



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

**PATOSISTEMA *Capsicum* spp. – *Fusarium* spp.: DIVERSIDAD DE
ESPECIES Y SU PAPEL EN LA MARCHITEZ DEL CHILE**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

ALEJANDRO JONATHAN GARCÍA CARIÑO

Bajo la dirección de: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma



Chapingo, Texcoco, Edo. de México, mayo 2026

PATOSISTEMA *Capsicum* spp. – *Fusarium* spp.: DIVERSIDAD DE ESPECIES
Y SU PAPEL EN LA MARCHITEZ DEL CHILE

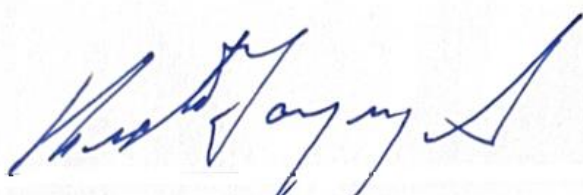
Tesis realizada por **ALEJANDRO JONATHAN GARCÍA CARIÑO** bajo la supervisión del Comité Asesor Indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DIRECTORA: _____

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma



ASESOR: _____

Dr. Héctor Lozoya Saldaña



ASESOR: _____

Dr. José de Jesús López Reynoso

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
DEDICATORIA.....	xii
AGRADECIMIENTOS.....	xiii
DATOS BIOGRÁFICOS	xiv
RESUMEN GENERAL.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Hipótesis	4
1.2.1 Ensayos de patogenicidad.....	4
1.2.2 Pruebas de antagonismo.....	4
1.2.3 Análisis de polimorfismo mediante PCR-RFLP.	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivos generales.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
2 REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Origen de <i>C. annuum</i> L.	7
2.1.1 Cultivo del chile (<i>Capsicum annuum</i> L.): taxonomía y clasificación botánica	8
2.1.2 Producción mundial de chile.....	9
2.1.3 Producción de chile en México	10
2.2 Principales enfermedades de <i>C. annuum</i> L.	13
2.2.1 Marchitez del chile causada por <i>Fusarium</i> spp.....	14

2.3	<i>Fusarium</i> spp.	17
2.3.1	Antecedentes de <i>Fusarium</i> spp.	17
2.3.2	Clasificación taxonómica de <i>Fusarium</i> spp.	18
2.3.3	Morfología de <i>Fusarium</i> spp.	19
2.3.4	Sintomatología de enfermedades provocadas por especies de <i>Fusarium</i>	20
2.3.5	Ciclo de enfermedades provocadas por especies de <i>Fusarium</i>	22
2.3.6	Manejo de las enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> spp.	23
2.4	<i>Trichoderma</i> spp.	26
2.4.1	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp.	27
2.4.2	Descripción morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.	28
2.4.3	Antecedentes de <i>Trichoderma</i> spp. como antagonista.	29
2.4.4	Variabilidad morfológica entre especies	30
2.4.5	Importancia funcional de su morfología	31
2.4.6	Mecanismos de acción de los microorganismos antagónicos	31
2.5	Herramientas moleculares empleadas en la identificación de especies de <i>Fusarium</i>	33
2.5.1	Marcadores morfológicos	33
2.5.2	Marcadores bioquímicos.	34
2.5.3	Marcadores moleculares	34
2.6	Herramientas biotecnológicas	36
2.6.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
2.6.2	RFLP	37
2.6.3	Secuenciación	38
3	MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1	Fase I: Patogenicidad	40
3.2	Ubicación del área de trabajo	40
3.3	Muestreo	40

3.3.1	Recolecta de muestras para el aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.	40
3.4	Aislamiento de microorganismos	41
3.4.1	Aislamiento de tejido vegetal	41
3.4.2	Punta de hifa (<i>Fusarium</i> spp.)	42
3.5	Interacción patógeno – hospedante, patogenicidad de <i>Fusarium</i> en <i>Capsicum</i>	42
3.5.1	Ensayo de patogenicidad en plantas, en condiciones de invernadero	42
3.5.2	Ensayo de patogenicidad en semillas en condiciones <i>in vitro</i>	46
3.5.3	Ensayo de patogenicidad en plantas jóvenes, en condiciones <i>in vitro</i>	48
3.6	Fase II: Antagonismo <i>in vitro</i>	50
3.7	Confrontación dual	50
3.8	Fase III: Caracterización molecular	54
3.8.1	Extracción de ADN	54
3.8.2	Cuantificación del ADN.....	55
3.8.3	Calidad del ADN en gel de agarosa	55
3.8.4	Amplificación del gen TEF (Factor de Alargamiento y Traducción)	56
3.9	RFLPs	57
3.9.1	Gel de poliacrilamida	57
3.9.2	Decodificación de geles y dendrogramas	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Fase I	59
4.1.1	Ensayo de patogenicidad en plantas en condiciones de invernadero	59
4.1.2	Ensayo de patogenicidad en semillas, en condiciones <i>in vitro</i>	61
4.1.3	Ensayo de patogenicidad en plantas jóvenes, en condiciones <i>in vitro</i>	63
4.2	Fase II	66
4.2.1	Confrontación desfasada.....	66
4.2.2	Prueba Kruskal – Wallis (confrontación desfasada)	67
4.2.3	Confrontación simultánea	69

4.2.4	Prueba Kruskal – Wallis (confrontación simultánea)	71
4.3	Fase III	73
4.3.1	Cuantificación del ADN.....	73
4.3.2	Amplificación gen TEF con PCR	73
4.3.3	RFLPs.....	74
4.3.4	Dendrogramas.....	77
5	DISCUSIÓN	84
6	CONCLUSIONES	87
7	LITERATURA CITADA	89

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de chiles que se siembran en México.....	13
Cuadro 2. Principales enfermedades de <i>Capsicum annuum</i> L.	14
Cuadro 3. Concentración de iones nutritivos presentes en la solución Steiner 100% (Steiner, 1961) utilizada para la fertilización de plantas de <i>Capsicum</i> durante el experimento.	43
Cuadro 4. Escala de severidad de daño utilizada para evaluar síntomas causados por especies de <i>Fusarium</i> en variedades de chile (<i>Capsicum</i> spp.).	46
Cuadro 5. Tratamientos evaluados en confrontación dual (desfasada y simultánea) entre especies de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp.	51
Cuadro 6. Escala de antagonismo correlacionado con el porcentaje de inhibición del crecimiento radial propuesto por Skidmore y Dickinson (1976).	53
Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen TEF.....	56
Cuadro 8. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del gen TEF 1- α a un volumen final de 25 μ L.....	57
Cuadro 9. Reactivos empleados para la preparación de un gel de poliacrilamida al 9 % (60 mL).....	58
Cuadro 10. Análisis de varianza (ANOVA) para la severidad de daño causada por especies de <i>Fusarium</i> en plántulas de <i>Capsicum</i> spp. bajo un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 5x6.....	59
Cuadro 11. Estadísticos de ajuste y capacidad predictiva del modelo utilizado para evaluar la severidad de daño en plántulas de <i>Capsicum</i> spp. inoculadas con especies de <i>Fusarium</i>	60
Cuadro 12. Comparación de medias de severidad entre variedades de chile mediante la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).	61
Cuadro 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de patogenicidad en semillas de <i>Capsicum</i> spp. inoculadas con especies de <i>Fusarium</i> spp.	61

Cuadro 14. Resumen del modelo estadístico para la prueba de patogenicidad en semillas de <i>Capsicum</i> spp.	62
Cuadro 15. Comparación de medias entre variedades de <i>Capsicum</i> spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).	62
Cuadro 16. Comparación de medias entre especies de <i>Fusarium</i> spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).	63
Cuadro 17. Análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de patogenicidad en plántulas jóvenes de <i>Capsicum</i> spp. inoculadas con especies de <i>Fusarium</i> spp.	64
Cuadro 18. Resumen de modelo estadístico para la prueba de patogenicidad en plántulas jóvenes de <i>Capsicum</i> spp.	64
Cuadro 19. Comparación de medias entre Variedades de <i>Capsicum</i> spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)	65
Cuadro 20. Comparación de medias entre especies de <i>Fusarium</i> spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)	66
Cuadro 21. Estadísticos de la prueba Kruskal-Wallis para el porcentaje de inhibición en confrontación desfasada.	68
Cuadro 22. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para porcentaje de inhibición en confrontación desfasada.	69
Cuadro 23. Comparaciones múltiples tipo Dunn con corrección de Bonferroni para porcentaje de inhibición entre especies de <i>Trichoderma</i>	69
Cuadro 24. Estadísticos de la prueba de Kruskal-Wallis para porcentajes de inhibición en confrontación simultánea.	71
Cuadro 25. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para porcentaje de inhibición en confrontación simultánea.	72
Cuadro 26. Comparaciones múltiples tipo Dunn con corrección de Bonferroni para porcentaje de inhibición entre especies de <i>Trichoderma</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores <i>Capsicum</i> spp. en 2024 (FAOSTAT 2024).....	10
Figura 2. Principales estados productores de chile en México (Secretaria de Agricultura y Desarrollo Social, 2024).....	11
Figura 3. A) Ubicación de parcelas de recolección de muestras; B) Plantas con síntomas de marchitamiento; C) Zona con mayor afectación por amarillamiento y marchitez.	40
Figura 4. Proceso de aislamiento de microorganismos provenientes de tejidos vegetales.	41
Figura 5. Establecimiento de experimento. A) Plántulas sumergidas en suspensión de conidios; B) Distintas especies de <i>Fusarium</i> spp.; C) Distribución del experimento.	44
Figura 6. Escala de daño visual utilizado para a evaluación de severidad.	45
Figura 7. Inoculación de semillas de <i>Capsicum</i> spp. con solución de esporas de <i>Fusarium</i> spp.	48
Figura 8. Plantas jóvenes de <i>Capsicum</i> spp. inoculadas con <i>Fusarium</i> spp. ...	49
Figura 9. Confrontación desfasada <i>Fusarium</i> spp. vs <i>T. asperellum</i> . Cajas Petri superiores muestran el inicio de confrontación. Placas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.	66
Figura 10. Confrontación desfasada <i>Fusarium</i> spp. vs <i>T. virens</i> . Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestras el final de la confrontación.	67
Figura 11. Confrontación desfasada <i>Fusarium</i> spp. vs <i>T. harzianum</i> . Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.	67

Figura 12. Confrontación simultanea <i>Fusarium</i> spp. vs <i>T. asperellum</i> . Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.	70
Figura 13. Confrontación simultanea <i>Fusarium</i> spp. vs <i>T. virens</i> . Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.	70
Figura 14. Confrontación simultanea <i>Fusarium</i> spp. vs <i>T. harzianum</i> . Cajas Petri superiores muestran el inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.	71
Figura 15. Cuantificación de una muestra de ADN en NanoDrop.....	73
Figura 16. Gel de agarosa 1.5 % con los fragmentos amplificados del gen TEF (750 pb) de las especies de <i>Fusarium</i> (1-6) y control negativo (C-) (H ₂ O).	74
Figura 17. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de <i>Fusarium clavum</i> con enzimas de restricción: A1 (<i>AluI</i>), A2 (<i>HaeIII</i>), A3 (<i>HhaI</i>), A4 (<i>HinfI</i>) y A5 (<i>HpaII</i>), vs geles <i>in silico</i> (negro) usando las mismas enzimas del gel <i>in vitro</i> : <i>AluI</i> (B), <i>HaeIII</i> (C), <i>HhaI</i> (D), <i>HinfI</i> (E) y <i>HpaII</i> (F).	74
Figura 18. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de <i>Fusarium falciforme</i> con enzimas de restricción: A1 (<i>AluI</i>), A2 (<i>HaeIII</i>), A3 (<i>HhaI</i>), A4 (<i>HinfI</i>) y A5 (<i>HpaII</i>), vs geles <i>in silico</i> (negro) usando las mismas enzimas del gel <i>in vitro</i> : <i>AluI</i> (B), <i>HaeIII</i> (C), <i>HhaI</i> (D), <i>HinfI</i> (E) y <i>HpaII</i> (F).	75
Figura 19. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de <i>Fusarium languescens</i> con enzimas de restricción: A1 (<i>AluI</i>), A2 (<i>HaeIII</i>), A3 (<i>HhaI</i>), A4 (<i>HinfI</i>) y A5 (<i>HpaII</i>), vs geles <i>in silico</i> (negro) usando las mismas enzimas del gel <i>in vitro</i> : <i>AluI</i> (B), <i>HaeIII</i> (C), <i>HhaI</i> (D), <i>HinfI</i> (E) y <i>HpaII</i> (F).	75
Figura 20. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de <i>Fusarium noneumartii</i> con enzimas de restricción: A1 (<i>AluI</i>), A2 (<i>HaeIII</i>), A3 (<i>HhaI</i>), A4 (<i>HinfI</i>) y A5 (<i>HpaII</i>), vs geles <i>in silico</i> (negro) usando las mismas enzimas del gel <i>in vitro</i> : <i>AluI</i> (B), <i>HaeIII</i> (C), <i>HhaI</i> (D), <i>HinfI</i> (E) y <i>HpaII</i> (F).	75

Figura 21. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de <i>Fusarium curvatum</i> con enzimas de restricción: A1 (<i>Alul</i>), A2 (<i>HaeIII</i>), A3 (<i>HhaI</i>), A4 (<i>HinfI</i>) y A5 (<i>HpaII</i>), vs geles <i>in silico</i> (negro) usando las mismas enzimas del gel <i>in vitro</i> : <i>Alul</i> (B), <i>HaeIII</i> (C), <i>HhaI</i> (D), <i>HinfI</i> (E) y <i>HpaII</i> (F).	76
Figura 22. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de <i>Fusarium nirenbergiae</i> con enzimas de restricción: A1 (<i>Alul</i>), A2 (<i>HaeIII</i>), A3 (<i>HhaI</i>), A4 (<i>HinfI</i>) y A5 (<i>HpaII</i>), vs geles <i>in silico</i> (negro) usando las mismas enzimas del gel <i>in vitro</i> : <i>Alul</i> (B), <i>HaeIII</i> (C), <i>HhaI</i> (D), <i>HinfI</i> (E) y <i>HpaII</i> (F).	76
Figura 23. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima <i>Alul</i> de <i>Fusarium</i>	78
Figura 24. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima <i>HaeIII</i> de <i>Fusarium</i>	79
Figura 25. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima <i>HhaI</i> de <i>Fusarium</i>	80
Figura 26. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima <i>HinfI</i> de <i>Fusarium</i>	82
Figura 27. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima <i>HpaII</i> de <i>Fusarium</i>	83

DEDICATORIA

A los motores de mi vida, mi esposa Mariana Espíndola y mi bebé que viene en camino, son la motivación principal y el impulso que necesitaba para continuar mis estudios, este trabajo les pertenece enteramente, así como mi corazón...
son mi vida entera

A mi madre, quien siempre me ha impulsado a salir adelante a pesar de todas las adversidades que la vida pudiera ponerme por delante, sin tus consejos, comprensión y motivación este trabajo no hubiera sido posible... todo lo que soy es gracias a ti. Te amo por siempre mamá

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme formar parte de tan honorable institución.

Al departamento de Fitotecnia por brindarme su apoyo durante la realización de esta investigación.

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su invaluable apoyo, amistad y consejos que fueron una gran guía durante mi estancia en el posgrado.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su comprensión, amistad y consejos que fueron pilar para que este proyecto tomara forma.

Al Dr. José de Jesús López Reynoso, por su invaluable amistad, consejos e ideas para este trabajo.

Al Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego, por sus buenos consejos y su infinita paciencia.

A Lolita por sus palabras, consejos, regaños y profundas pláticas acompañadas siempre de un buen café, hicieron que entendiera la vida de una manera diferente y por su gran apoyo que ayudó a concluir este proyecto.

A mi papá, Salvador Aguilar Cerezo, tus consejos y comprensión siempre han sido un refugio.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Alejandro Jonathan García Cariño
Fecha de nacimiento	28 de noviembre de 1995
Lugar de nacimiento	Gustavo A. Madero Distrito Federal
CURP	GACA951128HDFRRL02
Profesión	Ingeniero Agrobiotecnólogo
Cédula profesional	13912845

Desarrollo académico

Bachillerato	Centro de Estudios Tecnológicos y de Servicios No. 33
Licenciatura	Ingeniero Agrobiotecnólogo de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros

RESUMEN GENERAL

PATOSISTEMA *Capsicum* spp. – *Fusarium* spp.: DIVERSIDAD DE ESPECIES Y SU PAPEL EN LA MARCHITEZ DEL CHILE

La marchitez del chile asociada a *Fusarium* spp. constituye un patosistema altamente dinámico, determinado por la interacción entre la variabilidad genética del patógeno y la respuesta diferencial del hospedante. En este estudio se evaluó la virulencia de especies de *Fusarium* en cuatro variedades de *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense*, especies importantes para México mediante ensayos en semillas y plántulas. Se realizaron parámetros de incidencia, severidad y efectos en el desarrollo vegetal. Paralelamente, se determinó el potencial antagonista de *Trichoderma asperellum*, *T. virens* y *T. harzianum* bajo esquemas de confrontación dual, evidenciando diferencias en su capacidad inhibitoria. La identidad de los aislados de *Fusarium* fue validada mediante PCR-RFLP del gen *tef-1α*. Los resultados evidencian una marcada variabilidad en la agresividad de *Fusarium* spp. y en la eficacia de *Trichoderma*, resaltando la importancia de enfoques integrados para el manejo sostenible de la marchitez en *Capsicum*.

Palabras clave: *Fusarium* spp., *Capsicum* spp., *Trichoderma* spp., patogenicidad, control biológico, antagonismo.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Alejandro Jonathan García Cariño
Director de Tesis: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ABSTRACT

Capsicum spp. – *Fusarium* spp. PATHOSYSTEM: SPECIES DIVERSITY ON
CHILI WILT

Fusarium spp. wilt in chilli peppers constitutes a highly dynamic pathosystem, determined by the interaction between the genetic variability of the pathogen and the differential response of the host. In this study, the virulence of different *Fusarium* species was evaluated in four varieties of *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense*, which are important species for Mexico through seed and seedling trials. Parameters of incidence, severity and effects on plant development were calculated. In parallel, the antagonistic potential of *Trichoderma asperellum*, *T. virens*, and *T. harzianum* was determined under dual confrontation schemes, revealing differences in their inhibitory capacity. The identity of the *Fusarium* isolates was validated by PCR-RFLP of the *tef-1 α* gene. The results show marked variability in *Fusarium* spp. aggressiveness and *Trichoderma* efficacy, highlighting the importance of integrated approaches for the sustainable management of wilt in *Capsicum*.

Keywords: *Fusarium* spp., *Capsicum* spp., *Trichoderma* spp., Pathogenicity, biological control, antagonism.

