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>.
Fecha de consulta 17/ene/2017
- Harman G. E., Petzoldt R., Comis A. y Chen J. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and Maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 94 (2):147-153.
- Ibarra, J. E., M. C. Del Rincón, E. Galindo, M. Patiño, L. Serrano, R. García, J. A. Carrillo, B. Pereyra-Alfárez, A. Alcázar-Pizaña, H. Luna-Olvera, L. Galán-Wong, L. Pardo, C. Muñoz-Garay, I. Gómez, M. Soberón y A. Bravo. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48: 113-120
- International Service for National Agricultural Research (ISNAR). 1998. Nuevas Demandas Tecnológicas: Marco Metodológico de un proyecto

- INIAs/BID/ISNAR. La Haya, Países Bajos. Copyright © 1998 by the International Service for National Agricultural Research.
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A. 2001. Dictionary of the Fungi. CAB International. UK. 655 pp.
- Kubicek C. P. y Harman G. E. 2002. *Trichoderma* and *Gliocadium*: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Volumen 1 CRC Press. Estados Unidos. 300 p.
- Küçük Ç. y Kivanç M. 2004. *In vitro* Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum*. Turk J. Biol. 28. 111-115.
- Kwak, H., M. Ihm and J. Ahn. 2001. Microencápsulation of β -galactosidasa with fatty acid esters. Journal Dairy Science 84: 1576-1582.
- Leonian L. H. 1922. Stem at fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 12: 401-408.
- Lorito M. y Woo S. L. 2015. Principles of Plant-Microbe interactions. En Principles of Plant-Microbe interactions. Pp 345 - 353
- Lussier C., Veiga V., Baldwin S. 2003. The geochemistry of selenium associated with coal waste in the Elk River Valley, Canada. Environmental Geology. 44: 905-913.
- Mandal S, Puniya A.K, Singh. (2006)Effect of alginate concentrations on survival of microencápsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298.International Dairy Journal 161190-1995.
- Mathivanan N, Prabavathy V, Vijayanandraj V. 2005. Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. J. Phytopathology;153:697-701.
- Pérez, N. 2010. Alternativas al control químico de plagas. Revista Virtual REDESMA 4: 1-13.
- Quiñones, F.J.A. 1980.Enfermedades de los principales cultivos del estado de Nayarit. Circular CIAPAN No. 94. Campo Agrícola Experimental "Santiago Ixcuintla". CIAPAN INIA. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 60 p.

- Ramírez E. M. 1998. Situación actual y tendencias del jitomate rojo en México. El economista. México, D. F.
- Redondo, J.E. 1977. El ahogamiento o damping-off en los almácigos establecidos en el Bajío. Desplegable 67. Campo Agrícola Experimental Bajío – INIA.
- Rivas Reyes, Caridad. 2010. Microencápsulación y estabilización enzimática del jugo de chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Tesis Magister en Ciencias en Bioprocesos. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. México. 34 p
- Sainz, D., Lekka, M., Kulik, A. Y Wandrey, C. 2003. Influence of formulation and preparation on gel and surface characteristics of alginate based microspheres. In Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation. May 25-27. Strasbourg, France. Sp.
- Samuels G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopatology* 96. 195-206.
- Sistema Anual del Comercio Exterior de México (SACEM) 1996-2000, Edición 2002, INEGI, Aguascalientes, México.
- SIAP. (2017). Principales estados productores de jitomate rojo (sept. 2016). www.siap.com.mx. Fecha de consulta: 18/ene/2017.
- SIAP. 2013. Ganancias generadas por el cultivo de jitomate rojo. www.siap.com.mx. Fecha de consulta: 27/dic/2016
- SIAP. (2017). Principales estados productores de jitomate rojo (sept. 2016). www.siap.com.mx. Fecha de consulta: 18/ene/2017.
- Trápaga D. Y (2001). "Influencia de la Apertura Comercial en el Patrón Alimentario del Mexicano Actual", conferencia pronunciada durante el coloquio organizado por El Colegio Nacional.
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. y Valéro J. R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37: 1-20.

- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L. y Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Yañez J., Salazar J., Chaires L., Jiménez J., Márquez M. y Ramos E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva*. 21: 313- 319.