Thesis of Master in Science in Horticulture, Autonomus University of Chapingo
Author: Alejandro Jonathan García Cariño
Advisor: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Las interacciones entre los hongos fitopatógenos y sus hospedantes constituyen un elemento central para comprender el desarrollo y la dinámica de las enfermedades agrícolas, debido a los procesos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que determinan la susceptibilidad o la resistencia vegetal (Agrios, 2005). En el caso de la marchitez del chile, el patosistema *Fusarium* spp. – *Capsicum* spp. representa un sistema complejo debido a la diversidad de especies involucradas, a sus mecanismos de patogenicidad y a la variabilidad genética presente tanto en el patógeno como en el hospedante (Leslie & Summerell, 2006). *Fusarium* es un género caracterizado por su alta plasticidad genética, amplia distribución en suelos agrícolas y capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales, lo que facilita la colonización de tejidos vegetales, la evasión de defensas y el desarrollo de marchitez vascular y pudrición radicular (O'Donnell et al., 1998).

El cultivo de chile (*Capsicum* spp.) posee una gran relevancia agrícola, nutricional, económica y cultural a nivel mundial, siendo México uno de los principales centros de origen y diversificación del género (Pathirana, 2013). La marchitez es considerada una de las enfermedades más problemáticas para el cultivo de chile, debido a que puede provocar pérdidas de producción cercanas al 40 %. Esta situación ha llevado incluso a que en algunas regiones productoras se reduzca la superficie destinada al cultivo. Generalmente, la enfermedad se desarrolla con mayor facilidad cuando existen condiciones de exceso de humedad en el suelo, ya sea por riegos abundantes o por lluvias intensas. Las plantas afectadas comienzan a mostrar síntomas de marchitamiento, acompañados por un oscurecimiento en la base del tallo. Con el avance de la enfermedad, los frutos también resultan afectados, presentando deshidratación, arrugamiento y finalmente pudrición (Pernezny et al., 2003).

Si bien *Fusarium oxysporum* ha sido históricamente identificado como un agente asociado a la marchitez, diversos estudios han demostrado que el patosistema incluye múltiples especies de *Fusarium* con distintas estrategias de infección, virulencia e interacciones biológicas que pueden coexistir en el suelo o en tejidos afectados (O'Donnell et al., 2008). Estas interacciones incluyen competencia por nicho, antagonismo, sinergias metabólicas y respuestas diferenciadas frente a compuestos de defensa sintetizados por el chile, lo que contribuye a variaciones en la severidad de la enfermedad y dificulta la implementación de estrategias de manejo eficaces (Dean et al., 2012).

Dentro de este sistema, los hongos benéficos del género *Trichoderma* desempeñan un papel relevante como antagonistas naturales de patógenos del suelo. *Trichoderma* spp. posee mecanismos de acción multifactoriales, como micoparasitismo, antibiosis, competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas e inducción de respuestas de defensa en la planta (Druzhinina et al., 2011). Su presencia en la rizosfera puede modificar significativamente la interacción del patógeno con el chile, regulando la colonización, la progresión de la enfermedad y la expresión de genes asociados a la resistencia o a la susceptibilidad vegetal (Mukherjee et al., 2013).

El análisis de estas relaciones es fundamental para comprender la dinámica ecológica del patosistema y su impacto en la fisiología del cultivo. En este contexto, el presente estudio se enfoca en caracterizar la interacción entre *Fusarium* spp., *Capsicum* spp. y *Trichoderma* spp. mediante aproximaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas que permitan esclarecer los mecanismos de patogenicidad, antagonismo y coadaptación que determinan la severidad de la marchitez del chile. Esta información es esencial para avanzar hacia estrategias integradas de manejo y para comprender los procesos evolutivos que sustentan las interacciones entre patógenos, hospederos y microorganismos benéficos en agroecosistemas complejos (Ploetz, 2015).

1.1 Justificación

La marchitez del chile constituye una de las enfermedades más limitantes para la producción de *Capsicum* spp., debido a las pérdidas que ocasiona tanto en rendimiento como en calidad del fruto en diversas regiones productoras del mundo, particularmente en sistemas intensivos de cultivo (Zhang et al., 2013). Tradicionalmente, *Fusarium oxysporum* ha sido considerado el principal agente etiológico asociado a este síndrome; sin embargo, estudios recientes han demostrado que otras especies del género *Fusarium* pueden coexistir en el mismo nicho ecológico y participar de manera conjunta en el desarrollo y severidad de la enfermedad, conformando complejos patogénicos más dinámicos de lo que se pensaba inicialmente (O'Donnell et al., 2013).

La elevada diversidad genética del género *Fusarium* y su notable capacidad de adaptación a diferentes hospederos y condiciones ambientales explican su éxito como patógeno en numerosos agroecosistemas. Esta variabilidad se asocia con la presencia de distintos factores de patogenicidad, como la producción de micotoxinas, enzimas degradadoras de la pared celular y proteínas efectoras que interfieren con los mecanismos de defensa de la planta (Ma et al., 2010). En Chile, la expresión de la enfermedad depende en gran medida de la interacción específica entre el genotipo del hospedante y la identidad del aislado patogénico, así como de las condiciones del suelo y del microbiota asociada a la rizosfera (Gordon, 2017).

El análisis detallado de estas interacciones resulta fundamental para comprender los procesos que determinan la patogenicidad y la agresividad dentro del complejo *Fusarium* en *Capsicum* spp. Este enfoque permite identificar las especies con mayor capacidad de causar daño y reconocer los factores moleculares y ecológicos que modulan la dinámica de la enfermedad en campo (O'Donnell et al., 2013).

1.2 Hipótesis

1.2.1 Ensayos de patogenicidad

Existen diferencias significativas en la severidad de la marchitez y/o en los efectos fisiológicos inducidos por las distintas especies de *Fusarium* en las variedades de *Capsicum* spp. debido a que pertenecen a diferentes especies.

1.2.2 Pruebas de antagonismo

Trichoderma asperellum, *T. virens* y *T. harzianum* difieren en su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de las especies de *Fusarium* bajo confrontación simultánea y/o desfasada.

1.2.3 Análisis de polimorfismo mediante PCR-RFLP.

Los patrones de restricción obtenidos mediante RFLP del amplicón *tef-1α* en condiciones de laboratorio e *in silico*, permiten diferenciar y confirmar la identidad taxonómica de las especies de *Fusarium* utilizadas en los ensayos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivos generales

- Evaluar el comportamiento patogénico de diversas especies de *Fusarium* asociadas a la marchitez del chile, mediante ensayos de infección en semillas y plantas de *Capsicum* spp., con el fin de determinar niveles de virulencia, susceptibilidad varietal y efectos fisiológicos inducidos durante el proceso infeccioso.
- Determinar la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma harzianum* frente a diferentes especies de *Fusarium*, mediante pruebas de confrontación dual desfasada y simultánea, en condiciones *in vitro*.

- Corroborar la identidad taxonómica de las especies de *Fusarium* empleadas en los ensayos patogénicos mediante análisis PCR-RFLP, tanto *in vitro* (digestión enzimática del amplicón *tef-1α*) como *in silico* (simulación computacional de patrones de restricción), con el fin de validar su correspondencia con las secuencias de nucleótidos previamente obtenidas y asegurar la confiabilidad de los estudios de virulencia y antagonismo.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar la severidad y progresión de la marchitez causada por cada especie de *Fusarium* en cinco variedades de *Capsicum* spp., utilizando escalas cuantitativas y parámetros morfológicos estandarizados.
2. Evaluar el impacto fisiológico de la infección mediante la medición de mortalidad, altura y vigor de plántulas inoculadas con cada especie de *Fusarium*.
3. Evaluar y comparar la respuesta de los genotipos de chile Jalapeño, Serrano, Poblano, Guajillo y Habanero frente a los aislados patogénicos mediante la cuantificación de la incidencia, severidad, progreso de la enfermedad y su efecto en las variables agronómicas, con el fin de identificar materiales con resistencia o tolerancia natural.
4. Determinar la inhibición del crecimiento micelial de las especies de *Fusarium* frente a *T. asperellum*, *T. virens* y *T. harzianum* mediante confrontación dual simultánea y desfasada.
5. Comparar la eficacia antagonista entre los tres tratamientos de *Trichoderma*, evaluando la influencia del tiempo de implantación del antagonista sobre el nivel de inhibición obtenido.
6. Seleccionar la especie o cepa de *Trichoderma* con mayor potencial de biocontrol con base en la magnitud del efecto antagonista sobre el patógeno y la consistencia de su respuesta en las diferentes repeticiones experimentales.

7. Determinar el polimorfismo entre *F. clavum*, *F. falciforme*, *F. languescens*, *F. noneumartii*, *F. clavum* y *F. nirenbergiae*, mediante el análisis de restricción *in silico* y PCR-RFLP *in vitro* sobre regiones *tef-1α* de las especies mencionadas.
8. Comparar los fragmentos observados de los análisis de RFLP *in silico* con aquellos de las secuencias de nucleótidos previamente obtenidas, para estimar la confiabilidad de la información *in silico*.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen de *C. annuum* L.

El chile, perteneciente al género *Capsicum*, es uno de los cultivos más antiguos y culturalmente significativos de América. Su origen se remonta al continente americano, donde comenzó su domesticación hace más de 6,000 años. Diversos estudios arqueobotánicos sitúan las primeras evidencias de uso y domesticación en regiones que actualmente corresponden a México, Bolivia y Perú, áreas reconocidas como centros primarios de diversidad genética del género *Capsicum* (Kraft et al., 2014). Entre estas regiones, México destaca en particular como uno de los principales centros de domesticación, donde se desarrollaron numerosas variedades que posteriormente se dispersaron a otras zonas del continente (Pickersgill, 1997).

El hallazgo de restos de semillas, fitolitos y fragmentos de frutos en sitios arqueológicos como Coxcatlán, en el Valle de Tehuacán, demuestra que el chile formaba parte de la dieta de grupos humanos desde aproximadamente 6,000–7,000 años antes del presente (Perry et al., 2007). Estas evidencias lo sitúan entre los primeros cultivos domesticados en Mesoamérica, junto con el maíz, el frijol y la calabaza. Durante este proceso, la selección humana favoreció características como la mayor pungencia, la coloración específica del fruto, tamaños variables y diferentes grados de adaptación a climas diversos (Eshbaugh, 1993).

La gran diversidad morfológica del chile en México —considerado el país con mayor variabilidad fenotípica y genética del género *Capsicum*— es resultado de miles de años de selección cultural y ecológica. En este territorio se originaron y diversificaron numerosas variedades de *C. annuum*, la especie más cultivada del mundo, que incluye tipos ampliamente conocidos como jalapeño, serrano, ancho, guajillo y poblano (Bosland & Votava, 2012). Esta diversidad se explica tanto por la interacción entre poblaciones silvestres y domesticadas, como por la

adaptación a ecosistemas contrastantes que van desde zonas áridas hasta ambientes tropicales húmedos.

El chile también desempeñó un papel central en las culturas prehispánicas. Se utilizó como alimento, condimento, planta medicinal e incluso como instrumento ritual y de intercambio comercial. Civilizaciones como los mayas y los mexicas registraron su importancia en códices y representaciones iconográficas, además de integrarlo en prácticas culinarias hoy fundamentales en la gastronomía mexicana (Long-Solis & Vargas, 2005). La relevancia cultural del chile contribuyó a su diversificación, ya que las comunidades seleccionaban activamente los frutos con características preferidas para usos específicos.

2.1.1 Cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.): taxonomía y clasificación botánica

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las especies hortícolas de mayor relevancia dentro de la familia Solanaceae, tanto por su valor alimentario como por su amplia diversidad morfológica y genética. Desde el punto de vista taxonómico, pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Solanales y familia Solanaceae, la cual agrupa a diversos cultivos de importancia económica como el tomate, la papa y la berenjena. Dentro de esta familia, el género *Capsicum* se distingue por la producción de frutos tipo baya con diferentes niveles de pungencia, característica asociada a la síntesis de capsaicinoides (Barboza et al., 2019).

La especie *C. annuum* presenta una notable variabilidad fenotípica que se refleja en la forma, tamaño, color y grado de picor de los frutos, lo que ha permitido su diversificación en numerosos tipos comerciales, entre los que se incluyen chiles dulces, pimientos y variedades picantes. Esta plasticidad morfológica está relacionada con su proceso de domesticación y con la selección realizada en distintos sistemas agrícolas y regiones ecológicas. Su origen se sitúa en Mesoamérica, donde fue domesticada a partir de poblaciones silvestres y

posteriormente dispersada hacia otras partes del mundo, adaptándose a una amplia gama de condiciones ambientales (Kraft et al., 2014).

Botánicamente, *C. annuum* es una planta herbácea perenne de crecimiento indeterminado que en sistemas de producción se maneja como anual. Presenta un sistema radical pivotante con abundantes raíces secundarias, tallos ramificados de consistencia semileñosa y hojas simples, generalmente de forma ovada a lanceolada. Las flores son solitarias o aparecen en pequeños grupos en las axilas de las hojas, con corola de color blanco a verdoso y androceo formado por cinco o más estambres. El fruto corresponde a una baya hueca con placentación axilar, donde se insertan las semillas, y es en este tejido placentario donde se sintetizan los compuestos responsables de la pungencia (Bosland & Votava, 2012).

En términos agronómicos, esta especie destaca por su capacidad de adaptación a diferentes condiciones de cultivo, lo que ha favorecido su establecimiento en regiones tropicales y templadas de todo el mundo. Su importancia económica radica en la diversidad de usos del fruto, que puede consumirse en estado fresco, seco o procesado, además de su empleo en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Esta versatilidad ha impulsado el desarrollo de numerosos programas de mejoramiento genético orientados a incrementar el rendimiento, la calidad del fruto y la resistencia a factores bióticos y abióticos (Barboza et al., 2019)

2.1.2 Producción mundial de chile

China se mantiene como el principal productor (16,7 millones de toneladas), mientras que México ocupa el cuarto lugar con 2,7 millones de toneladas, por detrás de Turquía e Indonesia (FAOSTAT, 2024) (Figura 1).

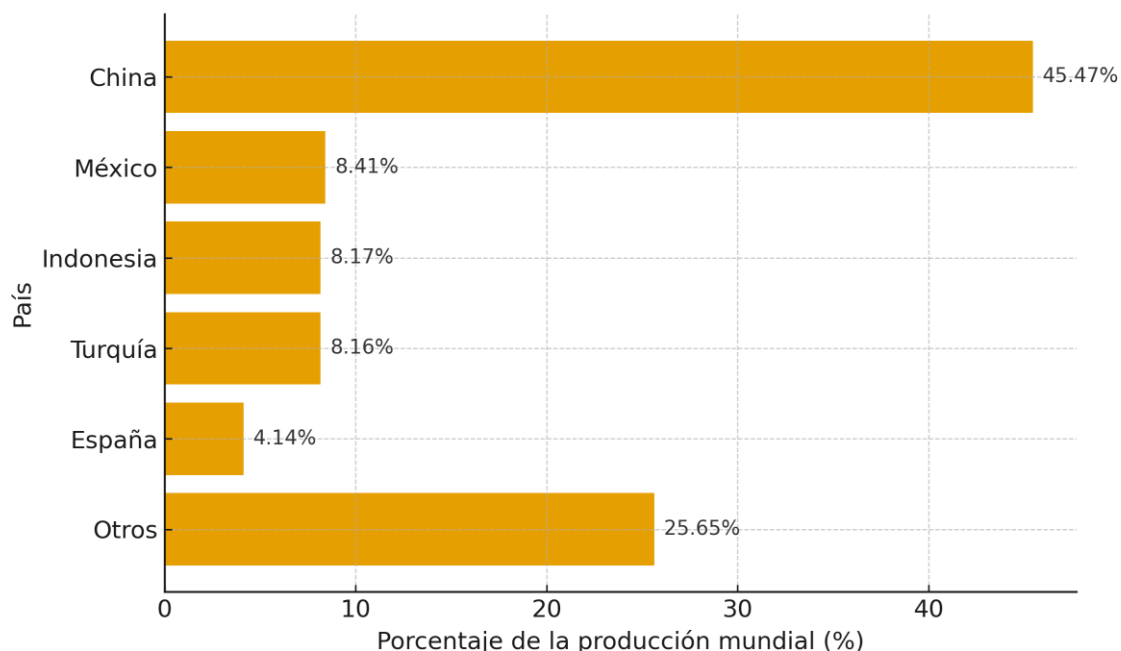


Figura 1. Principales países productores *Capsicum* spp. en 2024 (FAOSTAT 2024).

México es reconocido como el principal centro de diversidad del género *Capsicum*, ya que en su territorio se concentra una amplia variabilidad de formas cultivadas y silvestres. La producción comercial de chile se distribuye en distintas regiones del país, entre las que destacan entidades como Sinaloa, Sonora, Baja California Sur, Jalisco, San Luis Potosí, Veracruz, Tamaulipas, Guanajuato y Michoacán, que en conjunto aportan una proporción significativa del volumen nacional. No obstante, la relevancia de este cultivo trasciende el ámbito económico. El chile forma parte de la identidad cultural de México y ha estado ligado a la alimentación y a las prácticas tradicionales desde tiempos prehispánicos, con evidencias de su uso que se remontan aproximadamente a 7000 a.C. Su permanencia a lo largo de la historia lo ha convertido en un elemento emblemático que conecta el pasado con la vida cotidiana actual de la población (Porrás et al., 2019).

2.1.3 Producción de chile en México

La producción de chile en México constituye una de las actividades hortícolas más importantes del país por su relevancia económica, cultural, culinaria y agroindustrial. México es reconocido como centro de origen y diversificación del

género *Capsicum*, lo que ha permitido el desarrollo de una amplia variedad de tipos y cultivares adaptados a condiciones agroclimáticas contrastantes, desde zonas áridas del norte hasta regiones tropicales del sureste (Bosland & Votava, 2012). La diversidad genética y morfológica del chile mexicano no solo alimenta la gastronomía nacional, sino que también sostiene cadenas productivas que incluyen el mercado fresco, la industria de deshidratados, conservas, salsas, colorantes y productos de exportación.

De acuerdo con datos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Social (SADER), el chile verde se mantiene como una de las hortalizas de mayor volumen de producción en México. En 2024, los estados con mayor aportación al volumen nacional fueron Sinaloa, Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí y Sonora (Figura 2), lo que refleja la fortaleza productiva del norte del país y su infraestructura agrícola tecnificada (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2024). El grupo de “chile verde” abarca principalmente variedades de *C. annuum*, como jalapeño, serrano, poblano y otros tipos regionales (Cuadro 1), cuyo cultivo se destina tanto al mercado interno como a la agroindustria.

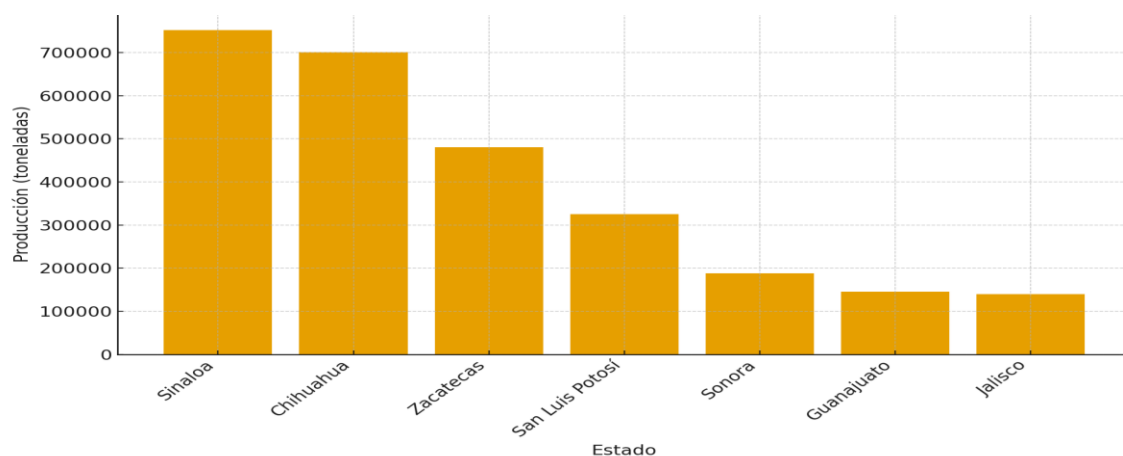


Figura 2. Principales estados productores de chile en México (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Social, 2024).

Por otro lado, los chiles secos —como guajillo, ancho, pasilla y de árbol— representan un componente esencial de la cocina tradicional mexicana y de industrias como la elaboración de moles, adobos y salsas. Estos se producen predominantemente en entidades del altiplano como Zacatecas, San Luis Potosí

y Durango (Aguirre-Hernández & Muñoz Ocotero, 2015). Su importancia radica en su demanda estable en los mercados nacionales y en su creciente valor agregado mediante productos transformados.

El chile habanero posee una notable relevancia económica debido a que actualmente es uno de los vegetales con alta demanda tanto en el mercado nacional como en el internacional. Su importancia no se limita únicamente a su consumo como alimento, sino también a que representa una fuente destacada de colorantes naturales y de compuestos fotoquímicos con efectos benéficos para la salud, entre los que destacan los capsaicinoides (Chan-Chunab et al., 2011). Estas características del fruto han favorecido su producción, ya que los capsaicinoides presentan diversas aplicaciones industriales y farmacéuticas, utilizándose en áreas como la medicina, la elaboración de cosméticos, la fabricación de pinturas e incluso en la producción de gas lacrimógeno, entre otros usos (Pérez-Gutiérrez et al., 2008).

Cuadro 1. Tipos de chiles que se siembran en México

No.	Variedad / grupo comercial de chile	Principales estados productores (según SIAP, 2023)
1	Chile verde (principalmente jalapeño, serrano, poblano y otros tipos de <i>C. annuum</i>)	Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas, Veracruz, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Sonora, San Luis Potosí y Puebla; estos estados concentran la mayor parte de la superficie cosechada y la producción nacional de chile verde.
2	Chile seco (principalmente guajillo, ancho, pasilla, de árbol y otros tipos de <i>C. annuum</i>)	Zacatecas, San Luis Potosí, Chihuahua y Durango; de acuerdo con los cierres agrícolas de 2023, estos estados se ubican entre los principales productores nacionales de chile seco.
3	Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	Campeche, Yucatán y Quintana Roo; en conjunto, estos estados concentran la mayor parte de la superficie sembrada y el volumen de producción de chile habanero reportados por SIAP en años recientes (con información actualizada a 2022–2023).

2.2 Principales enfermedades de *C. annuum* L.

Un patógeno de relevancia es *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, causante de la marchitez vascular, que interrumpe el flujo de agua en xilema y provoca el colapso progresivo de la planta (Gordon, 2017).

En conjunto, estas enfermedades (Cuadro 2) limitan el rendimiento agrícola, incrementan los costos de producción y reducen la vida poscosecha. Su importancia agronómica se explica por la combinación de su fácil diseminación, la capacidad de supervivencia del inóculo en el suelo y la necesidad de estrategias integradas de manejo basadas en prácticas culturales, variedades resistentes y control biológico o químico (Bosland & Votava, 2012).

Cuadro 2. Principales enfermedades de *Capsicum annuum* L.

Microorganismo que afecta	Nombre científico	Nombre común de la enfermedad	Parte afectada
Oomiceto	<i>Phytophthora capsici</i>	Pudrición de raíz, tallo y fruto	Raíz, cuello, tallo, fruto
Hongo vascular	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>capsici</i>	Marchitez vascular	Xilema, raíces, parte aérea secundaria
Hongo necrotrófico	<i>Colletotrichum</i> spp.	Antracnosis	Frutos (principalmente), tallos
Hongo foliar	<i>Cercospora capsici</i>	Mancha foliar cercospórica	Hojas
Virus	Virus del Mosaico del Tabaco (<i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV)	Mosaico del chile	Hojas y brotes tiernos

2.2.1 Marchitez del chile causada por *Fusarium* spp.

La producción de chile (*Capsicum* spp.) es una de las actividades hortícolas de mayor relevancia económica y sociocultural en México. El país se ubica entre los principales productores a nivel mundial, con una superficie anual que supera las 150 mil hectáreas y un valor de producción superior a 28 mil millones de pesos,

según cifras recientes de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2024). Sin embargo, este sistema productivo enfrenta serias amenazas fitosanitarias, entre las cuales destaca la marchitez causada por especies del género *Fusarium*, un complejo de hongos del suelo que afecta diversas etapas del cultivo y genera pérdidas significativas en las regiones productoras.

La marchitez ocasionada por especies del género *Fusarium* representa una de las principales limitantes fitosanitarias en la producción de hortalizas, debido a las pérdidas económicas y de rendimiento que provoca en diversos cultivos de importancia agrícola. En el caso del chile (*Capsicum annuum* L.), diferentes investigaciones realizadas en México han documentado la presencia de este patógeno en regiones productoras del norte y centro del país, donde las condiciones edáficas, la permanencia del inóculo en el suelo y las prácticas continuas de monocultivo favorecen el desarrollo y dispersión de la enfermedad. Asimismo, se ha señalado que especies como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se encuentran asociadas con síntomas de marchitez vascular, necrosis radicular y muerte prematura de plantas en estados productores de chile como Guanajuato, Michoacán, Sinaloa, Zacatecas y Durango (Albañil-Juárez et al., 2018).

Las enfermedades asociadas a especies del género *Fusarium* constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios en la producción de chile en México, ya que pueden ocasionar reducciones importantes en el rendimiento y la calidad del cultivo. La severidad del daño depende de factores como la densidad del patógeno en el suelo, la susceptibilidad genética del material vegetal y las condiciones ambientales predominantes durante el ciclo agrícola. Además, la permanencia de estructuras de resistencia del hongo en el suelo favorece la reincidencia de la enfermedad en parcelas con historial de infestación, incrementando el impacto económico en las zonas productoras (González-Castro et al., 2023). En casos severos, especialmente en zonas de producción intensiva bajo riego, se han registrado reducciones superiores al 80 %, lo que compromete

la rentabilidad del cultivo y la sostenibilidad económica de pequeños y medianos productores (Ramírez Meraz & Méndez Aguilar, 2018).

La presencia de especies de *Fusarium* en cultivos de chile representa un problema fitosanitario de alta relevancia debido a que sus efectos trascienden la reducción del rendimiento agrícola, afectando también los costos de producción y manejo del cultivo. La capacidad de este hongo para permanecer viable en el suelo durante periodos prolongados mediante estructuras de resistencia, como las clamidosporas, dificulta su erradicación y favorece la reincidencia de la enfermedad en ciclos posteriores. Por esta razón, el manejo del patógeno generalmente requiere la implementación de estrategias integradas que incluyen rotación de cultivos, desinfección del suelo, incorporación de microorganismos antagonistas y utilización de materiales vegetales con cierto nivel de tolerancia, con el objetivo de disminuir la presión de inóculo y reducir los daños ocasionados por la enfermedad (Bubici et al., 2019). Estas prácticas, aunque necesarias, suponen un incremento considerable de los costos de producción, especialmente para aquellos productores con recursos limitados.

El incremento en la incidencia de enfermedades asociadas al género *Fusarium* en el cultivo de chile ha generado un mayor interés por comprender la diversidad de especies involucradas y su comportamiento bajo distintas condiciones de producción agrícola. Estudios recientes han demostrado que la marchitez vascular en chile no se atribuye exclusivamente a una sola especie patógena, sino a la interacción de varios integrantes del complejo *Fusarium*, cuya distribución y agresividad pueden variar según las características edafoclimáticas y el manejo agronómico del cultivo. Entre las especies frecuentemente identificadas en sistemas comerciales de producción destacan *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*, las cuales han sido relacionadas con síntomas de necrosis radicular, marchitez y reducción del vigor vegetal (Leslie & Summerell, 2006).

2.3 *Fusarium* spp.

2.3.1 Antecedentes de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* agrupa un gran número de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el ambiente, especialmente en el suelo y en restos de materia vegetal en descomposición. Muchas de estas especies forman parte del microbiota natural del suelo, aunque varias de ellas son reconocidas por su capacidad de actuar como patógenos de plantas, ocasionando enfermedades que afectan a numerosos cultivos de importancia agrícola. Debido a su relevancia en la fitopatología, la micotoxicología y otras áreas de estudio, este género ha sido ampliamente investigado y su clasificación ha sido revisada con el avance de herramientas moleculares y filogenéticas. Actualmente, *Fusarium* es considerado uno de los grupos de hongos más importantes en el ámbito agrícola y científico, ya que incluye especies que influyen significativamente en la sanidad vegetal y en la producción de alimentos a nivel mundial (Geiser et al., 2013).

A lo largo del siglo XX, las especies del género *Fusarium* comenzaron a recibir mayor atención científica debido a su relación con enfermedades graves en diversos cultivos agrícolas. Un ejemplo ampliamente documentado es la enfermedad conocida como marchitez del banano o “mal de Panamá”, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, la cual ocasionó importantes pérdidas económicas en plantaciones comerciales de banano en diferentes regiones del mundo. Este problema fitosanitario impulsó numerosas investigaciones orientadas a comprender los mecanismos de patogenicidad del hongo y su interacción específica con los hospederos vegetales. De manera paralela, distintos estudios identificaron otras especies de *Fusarium* responsables de enfermedades como marchitez vascular, pudriciones radiculares y daños poscosecha en cultivos de cereales, hortalizas y plantas ornamentales, lo que consolidó la relevancia de este género en el ámbito de la fitopatología agrícola (Ploetz, 2015).

Nelson, Toussoun y Marasas (1983) desarrollaron marcos taxonómicos detallados basados en la morfología, el crecimiento cultural y las características conidiales, lo que permitió ordenar numerosos complejos de especies. No obstante, la plasticidad fenotípica continuó suscitando controversias. Con la llegada de herramientas moleculares en los años noventa, se produjo una revolución taxonómica: secuencias como ITS, *tef-1 α* y β -tubulina permitieron establecer límites filogenéticos más precisos y resolver complejos de especies crípticas, como *Fusarium solani* y *Fusarium fujikuroi* (O'Donnell et al., 1998).

2.3.2 Clasificación taxonómica de *Fusarium* spp.

La posición taxonómica del género *Fusarium* ha sido refinada en las últimas décadas gracias al uso de la filogenia multilocus y de análisis genómicos. Actualmente, *Fusarium* se ubica en el filo Ascomycota, caracterizado por la producción de ascosporas en estructuras denominadas ascos. En niveles inferiores, se sitúa dentro del orden Hypocreales y de la familia Nectriaceae, un grupo que incluye numerosos hongos fitopatógenos de importancia agrícola (Aoki et al., 2014).

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

En años recientes, los avances en análisis filogenéticos y herramientas de biología molecular han permitido comprender con mayor precisión la diversidad del género *Fusarium*. Investigaciones modernas han demostrado que este grupo

de hongos incluye múltiples linajes evolutivos organizados en diversos complejos de especies. Entre los complejos más estudiados se encuentran *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium solani* y *Fusarium sambucinum*, los cuales incluyen numerosas especies con gran relevancia en la fitopatología debido a su capacidad para causar enfermedades en diferentes cultivos agrícolas. Este enfoque taxonómico basado en complejos de especies ha mejorado considerablemente la precisión en la identificación de estos hongos y ha facilitado el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular utilizados tanto en investigación como en programas de manejo sanitario de cultivos (Geiser et al., 2013).

2.3.3 Morfología de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* se caracteriza por una notable diversidad morfológica que ha sido históricamente fundamental para su identificación, aunque en la actualidad se complementa con herramientas moleculares. Los miembros del género presentan hifas hialinas, septadas y de crecimiento relativamente rápido, formando colonias de tonalidades variables que incluyen blanco, rosa, salmón, violeta o rojizo, según la especie y el medio de cultivo. La textura de las colonias puede ser algodonosa, lanosa o floculosa, y con frecuencia producen pigmentos difusibles en el medio, especialmente en tonos rojizos, asociados a complejos como *F. oxysporum* y *F. fujikuroi* (Aoki et al., 2014).

Una de las características más distintivas de *Fusarium* es la producción de macroconidios falcados, generalmente multicelulares y con células apicales y basales diferenciadas. Estos macroconidios suelen presentar de tres a cinco septos y se desarrollan sobre conidióforos simples o sobre esporodoquios que pueden ser de color naranja o salmón. Los microconidios, en cambio, suelen ser unicelulares, ovoides o elipsoidales, y se producen en falsas cabezuelas o en monofiálides y polifiálides, según el complejo de especies. Algunas especies también producen clamidosporas, estructuras globosas de resistencia que pueden formarse de forma terminal o intercalar y son esenciales para la supervivencia en el suelo (Leslie & Summerell, 2006).

Las características culturales también son útiles para diferenciar especies dentro del género *Fusarium*. Cuando estos hongos se cultivan en medios artificiales, pueden observarse variaciones en la apariencia de las colonias, lo que aporta información valiosa para su identificación preliminar. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* generalmente desarrolla colonias con abundante micelio de aspecto algodonoso y crecimiento relativamente compacto. En contraste, especies pertenecientes al complejo *Fusarium solani* suelen formar colonias más extendidas y de superficie relativamente plana, que en algunos casos presentan tonalidades verdosas o azuladas. Asimismo, rasgos como la presencia de esporodoquios, la velocidad de crecimiento del micelio, la pigmentación del cultivo y el tamaño o la forma de los conidios han sido tradicionalmente utilizados para distinguir diferentes complejos de especies, entre ellos *Fusarium sambucinum* y *Fusarium fujikuroi*. Sin embargo, investigaciones recientes señalan que estas características morfológicas deben evaluarse con cautela, ya que las especies de *Fusarium* pueden mostrar una considerable variabilidad fenotípica dependiendo de las condiciones de cultivo y del ambiente (Leslie & Summerell, 2006)

Los avances recientes en sistemática han demostrado que la morfología por sí sola no es suficiente para delimitar especies dentro de *Fusarium*, especialmente debido a la presencia de linajes crípticos que comparten características culturales y conidiales similares. Sin embargo, la descripción morfológica continúa siendo una herramienta clave en laboratorios de diagnóstico agrícola, ya que permite identificar patrones consistentes asociados a complejos de especies específicas, lo que facilita la selección de estrategias de control y manejo de enfermedades (Aoki et al., 2014).

2.3.4 Sintomatología de enfermedades provocadas por especies de *Fusarium*

Las enfermedades ocasionadas por especies de *Fusarium* spp., particularmente marchiteces vasculares y pudriciones radiculares, se caracterizan por una amplia

gama de síntomas que pueden variar según el complejo de especies, el hospedero y las condiciones ambientales. En general, la sintomatología inicial suele ser sutil, manifestándose como clorosis foliar, reducción del vigor vegetativo y una ligera marchitez durante las horas más cálidas del día, que puede revertirse parcialmente durante la noche. A medida que la infección progresa, la marchitez se hace permanente y se acompaña de necrosis foliar, defoliación y, en etapas avanzadas, de la muerte total de la planta (Dean et al., 2012).

Uno de los síntomas más característicos de la marchitez vascular es la decoloración de xilema, observable al realizar cortes longitudinales o transversales en tallos y raíces. Este oscurecimiento puede variar de tonalidades amarillentas a café e indica la colonización vascular, así como la producción de microconidios y toxinas que obstruyen o alteran la funcionalidad del tejido conductor (Aoki et al., 2014). En cultivos hortícolas como tomate, chile, pepino y melón, esta decoloración vascular se correlaciona estrechamente con la gravedad del daño fisiológico.

Las pudriciones radicales asociadas a especies del género *Fusarium* representan uno de los problemas fitosanitarios más comunes en diversos cultivos agrícolas. En particular, especies pertenecientes al complejo *Fusarium solani* y al complejo *Fusarium sambucinum* se han relacionado con procesos de deterioro progresivo del sistema radical. Estas infecciones suelen comenzar en las raíces más finas, donde se observan áreas necróticas que gradualmente se expanden hacia raíces de mayor tamaño y hacia la zona del cuello de la planta. Conforme avanza la enfermedad, pueden aparecer lesiones hundidas de tonalidad café oscuro y una pérdida notable de turgencia en los tejidos afectados. Dependiendo de las condiciones del suelo y de la humedad presente, la pudrición puede manifestarse con características húmedas o secas. Como consecuencia del daño en el sistema radical, las plantas afectadas presentan síntomas generales como clorosis en el follaje, crecimiento reducido y disminuciones significativas en el rendimiento del cultivo, debido a la alteración en la absorción de agua y nutrientes (Geiser et al., 2013).

Algunas especies producen, además, síntomas específicos en órganos aéreos. Por ejemplo, *F. fujikuroi* induce el conocido “bakanae” en arroz, caracterizado por un crecimiento excesivo y clorótico; mientras que, en cereales como el trigo, especies productoras de tricotecenos pueden causar fusariosis de la espiga, evidenciada por blanqueamiento prematuro, afectación de los granos y disminución de su calidad por contaminación con micotoxinas. Estos efectos son el resultado tanto de la colonización del tejido como de la acción de metabolitos secundarios tóxicos para la planta hospedera (Desjardins & Proctor, 2007).

2.3.5 Ciclo de enfermedades provocadas por especies de *Fusarium*

El ciclo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. es complejo debido a la gran capacidad de supervivencia del patógeno en el suelo y a su habilidad para colonizar distintos órganos de la planta. La mayoría de las especies relevantes en la agricultura son hongos necrotróficos o hemibiotróficos que persisten en el suelo como clamidoporas, micelio o estructuras asociadas a restos vegetales. Estas estructuras pueden sobrevivir durante varios años en ausencia de hospedero, constituyéndose en la principal fuente de inóculo inicial (Aoki et al., 2014).

Además, su viabilidad se mantiene intacta frente a condiciones ambientales adversas, tales como el estrés hídrico o las fluctuaciones térmicas extremas, lo que permite que el inóculo inicial permanezca latente y listo para reiniciar el ciclo infeccioso en cuanto las condiciones sean favorables. Esta dinámica de supervivencia explica por qué las estrategias de erradicación suelen ser insuficientes en sistemas de producción intensiva, donde el patógeno se integra profundamente en el ecosistema edáfico (Yan et al., 2023).

La infección suele ocurrir a través del sistema radical. Las hifas germinan en presencia de exudados de raíces jóvenes, que actúan como señales químicas que desencadenan la activación de genes de patogenicidad. Posteriormente, el patógeno penetra a través de heridas, puntos de emergencia de raíces laterales o directamente a través de la epidermis radicular. En el caso de la marchitez

vascular, la colonización continúa hacia el cilindro vascular, lo que permite la progresión del hongo a lo largo de xilema (Ma et al., 2013). Una vez dentro del xilema, *Fusarium* produce microconidios y toxinas que se distribuyen mediante el flujo ascendente de la savia. Estos elementos afectan la integridad del sistema conductor y generan las primeras manifestaciones de marchitez. La proliferación fúngica conduce a la obstrucción de vasos, pérdida de funcionalidad, desequilibrios hídricos y necrosis. En pudriciones radiculares, el patógeno degrada tejidos corticales, produciendo enzimas hidrolíticas y acelerando la necrosis, lo que compromete la absorción de agua (Aoki et al., 2014).

En condiciones favorables, *Fusarium* produce macroconidios y microconidios en superficies radiculares, en tallos o en tejidos necrosados. En ambientes húmedos también puede desarrollar esporodoquios de color salmón característicos de algunos complejos. Estas estructuras sirven como fuentes de inóculo secundario, lo que favorece la diseminación a plantas vecinas, especialmente en suelos saturados o mediante el manejo agrícola del campo (Leslie & Summerell, 2006).

El patógeno se dispersa principalmente a través del suelo, el agua de riego, las herramientas contaminadas, los sustratos, las semillas infectadas y los trasplantes. Aunque la dispersión aérea no es el principal mecanismo, puede ocurrir mediante la liberación de conidios en superficies infectadas, especialmente en cultivos densos o húmedos (Dean et al., 2012). Finalmente, los restos vegetales de plantas infectadas se integran al suelo, donde el hongo vuelve a producir clamidosporas o micelio resistente, cerrando así el ciclo y estableciendo condiciones para nuevas infecciones en ciclos futuros de cultivo.

2.3.6 Manejo de las enfermedades causadas por *Fusarium* spp.

El manejo de las enfermedades asociadas a *Fusarium* spp., como marchiteces vasculares y pudriciones radiculares, representa un desafío significativo debido a la capacidad del patógeno para persistir en el suelo, colonizar tejidos vasculares y generar estructuras de resistencia. Por esta razón, las estrategias de control deben ser integrales, considerando prácticas culturales, métodos biológicos,

control químico y el uso de genotipos resistentes. Un manejo efectivo requiere comprender la interacción entre el estrés abiótico, la biología del patógeno y las prácticas de producción agrícola (Dean et al., 2012).

2.3.6.1 Manejo cultural

Las prácticas culturales representan una de las estrategias iniciales más importantes para enfrentar enfermedades causadas por *Fusarium*, ya que permiten modificar las condiciones del suelo y disminuir las probabilidades de que ocurra la infección. Entre estas prácticas, la rotación de cultivos con especies que no son hospederas del patógeno se ha considerado una medida ampliamente utilizada para reducir la presión del inóculo. No obstante, su eficacia puede verse limitada cuando se trata de complejos de especies con un amplio rango de plantas hospedantes, como ocurre con el complejo *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC). Aun así, cuando las rotaciones se realizan durante periodos prolongados y se complementan con la incorporación de abonos verdes, es posible favorecer la reducción de la densidad del patógeno presente en el suelo y contribuir al manejo de la enfermedad (Summerell, 2019).

El manejo adecuado del riego es crucial, ya que los suelos saturados favorecen el desarrollo de pudriciones radiculares. El uso de sustratos bien drenados, la evitación del encharcamiento y la fomentación de condiciones aeróbicas del suelo limitan el avance del patógeno. La solarización del suelo ha demostrado ser eficaz en regiones cálidas al reducir la viabilidad de las clamidosporas, especialmente cuando se combina con materia orgánica o con biofumigación (Aoki et al., 2014).

Adicionalmente, prácticas como la desinfección de herramientas, la eliminación de plantas infectadas y el manejo higiénico de los trasplantes contribuyen a disminuir la diseminación del patógeno dentro del cultivo.

2.3.6.2 Manejo químico

El control químico de *Fusarium* spp. es particularmente complejo debido a que el patógeno coloniza tejidos internos, especialmente xilema, donde la penetración de los fungicidas sistémicos es limitada. Aun así, se utilizan fungicidas preventivos o de acción en el suelo, incluyendo mezclas a base de carbendazim, prochloraz, azoxystrobin, fludioxonil, metalaxyl-M y algunos triazoles. Su eficacia depende en gran medida de su aplicación temprana y del tipo de complejo de *Fusarium* implicado. Aoki et al. (2014) señalaron que muchos fungicidas presentan eficacia solo parcial y que el uso repetido puede conducir a la resistencia. Por ello, las aplicaciones químicas suelen recomendarse como parte de estrategias integradas y no como un método único. El tratamiento de semillas con fungicidas es una práctica común en cereales y hortalizas y puede reducir significativamente la infección inicial, especialmente en especies asociadas a la fusariosis de la espiga o de la plumilla. Sin embargo, su impacto disminuye a medida que avanza el ciclo del cultivo y el patógeno coloniza el suelo.

2.3.6.3 Manejo genético

El uso de variedades resistentes o tolerantes constituye uno de los métodos más eficientes y sostenibles para manejar las enfermedades causadas por *Fusarium*. La resistencia genética se ha estudiado ampliamente en cultivos como el trigo, el maíz, el banano, el tomate y el chile. Esta resistencia puede ser cualitativa, basada en genes mayores, o cuantitativa, en la que participa un conjunto de loci que disminuyen la severidad sin prevenir completamente la infección (Ma et al., 2013).

El mejoramiento asistido por marcadores ha permitido identificar QTL (Quantitative Trait Loci) asociados a la resistencia, especialmente en la fusariosis de la espiga del trigo y en la marchitez vascular de las solanáceas. La integración de estrategias genómicas modernas ha acelerado el desarrollo de líneas resistentes mediante la selección asistida, el análisis transcriptómico y la

caracterización de genes involucrados en el reconocimiento patogénico y la respuesta defensiva (Dean et al., 2012). A pesar de los avances, la resistencia en algunos cultivos sigue siendo parcial o específica de ciertos complejos de especies. Por ello, el manejo genético debe combinarse con otras prácticas de control para garantizar su efectividad a largo plazo.

2.3.6.4 Manejo biológico

El control biológico se ha consolidado como uno de los enfoques más prometedores para reducir el impacto de *Fusarium*. Diversos estudios han demostrado la eficacia de especies de *Trichoderma*, como *T. harzianum*, *T. virens* y *T. atroviride*, para inhibir el desarrollo del patógeno mediante competencia, micoparasitismo, antibiosis y la inducción de resistencia sistémica en la planta (Dean et al., 2012). Bacterias rizosféricas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces* spp. también han mostrado capacidad para disminuir la severidad de la enfermedad, ya sea mediante la producción de metabolitos antimicrobianos o la colonización eficaz de las raíces, lo que limita el acceso del patógeno a los puntos de entrada. La integración de microorganismos benéficos en bioformulados comerciales se ha incrementado en los últimos años, lo que representa una alternativa sostenible que reduce la dependencia de fungicidas (Summerell, 2019).

2.4 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* fue identificado inicialmente a finales del siglo XVIII por el micólogo alemán Christiaan Hendrik Persoon, quien describió a estos hongos por su crecimiento acelerado de naturaleza saprofítica y su frecuente asociación con materia orgánica en descomposición y suelos con alto contenido de residuos vegetales. Posteriormente, diversas investigaciones permitieron reconocer a *Trichoderma* spp. como uno de los microorganismos de mayor importancia en el ámbito agrícola, debido a su notable capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, su eficiente colonización de la rizosfera y su potencial

como agente de control biológico. Estas especies destacan particularmente por su actividad antagonista frente a diversos hongos fitopatógenos de importancia económica, entre ellos especies del género *Fusarium*, mediante mecanismos como micoparasitismo, competencia por nutrientes y producción de metabolitos antifúngicos (Harman et al., 2004).

Investigaciones contemporáneas han demostrado que *Trichoderma* es un antagonista multifuncional, capaz de inhibir *Fusarium* mediante competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, producción de metabolitos antifúngicos e inducción de resistencia sistémica en plantas. Especies como *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens* y *T. asperellum* han sido desarrolladas en bioformulados debido a su eficiencia comprobada en cultivos hortícolas, cereales y frutales (Dean et al., 2012). Su versatilidad radica en su capacidad para colonizar rápidamente la rizosfera, estableciendo una barrera biológica que limita la proliferación de patógenos del suelo.

Durante los últimos quince años, los avances genómicos han ampliado la comprensión de los mecanismos implicados en el antagonismo. Se han identificado genes que codifican quitinasas, proteasas, glucanasas y peptaiboles, moléculas esenciales para la degradación de la pared celular de *Fusarium* y la inhibición del crecimiento micelial. Asimismo, estudios multilocus han permitido delimitar especies crípticas dentro del género *Trichoderma*, mejorando la precisión taxonómica y la selección de cepas con alto potencial de biocontrol (Summerell, 2019).

2.4.1 Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* comprende hongos filamentosos saprófitos ampliamente distribuidos en suelos agrícolas y ecosistemas naturales, reconocidos por su papel importante como agentes de control biológico de patógenos fitopatógenos del suelo, como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* (Druzhinina et al., 2011). La clasificación taxonómica actual de *Trichoderma* se basa en criterios

morfológicos, fisiológicos y, principalmente, moleculares, especialmente en las secuencias de los genes ITS, *tef-1 α* y *rpb2* (Druzhinina et al., 2011).

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Christiaan Hendrik Persoon en 1794, estableció las bases taxonómicas iniciales del grupo. Posteriormente, la sistemática del género fue redefinida mediante estudios moleculares que permitieron diferenciar especies crípticas y establecer complejos de especies, como el complejo *T. harzianum* (Druzhinina et al., 2011).

Actualmente, se reconocen más de 400 especies válidas dentro del género *Trichoderma*, las cuales presentan una amplia diversidad ecológica y funcional, destacando su capacidad de producir enzimas hidrolíticas, antibióticos y metabolitos secundarios, así como su interacción benéfica con las plantas (Harman et al., 2021).

2.4.2 Descripción morfológica de *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* agrupa hongos filamentosos de rápido crecimiento, ampliamente distribuidos en suelos agrícolas, restos vegetales y rizosfera, y como endófitos en tejidos vegetales. Su morfología presenta una notable variabilidad inter e intraespecífica; sin embargo, existen caracteres macro y microscópicos bien definidos que permiten su identificación preliminar, particularmente en estudios de fitopatología y de control biológico (Harman et al., 2004).

La identificación morfológica de *Trichoderma* se basa principalmente en las características de las colonias en medio de cultivo, el tipo de micelio, la disposición de los conidióforos, la morfología de las fiálides, la forma y el tamaño de los conidios, así como en la presencia de clamidosporas. No obstante, debido a la alta similitud morfológica entre especies, actualmente esta identificación se complementa con herramientas moleculares (Druzhinina et al., 2011).

2.4.3 Antecedentes de *Trichoderma* spp. como antagonista

El uso de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico ha sido ampliamente documentado y constituye una de las estrategias más efectivas para el manejo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. En las últimas décadas, diversas investigaciones han demostrado que este género de hongos saprófitos, comúnmente presentes en suelos agrícolas, posee una notable capacidad para colonizar la rizosfera, competir con patógenos y activar mecanismos de defensa en las plantas. Su eficacia ha llevado a que varias especies, como *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* y *T. asperellum*, se integren en bioformulados comerciales utilizados en cultivos hortícolas, cereales y frutales (Aoki et al., 2014).

Históricamente, *Trichoderma* fue reconocido por su capacidad de degradar materia orgánica y por actuar como un saprófito oportunista, pero a partir de los años setenta comenzó a describirse su potencial como agente antagonista. Con el desarrollo de estudios fisiológicos y moleculares, se estableció que este género posee múltiples mecanismos de biocontrol, entre ellos la competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y el micoparasitismo directo. Estos mecanismos resultan particularmente efectivos contra complejos de *Fusarium* spp. que afectan cultivos como tomate, chile, melón, banano y cereales (Dean et al., 2012).

Uno de los antecedentes más relevantes es el reconocimiento de su capacidad para inducir resistencia sistémica en las plantas. Especies de *Trichoderma* pueden activar vías de señalización relacionadas con el ácido

jasmónico y el etileno, lo que incrementa la expresión de genes defensivos y reduce la susceptibilidad a la marchitez vascular y a las pudriciones radiculares. Este efecto ha sido documentado en solanáceas, cucurbitáceas y gramíneas, donde la aplicación de *Trichoderma* disminuye significativamente la gravedad de la enfermedad causada por *Fusarium* (Ma et al., 2013).

Los avances genómicos de los últimos quince años han permitido caracterizar genes clave involucrados en el antagonismo, como los que codifican quitinasas, proteasas, glucanasas y peptaiboles, moléculas esenciales para la degradación de la pared celular de *Fusarium*. La identificación de estos genes ha fortalecido la comprensión de la interacción antagonista–patógeno y ha facilitado la selección de cepas con mayor potencial de biocontrol. Asimismo, análisis filogenéticos recientes han permitido aclarar la clasificación de las especies dentro del género *Trichoderma*, lo cual es fundamental para el desarrollo de bioinsumos eficientes y estables (Summerell, 2019).

Actualmente, *Trichoderma* se considera uno de los microorganismos antagonistas más versátiles y robustos frente a *Fusarium* spp. debido a su rápida colonización de la rizosfera, su adaptabilidad a diversos ambientes, su capacidad para incrementar el crecimiento vegetal y su interacción multifactorial con los patógenos. Por estas razones, continúa siendo objeto de intensas investigaciones y desarrollo tecnológico, consolidándose como un componente esencial de los programas de manejo integrado de enfermedades del suelo.

2.4.4 Variabilidad morfológica entre especies

Aunque el patrón morfológico general del género es relativamente constante, existe una alta variabilidad morfológica entre especies y complejos de especies, particularmente en grupos como *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens* y *T. atroviride*. Estas variaciones incluyen diferencias en el tamaño de los conidios, la forma de las fiálides, la densidad de esporulación y la producción de pigmentos (Druzhinina et al., 2011).

Debido a esta plasticidad morfológica, la identificación basada únicamente en caracteres fenotípicos puede conducir a errores taxonómicos, por lo que actualmente se recomienda complementar el análisis con marcadores moleculares como ITS, *tef-1 α* y *rpb2* para una identificación confiable (Druzhinina et al., 2011).

2.4.5 Importancia funcional de su morfología

La morfología de *Trichoderma* está estrechamente relacionada con su capacidad de antagonismo. La abundante producción de conidios facilita su rápida colonización del suelo y de la rizosfera, mientras que la arquitectura de sus hifas y conidióforos favorece la interacción directa con otros hongos mediante el micoparasitismo (Benítez et al., 2004).

Asimismo, la formación de clamidosporas le permite persistir en el suelo durante largos periodos, lo cual resulta crucial para su uso como agente de biocontrol en programas de manejo integrado de enfermedades (Druzhinina et al., 2011).

2.4.6 Mecanismos de acción de los microorganismos antagonísticos

Los microorganismos antagonistas representan una herramienta clave en el manejo sostenible de las enfermedades causadas por *Fusarium* spp., debido a su capacidad de suprimir al patógeno mediante múltiples mecanismos biológicos. Estos mecanismos incluyen competencia por espacio y nutrientes, producción de metabolitos antimicrobianos, micoparasitismo directo e inducción de resistencia sistémica en la planta, los cuales pueden actuar de manera individual o sinérgica. La eficacia del biocontrol depende tanto de la interacción microorganismo–patógeno como de los factores ambientales que modulan la actividad microbiana (Dean et al., 2012).

Uno de los mecanismos más comunes es la competencia. Microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. colonizan rápidamente la rizosfera y ocupan nichos ecológicos que, de otro

modo, serían accesibles a *Fusarium*. Esta colonización temprana limita el acceso del patógeno a carbohidratos, aminoácidos y otros exudados radiculares, lo que reduce la germinación de los conidios y la posibilidad de infección. Además, ciertos antagonistas producen sideróforos de alta afinidad por el hierro, un micronutriente esencial cuya disponibilidad limitada inhibe el crecimiento de *Fusarium* spp. (Aoki et al., 2014).

La producción de metabolitos antimicrobianos es otro mecanismo fundamental. Bacterias del género *Bacillus* sintetizan lipopeptidos como surfactina, fengicina e iturina, que generan poros en la membrana fúngica, alteran la permeabilidad celular e inhiben el desarrollo micelial. Por su parte, especies de *Pseudomonas* producen compuestos volátiles y antibióticos, como la pirrolnitrina y las fenazinas, que afectan tanto la germinación de esporas como el crecimiento del micelio. En el caso de *Trichoderma*, se han identificado metabolitos secundarios, como peptaíbolos y harzianolida, con actividad inhibidora específica contra *Fusarium* spp. (Ma et al., 2013).

El micoparasitismo es un mecanismo característico de los hongos antagonistas, especialmente de *Trichoderma*. Este proceso implica el reconocimiento del hongo patógeno, seguido de la adherencia y enroscamiento de hifas, y de la posterior degradación mediante la secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas quitinasas, proteasas y β -1,3-glucanasas. Estas enzimas degradan la pared celular de *Fusarium*, provocando lisis y muerte del micelio. Estudios recientes han demostrado que este mecanismo se activa mediante señales químicas específicas que permiten al antagonista distinguir entre las hifas del patógeno y las de otros microorganismos (Summerell, 2019).

Otro mecanismo de gran relevancia es la inducción de la resistencia sistémica (ISR) en la planta hospedera. Tanto hongos como bacterias antagonistas pueden activar vías de defensa asociadas al ácido jasmónico, al etileno o al ácido salicílico, lo que fortalece las barreras estructurales y bioquímicas frente a la invasión de *Fusarium*. Esta respuesta implica la activación de genes relacionados

con la síntesis de fitoalexinas, la lignificación y la producción de proteínas PR (pathogenesis-related). Se ha demostrado que las plantas tratadas con *Trichoderma* o *Bacillus* presentan una respuesta más rápida y eficiente ante la presencia del patógeno, lo que reduce la progresión de la enfermedad sin necesidad de que el antagonista permanezca presente de forma permanente (Dean et al., 2012).

En conjunto, estos mecanismos hacen de los microorganismos antagonistas agentes altamente versátiles y eficaces en el manejo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. Su acción multifacética, combinada con la posibilidad de integrarlos en programas de manejo integrado, los posiciona como una alternativa sustentable frente al uso intensivo de fungicidas químicos.

2.5 Herramientas moleculares empleadas en la identificación de especies de *Fusarium*

2.5.1 Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos fueron los primeros en emplearse para detectar la variación genética. Se basan en la observación de caracteres fenotípicos visibles, como el tamaño, la forma, el color, el patrón de crecimiento, el tipo de colonias, la producción de estructuras reproductivas y la tolerancia a factores ambientales. En organismos como plantas y hongos, estos marcadores incluyen características como altura de planta, arquitectura radical, forma de las hojas, color de las flores, así como morfología de conidios, hifas, esporulación y velocidad de crecimiento en cultivo, en el caso de los hongos fitopatógenos (Agrios, 2005).

Entre sus principales ventajas se encuentran su bajo costo, su facilidad de evaluación y su aplicación directa en el campo o en el laboratorio. Sin embargo, presentan importantes limitaciones, ya que están fuertemente influidos por el ambiente, la edad del organismo y las condiciones de crecimiento, lo que reduce

su confiabilidad para diferenciar genotipos cercanos. Además, el número de marcadores disponibles es limitado y su herencia puede ser compleja (Avisé, 1994).

En fitopatología, los marcadores morfológicos continúan siendo útiles como herramienta preliminar de identificación, particularmente en la caracterización de hongos como *Fusarium*, *Trichoderma* y *Alternaria*; no obstante, por sí solos no garantizan una identificación taxonómica precisa (Leslie & Summerell, 2006).

2.5.2 Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos, especialmente las isoenzimas, constituyen un nivel intermedio de análisis entre los marcadores morfológicos y los moleculares. Se basan en las diferencias en la movilidad electroforética de enzimas codificadas por distintos alelos. Este tipo de marcadores permitió, durante varias décadas, evaluar la diversidad genética en poblaciones vegetales, animales y microbianas (Avisé, 1994).

Las isoenzimas son relativamente estables y menos influenciadas por el ambiente que los caracteres morfológicos; sin embargo, su número es limitado y su poder de discriminación es menor que el de los marcadores de ADN. Actualmente, su uso ha disminuido considerablemente ante el avance de las técnicas moleculares (Winter & Kahl, 1995).

2.5.3 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se basan directamente en la variación de la secuencia del ADN, lo que los convierte en herramientas altamente confiables para detectar polimorfismos genéticos. Estos marcadores no dependen de la expresión génica, no están influenciados por el ambiente y permiten analizar la variación a nivel intraespecífico e interespecífico (Agarwal et al., 2008).

Entre los principales tipos de marcadores moleculares se encuentran:

2.5.3.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Detectan variaciones en la longitud de los fragmentos generados por enzimas de restricción. Fueron de los primeros marcadores moleculares ampliamente utilizados, aunque requieren grandes cantidades de ADN y son técnicamente laboriosos (Winter & Kahl, 1995).

2.5.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Utilizan iniciadores aleatorios para amplificar regiones del genoma. Son rápidos y económicos, pero presentan problemas de baja reproducibilidad (Agarwal et al., 2008).

2.5.3.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Combinan la digestión con enzimas de restricción y la amplificación selectiva mediante PCR. Generan un gran número de marcadores altamente polimórficos y reproducibles (Vos et al., 1995).

2.5.3.4 SSR o microsatélites (Simple Sequence Repeats)

Se basan en repeticiones cortas de nucleótidos. Son codominantes, altamente polimórficos y específicos, ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética, mapeo de QTL y mejoramiento genético (Agarwal et al., 2008).

2.5.3.5 SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

Detectan cambios en una sola base del genoma. Son los marcadores más abundantes y actualmente constituyen la base de los estudios genómicos de alta resolución (Avice, 1994).

En hongos fitopatógenos, además de estos marcadores, se emplean secuencias genéticas conservadas como ITS, *tef-1 α* y *rpb2* para estudios de variabilidad

genética, filogenia e identificación de especies, como en los complejos de *Fusarium* y *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011).

2.6 Herramientas biotecnológicas

2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR, conocida por sus siglas en inglés “polymerase chain reaction”, es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para amplificar fragmentos específicos de ADN en condiciones *in vitro*. Desde su desarrollo en la década de 1980 por Kary B. Mullis, esta metodología ha transformado profundamente la investigación genética, ya que permite obtener grandes cantidades de una secuencia de ADN a partir de cantidades muy pequeñas de material genético. Gracias a su rapidez, sensibilidad y precisión, la PCR se ha convertido en una herramienta fundamental en áreas como el diagnóstico molecular, la investigación biomédica y la biotecnología (Gibbs, 1990)

La PCR se basa en la acción de una ADN polimerasa termoestable, generalmente *Taq* polimerasa, que sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de un molde durante una serie cíclica de cambios de temperatura. Cada ciclo consta de tres etapas fundamentales: desnaturalización, en la que las cadenas de ADN se separan; alineamiento (hibridación), en la que los cebadores se unen a sus secuencias complementarias; y extensión, etapa en la que la polimerasa sintetiza la nueva hebra. Mediante la repetición de estos ciclos, el fragmento de interés se amplifica exponencialmente, generando millones de copias a partir de una cantidad mínima de ADN inicial (Brown, 2016).

La importancia de la PCR radica en su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y versatilidad, lo que ha permitido su aplicación en múltiples áreas del conocimiento. En fitopatología y microbiología, la PCR es una herramienta fundamental para la detección, identificación y caracterización genética de patógenos, incluidos hongos como *Fusarium* y *Trichoderma*. Asimismo, se utiliza ampliamente en estudios de diversidad genética, diagnóstico molecular,

clonación de genes, análisis filogenético, secuenciación, medicina forense y detección de organismos genéticamente modificados (Green & Sambrook, 2019).

Gracias a la PCR, es posible obtener resultados precisos a partir de muestras con cantidades extremadamente bajas de ADN, incluso de tejidos en etapas tempranas de la infección, lo que la convierte en una técnica indispensable en la investigación científica moderna y en los laboratorios de diagnóstico (Mullis & Faloona, 1987).

2.6.2 RFLP

Las siglas RFLP provienen del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*, que en español se traduce como Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción. Esta técnica molecular fue una de las primeras herramientas desarrolladas para detectar variación genética a nivel del ADN y se basa en la digestión del ADN genómico mediante enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas y generan fragmentos de diferentes tamaños según la variación en dichas secuencias (Brown, 2016).

El procedimiento consiste en la extracción del ADN, su digestión con una o varias endonucleasas de restricción, la separación de los fragmentos por electroforesis en gel, su transferencia a una membrana ("southern blot") y la hibridación con sondas marcadas para detectar fragmentos específicos. Las diferencias en el tamaño de los fragmentos entre individuos o aislados reflejan polimorfismos en el genoma, originados por mutaciones en los sitios de restricción o por inserciones y deleciones (Winter & Kahl, 1995).

La importancia del RFLP radica en que fue una de las primeras técnicas que permitió estudiar la variabilidad genética de manera directa y reproducible, mediante marcadores codominantes, lo que facilitó el análisis de la herencia, la elaboración de mapas genéticos, los estudios de diversidad poblacional, la identificación de especies y los análisis filogenéticos. En fitopatología, el RFLP ha sido ampliamente utilizado para la diferenciación de razas y aislados de

hongos fitopatógenos, como *Fusarium*, así como para estudios de estructura genética de poblaciones microbianas (Brown, 2016).

A pesar de su confiabilidad, el uso del RFLP ha disminuido con la aparición de técnicas basadas en PCR, como RAPD, AFLP, SSR y SNP, ya que el RFLP requiere grandes cantidades de ADN de alta calidad, es laborioso, consume más tiempo y tiene costos más elevados. No obstante, continúa siendo un referente histórico y metodológico fundamental en el desarrollo de la genética molecular moderna (Brown, 2016).

2.6.3 Secuenciación

El término secuenciación hace referencia al proceso mediante el cual se determina el orden exacto de los nucleótidos (A, T, C y G) en una molécula de ADN. En biología molecular, la secuenciación permite conocer con precisión la información genética contenida en un organismo, un gen o un fragmento específico del genoma. El primer método de secuenciación ampliamente utilizado fue desarrollado por Frederick Sanger, conocido como el método de terminación de cadena, que marcó el inicio de la genómica moderna (Brown, 2016).

La secuenciación implica, en general, la extracción del ADN, la amplificación del fragmento de interés mediante PCR, la generación de fragmentos de distintas longitudes y la lectura de la secuencia mediante sistemas automatizados. Con el avance tecnológico, surgieron las plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés “next generation sequencing”), que permiten secuenciar millones de fragmentos de ADN de manera simultánea, reduciendo drásticamente el tiempo y los costos del análisis genómico (Green & Sambrook, 2019).

La importancia de la secuenciación radica en que constituye la herramienta más precisa para detectar variaciones genéticas, ya que permite identificar cambios a nivel de nucleótido (SNP), así como inserciones, deleciones y reordenamientos en el genoma. En fitopatología y microbiología, la secuenciación es fundamental

para la identificación taxonómica confiable de microorganismos, el estudio de la diversidad genética, la reconstrucción filogenética y la caracterización de genes de patogenicidad y resistencia, como ocurre en complejos de especies de *Fusarium* y *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011).

Asimismo, la secuenciación es una herramienta clave en áreas como el diagnóstico molecular, la genómica comparativa, la metagenómica, la transcriptómica (RNA-seq) y el mejoramiento genético asistido por marcadores, consolidándose como una de las técnicas más poderosas y versátiles de la biología molecular actual (Brown, 2016).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fase I: Patogenicidad

3.2 Ubicación del área de trabajo

El proyecto de investigación se realizó en el invernadero de usos múltiples de posgrado y en el laboratorio de Biología Molecular, ubicados en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Texcoco de Mora, Edo. de México.

3.3 Muestreo

3.3.1 Recolecta de muestras para el aislamiento de *Fusarium* spp.

Se realizaron prospecciones en una localidad de Tehuitzingo, Puebla, que es productora de chile, entre otras especies de hortalizas, para detectar plantas con síntomas asociados a la marchitez de chile (Figura 3).



Figura 3. A) Ubicación de parcelas de recolección de muestras; B) Plantas con síntomas de marchitamiento; C) Zona con mayor afectación por amarillamiento y marchitez.

Muestras de plantas sintomáticas se trasladaron en bolsas de papel, selladas y correctamente identificadas, al Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, para iniciar el aislamiento de los patógenos.

3.4 Aislamiento de microorganismos

3.4.1 Aislamiento de tejido vegetal

Se cortaron fragmentos de aproximadamente 2 cm de raíces y tallos, según la zona de avance de la enfermedad, y se sometieron a un proceso de desinfección superficial. Inicialmente, los fragmentos se lavaron con agua corriente, detergente y un cepillo de cerdas suaves para eliminar restos de suelo y tejido externo adheridos; posteriormente, se secaron con papel absorbente estéril. La desinfección se realizó en una cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas, utilizando hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5 % durante un minuto, seguida de un tratamiento con etanol al 70 % durante otro minuto. Luego, los fragmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada doblemente estéril (H_2O_{dd}), se secaron nuevamente en papel absorbente estéril y se eliminaron los extremos de cada fragmento con material de corte estéril.

Posteriormente, tres fragmentos de cada muestra, previamente esterilizados y cortados horizontalmente, se colocaron en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio de papa dextrosa agar (PDA), puesto en autoclave a 121 °C y con el pH ajustado a 4,5 mediante la adición de ácido láctico al 85 %. Las placas se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad durante cinco a siete días para favorecer el desarrollo micelial (Figura 4).



Figura 4. Proceso de aislamiento de microorganismos provenientes de tejidos vegetales.

Toda vez que se localizaron crecimientos fúngicos, se transfirieron a nuevas cajas de petri con medio PDA para lograr su purificación.

3.4.2 Punta de hifa (*Fusarium* spp.)

Bajo un microscopio estereoscópico de la marca Zeiss, con aumento de 32X, se tomó la punta de hifa de cada aislamiento y se cultivó en el centro de una nueva placa de petri con medio PDA. Entre cada aislamiento, se flameó el asa bacteriológica y se enfrió previamente antes del contacto con el micelio. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 25 °C hasta la observación posterior de estructuras morfológicas.

Sin embargo, los aislamientos de *Fusarium* spp. empleados en este estudio fueron proporcionados por el M.C. Frank Angel Díaz Leyva, estudiante del Doctorado en Ciencias en Horticultura, quien de manera previa realizó la identificación molecular de dichas especies, confirmando la identidad taxonómica de las cepas mediante secuenciación de regiones de los genes *tef-1α* y *rpb2*, asegurando así la pureza y especificidad del inóculo utilizado en los ensayos de patogenicidad, pruebas de antagonismo y análisis de RFLPs.

3.5 Interacción patógeno – hospedante, patogenicidad de *Fusarium* en *Capsicum*

3.5.1 Ensayo de patogenicidad en plantas, en condiciones de invernadero

Posterior al aislamiento y la identificación de hongos, se seleccionaron representantes de todas las especies de *Fusarium* detectadas para los ensayos de patogenicidad. Estos ensayos se realizaron en condiciones *in vitro* con semillas y en condiciones de invernadero. En ambos casos se emplearon los cultivares de chile Jalapeño, Serrano, Habanero, Poblano y Guajillo.

Se utilizaron plantas de las variedades ya mencionadas con una edad de 45 días después de germinación. Estas se mantuvieron en charolas con riego adecuado en un sustrato compuesto por 4 partes de peat moss y una parte de agrolita y fertilizadas con solución Steiner al 50 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración de iones nutritivos presentes en la solución Steiner 100% (Steiner, 1961) utilizada para la fertilización de plantas de *Capsicum* durante el experimento.

Iones	Concentración ^Z (meq/L)	Concentración ^Y (mg/L o ppm)
Nitratos	12.0	168.0
Fosfatos	1.0	31.0
Sulfatos	7.0	336.0
Potasio	7.0	273.0
Calcio	9.0	180.0
Magnesio	4.0	48.0

^Z Miliequivalentes por litro.

^Y Miligramos por litro o partes por millón.

Para la preparación de inóculo se emplearon colonias de las especies de *Fusarium* seleccionadas, las cuales crecieron durante 10 días en placas con medio PDA en oscuridad a 25 °C (más-menos 2 °C). Antes del momento de la inoculación el micelio de cada colonia se diluyó, en 200 mL de agua destilada estéril con ayuda de una espátula estéril, y se realizó un conteo de células con un hematocitómetro hasta ajustar la concentración final a 1×10^6 células/mL.

Las plántulas se retiraron cuidadosamente de la charola, evitando dañar el tallo y asegurando la extracción completa del cepellón. Posteriormente, las raíces se lavaron en un contenedor con agua corriente para eliminar el sustrato adherido y, al mismo tiempo, provocar pequeñas heridas que facilitarían el ingreso del patógeno; además, se realizaron pequeños cortes longitudinales en las raíces secundarias con el mismo fin. Enseguida, las plántulas se introdujeron durante 24 horas en vasos de precipitado que contenían, por separado, las suspensiones correspondientes a cada patógeno, a una concentración de 1×10^6 células/mL (*F. clavum*, *F. falciforme*, *F. languescens*, *F. noneumartii*, *F. curvatum* y *F. nirenbergiae*, una vez transcurrido el tiempo de inoculación, se trasplantaron las plántulas a macetas con sustrato nuevo (Figura 5). Finalmente, se realizaron observaciones diarias durante 60 días para registrar la aparición y la evolución de la sintomatología asociada a la infección.



Figura 5. Establecimiento de experimento. A) Plántulas sumergidas en suspensión de conidios; B) Distintas especies de *Fusarium* spp.; C) Distribución del experimento.

Se registraron la incidencia y la severidad para determinar cuál era la cepa (especie) más agresiva para su uso en los siguientes estudios. Para la Incidencia de la Enfermedad (IE) se aplicó la fórmula:

$$IE (\%) = \frac{\text{Número de planta enfermas}}{\text{Número total de plantas}} * 100^{(1)}$$

(Wolcan et al., 2001).

Se utilizó la escala de daño de Bosland y Lindsey (1991) para evaluar la intensidad de los síntomas ocasionados por las especies de *Fusarium* en plantas de chile (Figura 6 y Cuadro 4). El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con un arreglo factorial 5 × 6. El factor A correspondió a las variedades de chile (*Capsicum* spp.): jalapeño, serrano, poblano, guajillo y habanero; mientras que el factor B estuvo conformado por las especies de *Fusarium* evaluadas: *F. clavum*, *F. falciforme*, *F. languescens*, *F. noneumartii*, *F. curvatum* y *F. nirenbergiae*. Cada combinación variedad × especie de *Fusarium* constituyó un tratamiento con cinco repeticiones, considerando una planta como unidad experimental. Adicionalmente, se incluyó

un testigo sin inocular para cada variedad de *Capsicum*, con el propósito de comparar la respuesta de las plantas sanas e inoculadas.

Las variables de respuesta (por ejemplo: incidencia de la enfermedad, severidad de síntomas, altura de planta, longitud de raíz, diámetro de tallo y mortalidad) se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Para el análisis estadístico de la presente investigación se empleó el software Minitab Statistical Software® 22.4.0, el cual permitió el procesamiento, organización e interpretación de los datos obtenidos durante el desarrollo experimental.



Figura 6. Escala de daño visual utilizado para a evaluación de severidad.

Cuadro 4. Escala de severidad de daño utilizada para evaluar síntomas causados por especies de *Fusarium* en variedades de chile (*Capsicum* spp.).

Valor	Severidad del daño ^z (%)	Descripción del daño
0	0	Planta sana, sin síntomas visibles de la enfermedad.
1	20	Ligera clorosis foliar, crecimiento normal de la planta.
2	40	Clorosis moderada y ligero marchitamiento.
3	60	Marchitez evidente durante las horas de mayor radiación solar, con recuperación parcial en condiciones favorables.
4	80	Marchitez permanente, necrosis avanzada y severa afectación del sistema radical.
5	100	Planta muerta.

^z Porcentaje estimado de severidad de daño ocasionado por *Fusarium* spp.

3.5.2 Ensayo de patogenicidad en semillas en condiciones *in vitro*

Con el propósito de evaluar la patogenicidad de las distintas especies de *Fusarium* identificadas sobre semillas de *Capsicum* spp., se diseñó un ensayo de inoculación en condiciones controladas. Las especies utilizadas que fueron a *Fusarium clavum*, *F. falciforme*, *F. languescens*, *F. noneumartii*, *F. curvatum* y *F. nirenbergiae*, fueron reactivados y cultivados en medio líquido “potato dextrose broth” (PDB) durante siete días a una temperatura de 25 ± 2 °C, bajo agitación constante a 120 rpm, con el fin de obtener un crecimiento micelial homogéneo y favorecer la liberación de conidios en suspensión (Leslie & Summerell, 2006).

Al concluir el periodo de incubación, las suspensiones fúngicas se filtraron a través de gasa estéril para eliminar los restos miceliales y, posteriormente, se cuantificaron en una cámara de Neubauer. La concentración de las suspensiones se ajustó a 1×10^6 conidios/mL⁻¹ utilizando agua destilada estéril, de acuerdo con lo recomendado para ensayos de patogenicidad en semillas (Agrios, 2005).

Las semillas de las cinco variedades de *Capsicum* (jalapeño, serrano, poblano, guajillo y habanero) se lavaron previamente con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente durante una hora antes de la inoculación. En cada caja de petri se colocaron 20 semillas por tratamiento, a las cuales se les adicionaron 4 mL de la suspensión de conidios correspondiente a cada especie de *Fusarium*. Los tratamientos con testigo negativo recibieron el mismo volumen de agua destilada estéril (Figura 7). Posteriormente, las cajas se sellaron con parafilm y se mantuvieron en incubación a 25 ± 2 °C, en condiciones de oscuridad, durante siete días.

Durante el desarrollo del ensayo se realizaron observaciones diarias para registrar la aparición de signos de infección, tales como pérdida de vigor, decoloración del embrión, necrosis radicular o ausencia de germinación. La severidad de la infección se evaluó con base en la proporción de semillas infectadas respecto del total de semillas germinadas, conforme al criterio establecido por Marois et al. (1984), en la cual dice que esta se determina a partir de la proporción de semillas infectadas con respecto al total de semillas germinadas, expresándose en porcentaje mediante la siguiente relación:

$$\text{Severidad o incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de semillas infectadas}}{\text{Número total de semillas germinadas}} * 100 \quad (2)$$

Este criterio permite cuantificar de manera objetiva el nivel de daño provocado por el patógeno durante la etapa de germinación, considerando como semillas infectadas aquellas que presentan síntomas visibles como necrosis, pudrición, decoloración del embrión, escaso desarrollo radicular o ausencia total de germinación.

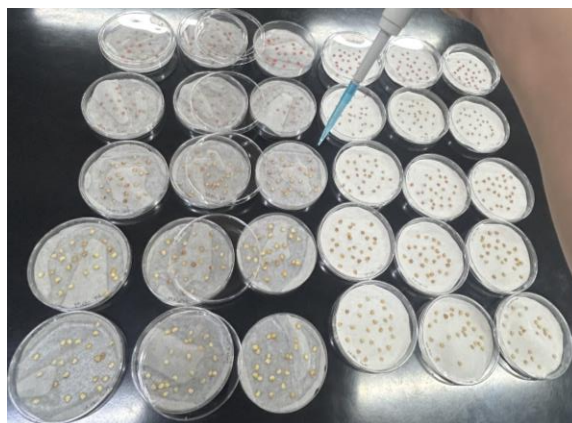


Figura 7. Inoculación de semillas de *Capsicum* spp. con solución de esporas de *Fusarium* spp.

3.5.3 Ensayo de patogenicidad en plantas jóvenes, en condiciones *in vitro*

Con la finalidad de corroborar la agresividad de las especies de *Fusarium* bajo condiciones más representativas del crecimiento temprano, se efectuó un tercer ensayo en plántulas de cinco días de edad, en las que la plúmula estaba completamente visible. Para este procedimiento se siguió la misma metodología general del experimento anterior, utilizando suspensiones fúngicas de los *Fusarium* previamente indicados. Los aislados fueron cultivados en medio líquido potato dextrose broth (PDB) y las suspensiones se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 conidios/mL.

A diferencia del ensayo previo, las semillas se germinaron directamente en cajas Petri con papel filtro estéril humedecido, bajo condiciones de incubación controladas a 25 ± 2 °C y en oscuridad. Una vez transcurridos cinco días de germinación y obtenidas las plántulas, se procedió a la inoculación en la misma caja Petri, mediante la adición de 4 mL de la suspensión fúngica correspondiente a cada especie de *Fusarium*, volumen equivalente al empleado en el experimento anterior. Posteriormente, las cajas se sellaron con Parafilm para evitar la contaminación externa y la pérdida de humedad.

Se incluyeron testigos negativos, a los cuales se les adicionaron 4 mL de agua destilada estéril en sustitución de la suspensión fúngica (Figura 8). Durante el

desarrollo del ensayo se mantuvieron las condiciones de incubación a 25 ± 2 °C, en oscuridad parcial y con humedad constante. Se realizaron observaciones diarias durante 30 días, registrando la aparición de síntomas como necrosis radicular, marchitez, pérdida de turgencia y colapso del tallo, de acuerdo con los parámetros previamente considerados y con lo establecido por Leslie y Summerell, (2006).

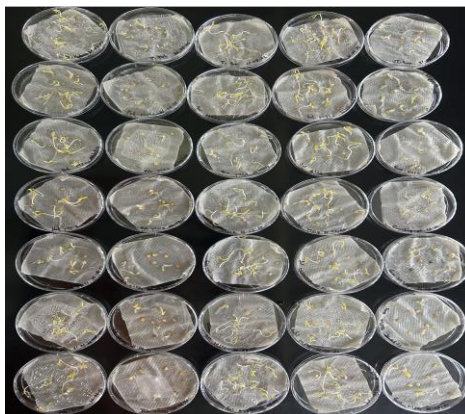


Figura 8. Plantas jóvenes de *Capsicum* spp. inoculadas con *Fusarium* spp.

Para la evaluación de la incidencia de la enfermedad (IE) se utilizó la misma fórmula que en el experimento 1.

Tomando los mismos valores que indica el cuadro 4 (Valores escalares y porcentuales de la escala de daño).

3.6 Fase II: Antagonismo *in vitro*

3.7 Confrontación dual

Para la evaluación del antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., se utilizaron placas Petri estériles de 90 mm de diámetro con medio de papa dextrosa agar (PDA) a una concentración de 39 g L⁻¹, previamente esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. El medio se vertió en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar, adicionando aproximadamente 20 a 25 mL por placa y permitiendo su solidificación a temperatura ambiente.

Los inóculos se obtuvieron a partir del margen activo de cultivos jóvenes de ambos hongos, utilizando discos de micelio de 5 mm. Para las especies de *Trichoderma* spp. se emplearon cultivos de 3 a 7 días de crecimiento, mientras que para *Fusarium* spp. se utilizaron cultivos de 7 a 14 días. Posteriormente, las placas se sellaron con parafilm para evitar la contaminación y pérdida de humedad, y se incubaron a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad parcial.

El diseño experimental consistió en un arreglo factorial en el que se evaluaron todas las combinaciones entre especies de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp., con tres repeticiones por tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos evaluados en confrontación dual (desfasada y simultánea) entre especies de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp.

Tratamiento			Tratamiento		
<i>T. asperellum</i>	vs	<i>F. clavum</i>	<i>T. asperellum</i>	vs	<i>F. noneumartii</i>
<i>T. virens</i>	vs	<i>F. clavum</i>	<i>T. virens</i>	vs	<i>F. noneumartii</i>
<i>T. Harzianum</i>	vs	<i>F. clavum</i>	<i>T. harzianum</i>	vs	<i>F. noneumartii</i>
<i>T. asperellum</i>	vs	<i>F. falciforme</i>	<i>T. asperellum</i>	vs	<i>F. curvatum</i>
<i>T. virens</i>	vs	<i>F. falciforme</i>	<i>T. virens</i>	vs	<i>F. curvatum</i>
<i>T. harzianum</i>	vs	<i>F. falciforme</i>	<i>T. harzianum</i>	vs	<i>F. curvatum</i>
<i>T. asperellum</i>	vs	<i>F. languescens</i>	<i>T. asperellum</i>	vs	<i>F. nirenbergiae</i>
<i>T. virens</i>	vs	<i>F. languescens</i>	<i>T. virens</i>	vs	<i>F. nirenbergiae</i>
<i>T. harzianum</i>	vs	<i>F. languescens</i>	<i>T. harzianum</i>	vs	<i>F. nirenbergiae</i>

(X³) Tres repeticiones por tratamiento.

Adicionalmente, se incluyeron testigos individuales para cada especie de *Fusarium* evaluadas: *F. clavum*, *F. falciforme*, *F. languescens*, *F. noneumartii*, *F. curvatum* y *F. nirenbergiae*, así como testigos independientes para cada una de las especies de *Trichoderma* spp.: *T. asperellum* obtenido de aislados provenientes del lugar donde fueron recolectadas plantas enfermas de *Fusarium*, *T. virens*, facilitado por el departamento de Laboratorio de Micología del Instituto Politécnico Nacional, y *T. harzianum*, este último procedente de un formulado comercial (Trico-Bio®). Para evaluar la interacción entre los hongos en condiciones in vitro, se utilizó el método de cultivo dual en placas de Petri. En

este procedimiento, fragmentos circulares de micelio obtenidos de cultivos activos se colocaron en posiciones opuestas dentro del medio de cultivo sólido. Esta disposición permitió que ambos microorganismos crecieran de manera simultánea y se dirigieran hacia la zona central de la placa, facilitando la observación directa de su interacción y del posible efecto antagonista entre ellos. Este tipo de confrontación en placa es una metodología ampliamente empleada para estudiar la competencia entre hongos fitopatógenos y microorganismos antagonistas, como especies de *Trichoderma* (Bell et al., 1982).

Este método permite evaluar el grado de antagonismo mediante la observación del crecimiento relativo de ambos organismos y su capacidad para invadir o limitar el desarrollo del otro dentro del medio de cultivo. La técnica se basa en colocar discos de micelio en extremos opuestos de la placa, permitiendo que el contacto entre colonias ocurra conforme avanza el crecimiento radial de los hongos.

Se establecieron dos tipos de confrontación: una confrontación desfasada, en la cual primero se cultivaron las cepas de *Fusarium* spp. y, con base en las curvas de crecimiento exponencial de cada una, se determinó el momento óptimo para la posterior colocación de los discos de *Trichoderma* spp.; y una confrontación simultánea, en la que los discos de micelio de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. se colocaron al mismo tiempo sobre la superficie del medio.

La evaluación del antagonismo se realizó mediante la medición del crecimiento radial de *Fusarium* spp. a los 3, 5, 7 y 11 días después de la inoculación, comparando el radio de crecimiento del patógeno en las placas testigo con el observado en los cultivos duales. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (%I) mediante la expresión

$$\%I = \left(\frac{R1-R2}{R1} \right) * 100^{(3)}$$

Donde R1 corresponde al radio de crecimiento del micelio de *Fusarium* spp. en el testigo y R2 al radio de crecimiento del micelio del patógeno en presencia de *Trichoderma* spp., expresando el resultado en porcentaje como indicador del grado de inhibición ejercido por el antagonista, conforme a lo propuesto por Skidmore y Dickinson (1976) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Escala de antagonismo correlacionado con el porcentaje de inhibición del crecimiento radial propuesto por Skidmore y Dickinson (1976).

Escala	Descripción del antagonismo en confrontación dual	Grado de antagonismo	Porcentaje de inhibición (%)
I	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece completamente la colonia de <i>Fusarium</i> spp., cubriéndola en su totalidad.	Muy alto	81–100 %
II	<i>Trichoderma</i> spp. invade aproximadamente dos terceras partes de la colonia de <i>Fusarium</i> spp.	Alto	61–80 %
III	Ambos microorganismos detienen su crecimiento al entrar en contacto directo, sin sobrecrecimiento de alguno de ellos.	Moderado	41–60 %
IV	<i>Fusarium</i> spp. sobrecrece aproximadamente dos terceras partes del área colonizada por <i>Trichoderma</i> spp.	Bajo	21–40 %
V	<i>Fusarium</i> spp. sobrecrece completamente la colonia de <i>Trichoderma</i> spp.	Nulo o muy bajo	0–20 %

3.8 Fase III: Caracterización molecular

3.8.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB II), basado en el protocolo original propuesto por Doyle y Doyle (1987) y posteriormente modificado por Weising et al. (2005) para mejorar la calidad del ADN en tejidos con alto contenido de polisacáridos, fenoles y compuestos secundarios.

Para la extracción, se utilizó entre 80 y 100 mg de micelio fresco obtenido de cultivos puros, previamente congelado con nitrógeno líquido y macerado hasta obtener un polvo fino con ayuda de un mortero y un pistilo estériles. El material pulverizado se transfirió a tubos de eppendorf de 2 mL, a los cuales se adicionaron 998 μ L de buffer de extracción CTAB II previamente precalentado a 65 °C. El buffer estuvo compuesto por CTAB al 2 %, NaCl 1.4 M, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM, polivinilpirrolidona (PVP) al 1 % y β -mercaptoetanol al 0.2 %, este último añadido inmediatamente antes de su uso.

Las muestras se incubaron a 55 °C durante 30 minutos, con agitación inversa ocasional cada 5 minutos, con el fin de facilitar la lisis celular, la desnaturalización de proteínas y que se hagan más complejos los polisacáridos. Posteriormente, se adicionó un volumen igual de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó suavemente por inversión durante 10 minutos y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa superior se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo, evitando arrastrar la interfase.

A la fase acuosa final se añadieron 1.2 volúmenes de isopropanol frío para precipitar el ADN, mezclándose suavemente por inversión. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante y conservándose el sedimento de ADN.

El pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 70 % frío, seguido de una centrifugación a 12 000 rpm durante 5 minutos (este procedimiento se realizó por duplicado). El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos hasta la evaporación total del etanol residual. El ADN se resuspendió finalmente en 50 a 100 μ L de buffer TE (Tris-EDTA) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis posterior.

3.8.2 Cuantificación del ADN

La concentración y pureza del ADN extraído se determinaron mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop (espectrofotómetro) y el programa ND 1000® V 3.5.2 (Accesolab S.A. de C.V.), evaluando las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

3.8.3 Calidad del ADN en gel de agarosa

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, cargando en cada pozo del gel una mezcla de 5 μ L de la muestra base del ADN y 4 μ L de buffer de carga, en una cámara de electroforesis horizontal. Se utilizó un marcador de 1000 pb con la finalidad de estimar la calidad del ADN. El tiempo de corrida fue de entre 60 y 90 minutos a 94 voltios. Para el revelado posterior del gel, este fue sumergido en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ L/mL) durante 15 minutos, y posteriormente se enjuagó con agua destilada durante el mismo tiempo. Se observó con luz ultravioleta. El ADN obtenido mediante este procedimiento presentó calidad y concentración adecuadas para su uso en reacciones de PCR y en análisis moleculares posteriores.

3.8.4 Amplificación del gen TEF (Factor de Alargamiento y Traducción)

Para realizar los cortes con enzimas de restricción, se amplificó el gen del factor de alargamiento y traducción (TEF, por sus siglas en inglés), utilizando los iniciadores descritos por O'Donnell et al. (1998) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen TEF

Iniciador	Secuencia de reconocimiento
EF-1	5'-ATG-GGT-AAG-GAA-GGA-CAA-GAC-3' (O'Donnell et al., 1998)
EF-2	5'-GGA-AGG-TAC-CAG-AGC-GAT-CTC-ATG-3' (O'Donnell et al., 1998)

Las condiciones para el termociclaje fueron las siguientes:

- 1 ciclo de 5 minutos a 94° C
- 35 ciclos con las siguientes características:
 - 30 segundos a 94° C
 - 30 segundos a 52° C
 - 45 segundos a 72° C
- 1 ciclo de 7 minutos a 72° C

La mezcla de reacción para la amplificación del gen TEF 1- α se preparó conforme a las concentraciones y volúmenes indicados en el

Cuadro 8.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, sometidos a una corrida de 90 min a 94 V (Cuadro 8). Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio, se enjuagó con agua destilada y se observó bajo luz ultravioleta.

Cuadro 8. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del gen TEF 1- α a un volumen final de 25 μ L.

Reactivos	Concentración	Volumen/Tubo	Concentración final
HPLC	Ajustar a 25 μ L	0.7 μ L	-----
Buffer	5x	5 μ L	1X
MgCl ₂	25 mM	2.5 μ L	2.5 mM
DNTP's	500 mM	10 μ L	200 mM
EF-1	10 pM	2 μ L	20 pM
EF-2	10 pM	2 μ L	20 pM
Taq polimerasa	5 U/ μ L	0.3 μ L	1.5 U
ADN	40 ng/ μ L	2.5 μ L	4 ng

3.9 RFLPs

Para realizar esta técnica, se utilizaron los productos de PCR del gen TEF 1-alfa previamente amplificados, y las enzimas de restricción *AluI* (Promega®), *HaeIII* (Takara®), *HhaI* (Thermo Scientific®), *HinfI* (Promega®) y *HpaII* (Thermo Scientific®). Para la reacción de digestión se siguieron las instrucciones dadas por cada fabricante; después, fueron incubadas en refrigeración durante 24 horas para su posterior visualización en gel de acrilamida.

3.9.1 Gel de poliacrilamida

Con el fin de obtener una mejor separación y visualización de los fragmentos generados por las enzimas de restricción, se prepararon geles de poliacrilamida utilizando una cámara de electroforesis vertical C.B.S Scientific CO®. Previamente, las placas de vidrio de la cámara fueron limpiadas con etanol al 70 % y papel absorbente KimWipes®. En el Cuadro 9 se presentan los reactivos y volúmenes empleados para la preparación de un gel de poliacrilamida al 9 %.

Cuadro 9. Reactivos empleados para la preparación de un gel de poliacrilamida al 9 % (60 mL).

Reactivos para gel de poliacrilamida al 9 %	Volumen
Acrilamida-bisacrilamida 30 %	17.95 mL
Agua destilada	14.6 mL
TBE 2.5X	27 mL
APS (Persulfato de amonio) 10 %	473 μ L
TEMED (NNNN Tetramethylethylenediamide 99 %)	33.75 μ L

Después de mezclar todos los reactivos dentro de una “mamila”, se vació la poliacrilamida entre los cristales, previa colocación de un peine con 50 pozos de carga, y se dejó solidificar durante 20 a 30 minutos. Los cristales que contendrían el gel se colocaron en la cámara y fueron sujetados con pinzas. Se agregó buffer de corrida TAE 1X. En cada pozo se cargó una mezcla de 6 μ L de cada muestra (de cada corte) y 3 μ L de buffer de carga con formamida. Además, se colocaron marcadores de 100 pb y 1 kb para contar con una referencia. La cámara se mantuvo a 224 voltios durante 90 minutos. El gel se reveló en agitación constante de acuerdo con el siguiente orden de soluciones: 1) Solución fijadora de etanol 10% y ácido acético 1%, durante 15 minutos y se retiró; 2) Solución de tinción con nitrato de plata 0.2% durante 15 minutos y se retiró; 3) enjuague con agua destilada y 4) Solución reveladora de hidróxido de sodio 3% con formaldehído (100 μ L de formaldehído por cada 100 mL de hidróxido de sodio) hasta la visualización de las bandas.

3.9.2 Decodificación de geles y dendrogramas

Después del revelado del gel de poliacrilamida, se observaron bandas a las cuales se les calculó el peso aproximado respecto a los marcadores de 1 kb y 100 pb. Se generó una matriz binaria (0= ausencia de banda, 1= presencia de banda) utilizando el programa Excel®, dicha matriz se trasladó al programa FreeTree© versión 0.9.1.50 para ser analizada usando el índice Jaccard y la

construcción de árboles filogenéticos (dendrogramas) por el método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic) método de agrupamiento par con media aritmética no ponderada. Para visualizar el dendrograma, se hizo uso del programa FigTree© v1.4.4

4 RESULTADOS

4.1 Fase I

4.1.1 Ensayo de patogenicidad en plantas en condiciones de invernadero

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que la respuesta de las plántulas estuvo influenciada significativamente por la variedad de *Capsicum* evaluada, mientras que las especies de *Fusarium* y la interacción variedad x especie no presentaron efectos estadísticamente significativos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza (ANOVA) para la severidad de daño causada por especies de *Fusarium* en plántulas de *Capsicum* spp. bajo un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 5x6.

Fuente	GL	SC Ajustado	MC Ajustado	Valor F	Valor p
Variedad	4	52879.1	13219.8	104.83	0.000***
Especie <i>Fusarium</i>	5	513.5	102.7	0.81	0.542 ^{ns}
Variedad*Especie <i>Fusarium</i>	20	2826.7	141.3	1.12	0.338 ^{ns}
Error	120	15132.5	126.1		
Total	149	71351.8			

GL: grados de libertad.

SC: suma de cuadrados.

MC: cuadrado medio.

ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$).

***: diferencias altamente significativas ($p \leq 0.001$).

Estos resultados indican que la variación observada en la respuesta de las plántulas se explica principalmente por diferencias genéticas entre las variedades evaluadas.

El resumen del modelo (Cuadro 11) indicó un adecuado ajuste estadístico, con un coeficiente de determinación (R^2) de 78.79 %, lo que evidencia una alta proporción de variabilidad explicada por los factores evaluados. Asimismo, los valores de R^2 ajustado y R^2 predictivo sugieren que el modelo presentó una capacidad explicativa y predictiva aceptable.

Cuadro 11. Estadísticos de ajuste y capacidad predictiva del modelo utilizado para evaluar la severidad de daño en plántulas de *Capsicum* spp. inoculadas con especies de *Fusarium*.

S²	R-cuadrado	R-cuadrado ajustado	R-cuadrado predictivo
11.2296	78.79 %	73.67 %	66.86 %

^z Desviación estándar de los residuos del modelo

4.1.1.1 Comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$), ensayo en plántulas.

La prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) mostró diferencias significativas entre las variedades evaluadas (Cuadro 12). La variedad Guajillo presentó la media más alta de severidad, ubicándose estadísticamente en un grupo independiente, lo que evidencia una mayor susceptibilidad al patógeno. Habanero se clasificó en un grupo intermedio, mientras que Serrano, Poblano y Jalapeño no presentaron diferencias significativas entre sí, conformando el grupo con menor nivel de afectación.

Cuadro 12. Comparación de medias de severidad entre variedades de chile mediante la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

Variedad	N	Media	Agrupación	
Guajillo	30	77.0750	A	
Habanero	30	57.0600	B	
Serrano	30	34.3397		C
Poblano	30	30.0303		C
Jalapeño	30	29.1243		C

Las medias que no comparten una misma letra son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

4.1.2 Ensayo de patogenicidad en semillas, en condiciones *in vitro*

El análisis de varianza mostró que la respuesta observada en semillas estuvo influenciada significativamente por la variedad *Capsicum*, la especie de *Fusarium* y por la interacción entre ambos factores (Cuadro 13). Los resultados evidencian que tanto el genotipo vegetal como la identidad del patógeno influyeron de manera importante sobre la variable evaluada.

Cuadro 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de patogenicidad en semillas de *Capsicum* spp. inoculadas con especies de *Fusarium* spp.

Fuente	GL	SC Ajustado	MC Ajustado	Valor F	Valor p
Variedad <i>Capsicum</i>	4	8647	2161.68	93.33	0.000***
Especie <i>Fusarium</i>	6	49403	8233.82	355.49	0.000***
Variedad <i>Capsicum</i>*Especie <i>Fusarium</i>	24	2169	90.39	3.90	0.000***
Error	70	1621	23.16		
Total	104	61840			

GL: grados de libertad.

SC: suma de cuadrados.

MC: cuadrado medio.

***: diferencias altamente significativas.

El resumen del modelo mostró un alto coeficiente de determinación ($R^2=97.38\%$), lo que indica una adecuada capacidad para explicar la variabilidad observada en la variable evaluada (Cuadro 14). Asimismo, los valores de R^2 ajustado y R^2 predictivo permanecieron cercanos al R^2 , evidenciando solidez y capacidad predictiva del modelo bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Cuadro 14. Resumen del modelo estadístico para la prueba de patogenicidad en semillas de *Capsicum* spp.

S²	R-cuadrado	R-cuadrado ajustado	R-cuadrado predictivo
4.81268	97.38 %	96.10 %	94.10 %

^z Desviación estándar de los residuos del modelo

4.1.2.1 Comparación de medias – Variedades de *Capsicum* spp.

La prueba de comparación de medias de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) permitió identificar diferencias significativas entre las variedades *Capsicum* spp. evaluadas (Cuadro 15). La variedad Guajillo presentó la media más alta, evidenciando mayor susceptibilidad al patógeno, mientras que Jalapeño registró la menor media, lo que sugiere un comportamiento más tolerante. Poblano mostró una respuesta intermedia, en tanto que Serrano y Habanero no presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí.

Cuadro 15. Comparación de medias entre variedades de *Capsicum* spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Variedad <i>Capsicum</i>	N	Media	Agrupación
Guajillo	21	63.8095	A
Poblano	21	48.1905	B
Serrano	21	43.8095	C
Habanero	21	42.4762	C
Jalapeño	21	37.1429	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

4.1.2.2 Comparación de medias – Especies de *Fusarium* spp.

La prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) permitió identificar diferencias significativas entre las especies de *Fusarium* spp. evaluadas (Cuadro 16). *Fusarium nirenbergiae* presentó la media más alta, posicionándose como la especie más agresiva, seguida de *F. noneumartii*. En contraste, *F. clavum* mostró una menor capacidad patogénica. Por otra parte, *F. languescens* y *F. falciforme* no presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí, ubicándose en un nivel intermedio de agresividad.

Cuadro 16. Comparación de medias entre especies de *Fusarium* spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Especie <i>Fusarium</i>	N	Media	Agrupación
<i>F. nirenbergiae</i>	15	71.8667	A
<i>F. noneumartii</i>	15	62.5333	B
<i>F. languescens</i>	15	55.6000	C
<i>F. falciforme</i>	15	55.0667	C
<i>F. curvatum</i>	15	46.8000	D
<i>F. clavum</i>	15	37.7333	E
Testigo	15	0.0000	F

Las medias que no comparten una letra son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

4.1.3 Ensayo de patogenicidad en plantas jóvenes, en condiciones *in vitro*

El análisis de varianza (ANOVA) mostró efectos altamente significativos ($p \leq 0.001$) de la variedad de *Capsicum*, la especie de *Fusarium* y de la interacción entre ambos factores sobre la variable evaluada en plántulas jóvenes (Cuadro 17). El elevado valor de F registrado para el factor especie evidenció su influencia predominante en la explicación de la variabilidad observada.

Cuadro 17. Análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de patogenicidad en plántulas jóvenes de *Capsicum* spp. inoculadas con especies de *Fusarium* spp.

Fuente	GL	SC Ajustado.	MC Ajustado	Valor F	Valor p
Variedad <i>Capsicum</i>	4	9721.0	2430.25	295.34	0.000***
Especie <i>Fusarium</i>	6	49577.5	8262.92	1004.17	0.000***
Variedad Capsicum*Especie <i>Fusarium</i>	24	1854.5	77.27	9.39	0.000***
Error	70	576.0	8.23		
Total	104	61729.0			

GL: grado de libertad.

SC: suma de cuadrados.

MC: cuadrado medio.

***: diferencias altamente significativas.

El resumen del modelo mostró un valor de $S = 2.86$ indicando que las estimaciones del modelo presentaron una baja desviación respecto a los valores observados de severidad, lo que refleja un ajuste adecuado a los datos experimentales (Cuadro 18). Asimismo, los valores de R^2 , R^2 ajustado y R^2 predictivo evidenciaron una elevada capacidad explicativa y predictiva del modelo.

Cuadro 18. Resumen de modelo estadístico para la prueba de patogenicidad en plántulas jóvenes de *Capsicum* spp.

S²	R-cuadrado	R-cuadrado ajustado	R-cuadrado predictivo
2.86855	99.07 %	98.61 %	97.90 %

^z Desviación estándar de los residuos del modelo

4.1.3.1 Comparación de medias – Variedades de *Capsicum* spp.

La prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) permitió identificar diferencias significativas entre las variedades de *Capsicum* spp. evaluadas (Cuadro 19). La variedad Guajillo presentó la media más alta, evidenciando una

mayor susceptibilidad al patógeno, mientras que Jalapeño registró la menor media, lo que sugiere un comportamiento más tolerante. Por otra parte, Habanero y Serrano no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí, ubicándose en un grupo intermedio, mientras que Poblano presentó un comportamiento moderado.

Cuadro 19. Comparación de medias entre Variedades de *Capsicum* spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Variedad <i>Capsicum</i>	N	Media	Agrupación
Guajillo	21	64.0000	A
Poblano	21	49.9048	B
Habanero	21	42.8571	C
Serrano	21	42.6667	C
Jalapeño	21	35.6190	D

Las medias que no comparten una misma letra son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

4.1.3.2 Comparación de medias – Especies de *Fusarium* spp.

La prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) permitió identificar diferencias significativas entre las especies de *Fusarium* spp. evaluadas (Cuadro 20). *F. nirenbergiae* presentó la media más alta, confirmándose como la especie más agresiva, seguida de *F. noneumartii*. En contraste, *F. clavum* mostró la menor capacidad patogénica. Por otra parte, *F. languescens* y *F. falciforme* no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí ubicándose en un nivel intermedio de agresividad.

Cuadro 20. Comparación de medias entre especies de *Fusarium* spp. mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Especie <i>Fusarium</i>	N	Media	Agrupación
<i>F. nirenbergiae</i>	15	71.8667	A
<i>F. noneumartii</i>	15	63.8667	B
<i>F. languescens</i>	15	54.5333	C
<i>F. falciforme</i>	15	53.7333	C
<i>F. curvatum</i>	15	47.6000	D
<i>F. clavum</i>	15	37.4667	E
Testigo	15	0.0000	F

Las medias que no comparten una misma letra son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

4.2 Fase II

4.2.1 Confrontación desfasada

Se observó que *T. asperellum* (Figura 9) tiende a ejercer un efecto inhibitorio más elevado que *T. virens* y *T. harzianum* (Figura 10) y (Figura 11), lo cual sugiere una mayor producción de metabolitos antifúngicos o una competencia más eficiente por espacio y nutrientes.

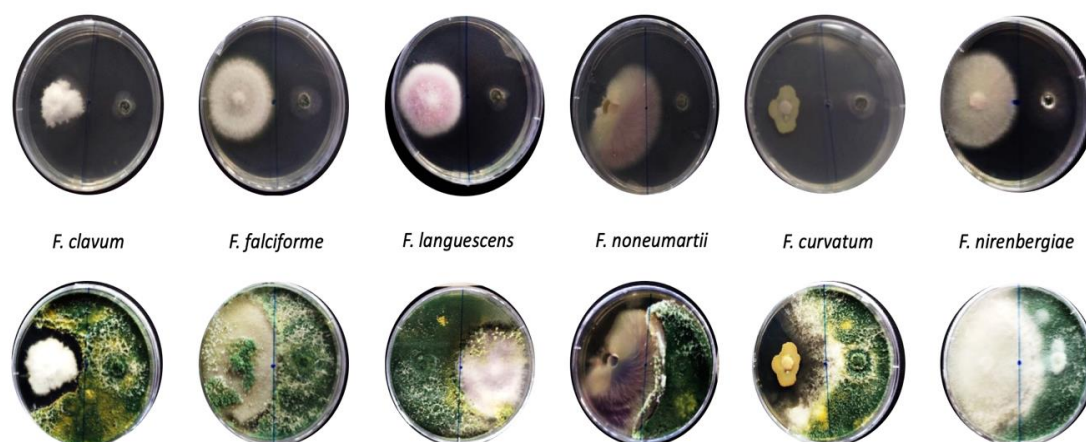


Figura 9. Confrontación desfasada *Fusarium* spp. vs *T. asperellum*. Cajas Petri superiores muestran el inicio de confrontación. Placas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

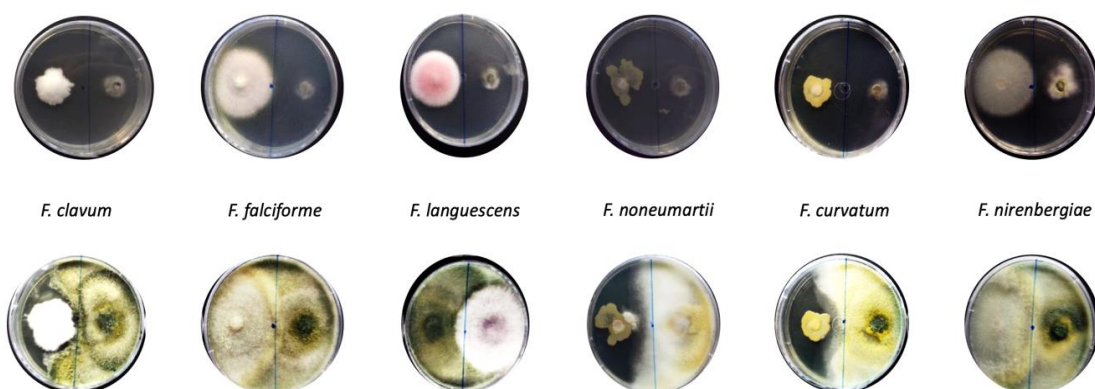


Figura 10. Confrontación desfasada *Fusarium* spp. vs *T. virens*. Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

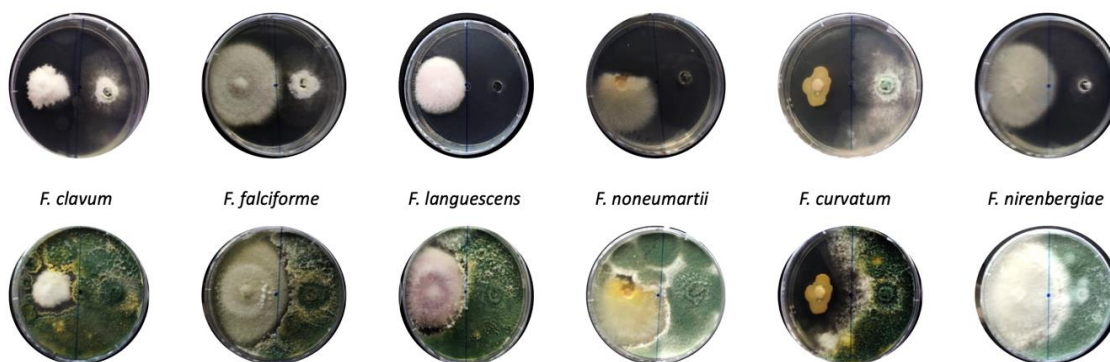


Figura 11. Confrontación desfasada *Fusarium* spp. vs *T. harzianum*. Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

4.2.2 Prueba Kruskal – Wallis (confrontación desfasada)

Las medianas de inhibición (%) obtenidas para las especies de *Trichoderma* mostraron diferencias descriptivas en su capacidad antagonista frente a especies de *Fusarium* (Cuadro 21). *Trichoderma asperellum* presentó la mediana de inhibición más alta, sugiriendo una mayor actividad antagonista en comparación con las demás especies evaluadas. Por su parte, *Trichoderma harzianum* mostró un comportamiento intermedio, mientras que *Trichoderma virens* registró la mediana más baja.

La clasificación de medias indicó que *T. asperellum* presentó el rango promedio más alto, seguido de *T. harzianum* y *T. virens*. Asimismo, el valor Z positivo obtenido para *T. asperellum* evidenció una tendencia de sus valores por encima del rango general, mientras que los valores Z negativos observados en *T. harzianum* y *T. virens* indicaron un comportamiento inferior al promedio general.

Cuadro 21. Estadísticos de la prueba Kruskal-Wallis para el porcentaje de inhibición en confrontación desfasada.

<i>Trichoderma</i>	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
<i>asperellum</i>	18	0.79055	33.5	1.98
<i>harzianum</i>	18	0.60615	25.8	-0.56
<i>virens</i>	18	0.58500	23.2	-1.42
General	54		27.5	

La prueba de Kruskal-Wallis evaluó la hipótesis nula (H_0) de igualdad de medianas entre las especies de *Trichoderma*, frente a la hipótesis alternativa (H_1), que establece que al menos una de las medianas difiere entre tratamientos.

La prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis indicó que no existieron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inhibición entre las especies de *Trichoderma* evaluadas ($H= 4.18$; $P= 0.124$) (Cuadro 22). No obstante, de manera descriptiva, *T. asperellum* presentó la mediana de inhibición más alta, sugiriendo una tendencia a una mayor capacidad antagonista, aunque sin diferencias estadísticas respecto a las demás especies.

Cuadro 22. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para porcentaje de inhibición en confrontación desfasada.

Método	GL	Valor H	Valor P
No ajustado para empates	2	4.18	0.124 ^{ns}
Ajustado para empates	2	4.18	1.124 ^{ns}

ns: diferencias no significativas (P >0.05)

Las comparaciones múltiples realizadas mediante la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las especies de *Trichoderma* evaluadas (P>0.05) (Cuadro 23). En ninguna de las comparaciones pareadas se observaron diferencias relevantes en el porcentaje de inhibición, indicando que las especies evaluadas presentaron una capacidad antagonista similar frente a *Fusarium* bajo las condiciones experimentales establecidas.

Cuadro 23. Comparaciones múltiples tipo Dunn con corrección de Bonferroni para porcentaje de inhibición entre especies de *Trichoderma*.

Grupo 1	Grupo 2	p (Bonferroni)
<i>T. asperellum</i>	<i>T. virens</i>	0.272
<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	0.271
<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i>	1.000

Valores de P>0.05 indican ausencia de diferencias estadísticas significativas entre comparaciones.

4.2.3 Confrontación simultánea

Se observó el comportamiento comparativo de inhibición de las cepas de *Fusarium* frente a las especies de *Trichoderma* mediante confrontación simultánea. En general, se aprecia que *T. asperellum* (

Figura 12. Confrontación simultánea *Fusarium spp.* vs *T. asperellum*. Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

) mantiene un nivel de inhibición consistentemente alto, mientras que *T. virens* y *T. harzianum* presentan una respuesta ligeramente menor (

Figura 13. Confrontación simultanea *Fusarium* spp. vs *T. virens*. Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

) y (Figura 14). Esto sugiere que, incluso en una confrontación simultánea, *T. asperellum* conserva un efecto antagonista dominante.

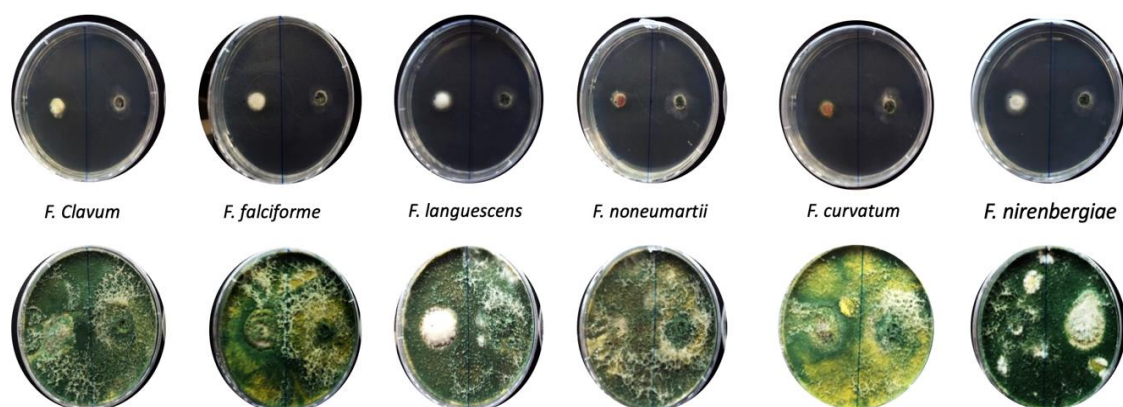


Figura 12. Confrontación simultanea *Fusarium* spp. vs *T. asperellum*. Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

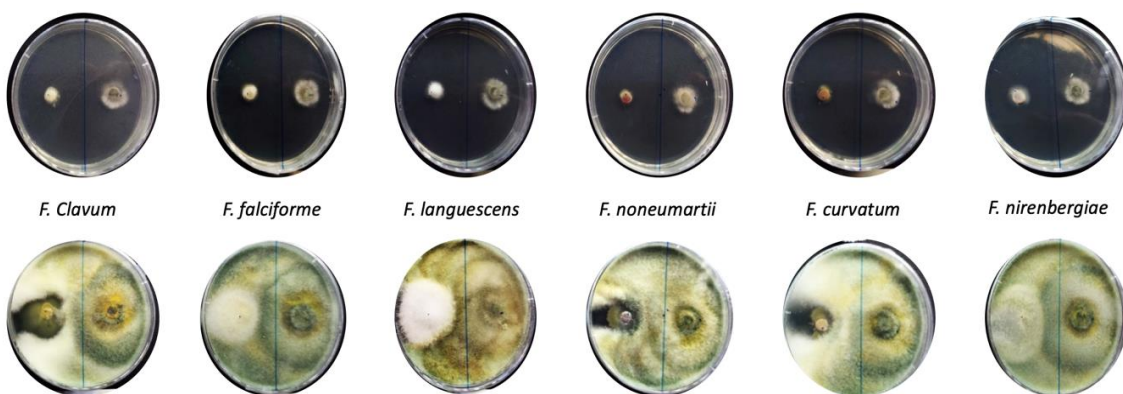


Figura 13. Confrontación simultanea *Fusarium* spp. vs *T. virens*. Cajas Petri superiores muestran inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

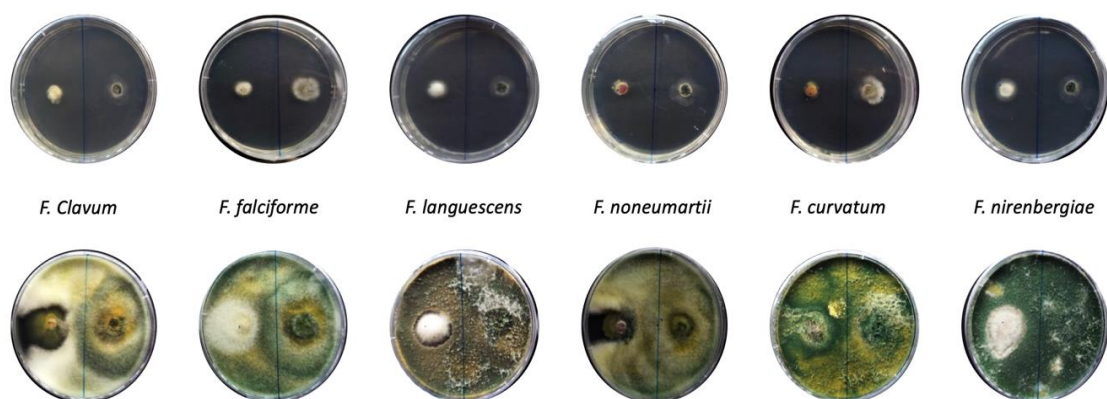


Figura 14. Confrontación simultánea *Fusarium* spp. vs *T. harzianum*. Cajas Petri superiores muestran el inicio de confrontación. Cajas Petri inferiores muestran el final de la confrontación.

4.2.4 Prueba Kruskal – Wallis (confrontación simultánea)

La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inhibición entre las especies de *Trichoderma* evaluadas ($P > 0.05$) (Cuadro 24). *Trichoderma asperellum* presentó la mayor mediana de inhibición, indicando un mayor efecto antagonista en comparación con *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*.

Cuadro 24. Estadísticos de la prueba de Kruskal-Wallis para porcentajes de inhibición en confrontación simultánea.

<i>Trichoderma</i>	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
<i>asperellum</i>	18	0.97330	43.0	5.13
<i>harzianum</i>	18	0.87670	19.8	-2.55
<i>Virens</i>	18	0.87445	19.7	-2.58
General	54		27.5	

La prueba de Kruskal-Wallis evaluó la hipótesis nula (H_0) de igualdad de medianas entre las especies de *Trichoderma*, frente a la hipótesis alternativa (H_1), que establece que al menos una de las medianas difiere entre tratamientos.

El valor de $p = 0.000$, tanto ajustado como no ajustado para empates, indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de inhibición de al menos una de las especies evaluadas (Cuadro 25). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, confirmando que las especies de *Trichoderma* no presentaron el mismo efecto inhibitorio bajo condiciones de confrontación simultánea.

Cuadro 25. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para porcentaje de inhibición en confrontación simultánea.

Método	GL	Valor H	Valor P
No ajustado para empates	2	26.30	0.000***
Ajustado para empates	2	26.32	0.000***

*** diferencias altamente significativas ($P \leq 0.001$).

Las comparaciones múltiples realizadas mediante la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni mostraron diferencias estadísticamente significativas entre *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma virens*, así como entre *T. asperellum* y *Trichoderma harzianum* ($P \leq 0.05$) (Cuadro 26). En contraste, no se detectaron diferencias significativas entre *T. virens* y *T. harzianum* ($P > 0.05$).

Cuadro 26. Comparaciones múltiples tipo Dunn con corrección de Bonferroni para porcentaje de inhibición entre especies de *Trichoderma*.

Grupo 1	Grupo 2	p (Bonferroni)
<i>T. asperellum</i>	<i>T. virens</i>	0.000028
<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	0.000035
<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i>	1.000

Valores de $P \leq 0.05$ indican diferencias estadísticas significativas entre comparaciones.

Estos resultados indican que *T. asperellum* presentó un comportamiento diferencial en su capacidad inhibitoria durante la confrontación simultánea, en comparación con *T. virens* y *T. harzianum*. Por otro lado, *T. virens* y *T. harzianum* muestran una respuesta similar entre sí. En conjunto, los resultados

evidencian el potencial de *T. asperellum* como agente de biocontrol frente a especies de *Fusarium* bajo condiciones de interacción simultánea.

4.3 Fase III

4.3.1 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN extraído de las cepas de *Fusarium spp.* en NanoDrop mostró una concentración de 80 a 1010 ng/μL en cada una de las muestras (Figura 15).

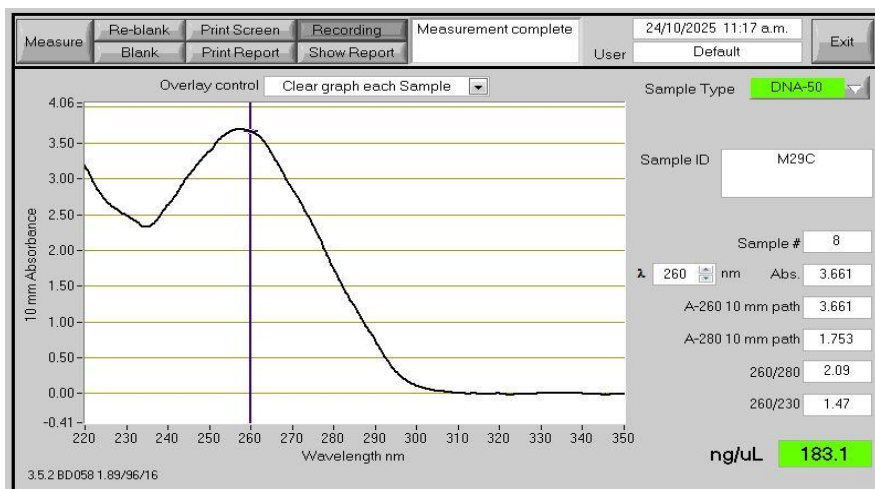


Figura 15. Cuantificación de una muestra de ADN en NanoDrop

4.3.2 Amplificación gen TEF con PCR

Los fragmentos, obtenidos del gen TEF y previamente amplificados con los primers EF1 y EF2, presentaron aproximadamente 600 pb, como lo muestra la Figura 16, donde se aprecia la uniformidad del desplazamiento de las bandas, lo que permite inferir que se trata de organismos del mismo tipo.

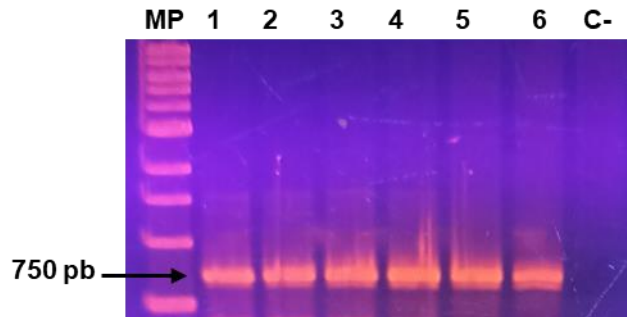


Figura 16. Gel de agarosa 1.5 % con los fragmentos amplificados del gen TEF (750 pb) de las especies de *Fusarium* (1-6) y control negativo (C-) (H₂O).

4.3.3 RFLPs

Los patrones producidos por las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* y *HpaII* obtenidos del gen TEF mostraron algunos polimorfismos en los perfiles al ser cortados con dichas enzimas y separados por peso molecular en un gel de acrilamida al 9 %. Una vez que se obtuvieron los resultados en el gel de acrilamida, estos fueron comparados con su análogo *in silico*; sin embargo, los resultados obtenidos en el gel de acrilamida no concuerdan con los obtenidos en su análogo *in silico* (Figura 17), (Figura 18), (Figura 19), (Figura 20), (Figura 21) y (Figura 22).

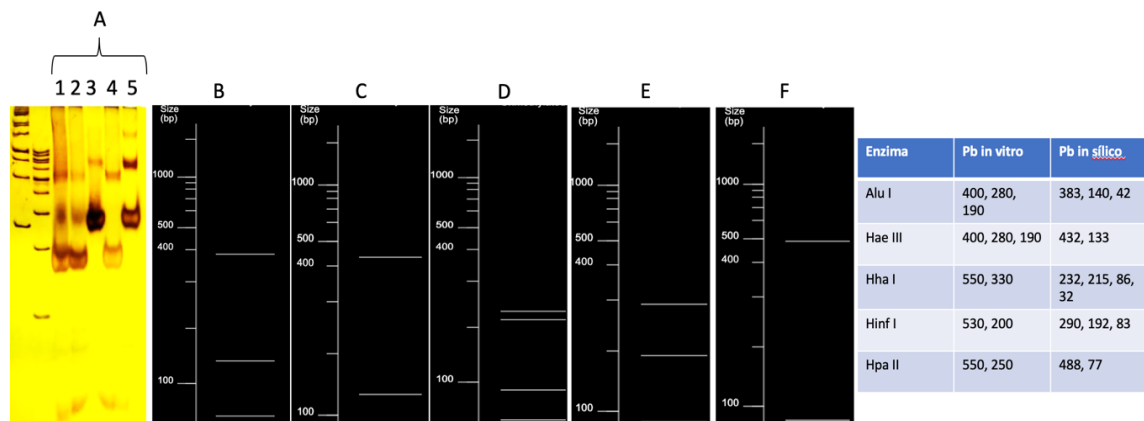


Figura 17. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de *Fusarium clavum* con enzimas de restricción: A1 (*AluI*), A2 (*HaeIII*), A3 (*HhaI*), A4 (*HinfI*) y A5 (*HpaII*), vs geles *in silico* (negro) usando las mismas enzimas del gel *in vitro*: *AluI* (B), *HaeIII* (C), *HhaI* (D), *HinfI* (E) y *HpaII* (F).

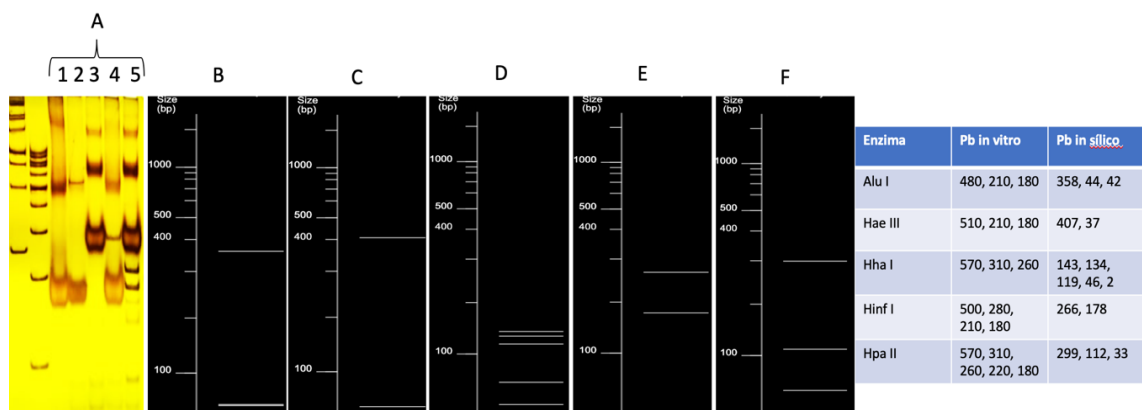


Figura 18. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de *Fusarium falciforme* con enzimas de restricción: A1 (*AluI*), A2 (*HaeIII*), A3 (*HhaI*), A4 (*HinfI*) y A5 (*HpaII*), vs geles *in silico* (negro) usando las mismas enzimas del gel *in vitro*: *AluI* (B), *HaeIII* (C), *HhaI* (D), *HinfI* (E) y *HpaII* (F).

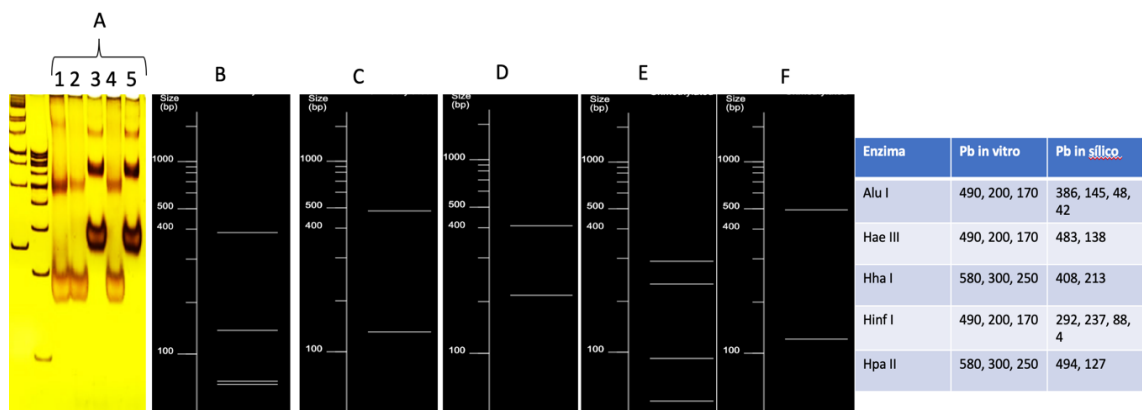


Figura 19. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de *Fusarium languescens* con enzimas de restricción: A1 (*AluI*), A2 (*HaeIII*), A3 (*HhaI*), A4 (*HinfI*) y A5 (*HpaII*), vs geles *in silico* (negro) usando las mismas enzimas del gel *in vitro*: *AluI* (B), *HaeIII* (C), *HhaI* (D), *HinfI* (E) y *HpaII* (F).

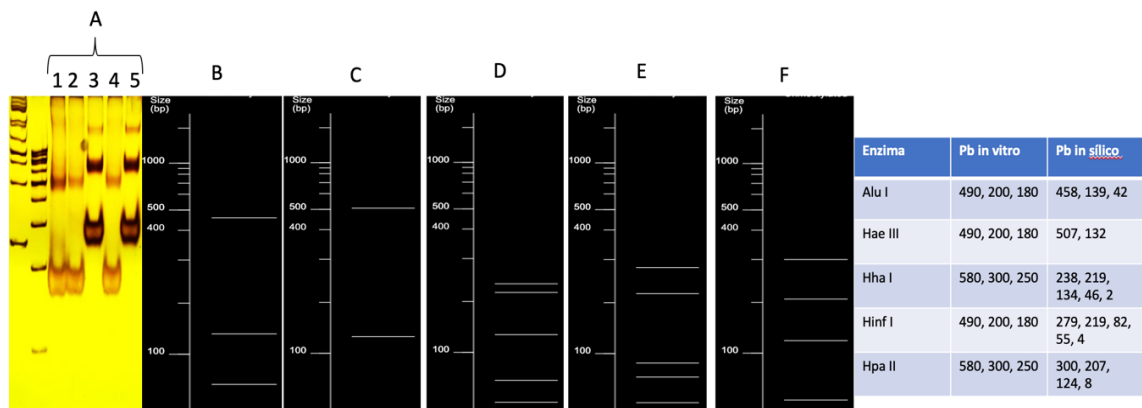


Figura 20. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de *Fusarium noneumartii* con enzimas de restricción: A1 (*AluI*), A2 (*HaeIII*), A3 (*HhaI*), A4 (*HinfI*) y A5 (*HpaII*), vs geles *in silico* (negro) usando las mismas enzimas del gel *in vitro*: *AluI* (B), *HaeIII* (C), *HhaI* (D), *HinfI* (E) y *HpaII* (F).

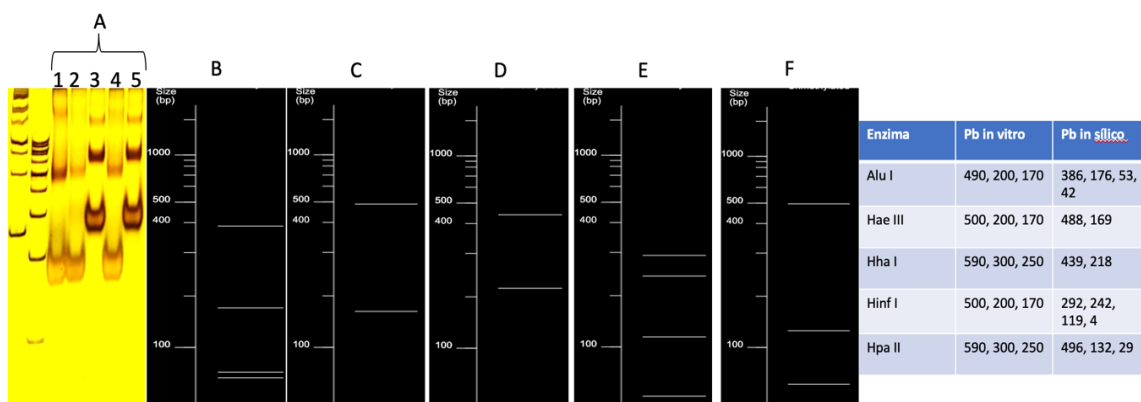


Figura 21. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de *Fusarium curvatum* con enzimas de restricción: A1 (*AluI*), A2 (*HaeIII*), A3 (*HhaI*), A4 (*HinfI*) y A5 (*HpaII*), vs geles *in silico* (negro) usando las mismas enzimas del gel *in vitro*: *AluI* (B), *HaeIII* (C), *HhaI* (D), *HinfI* (E) y *HpaII* (F).

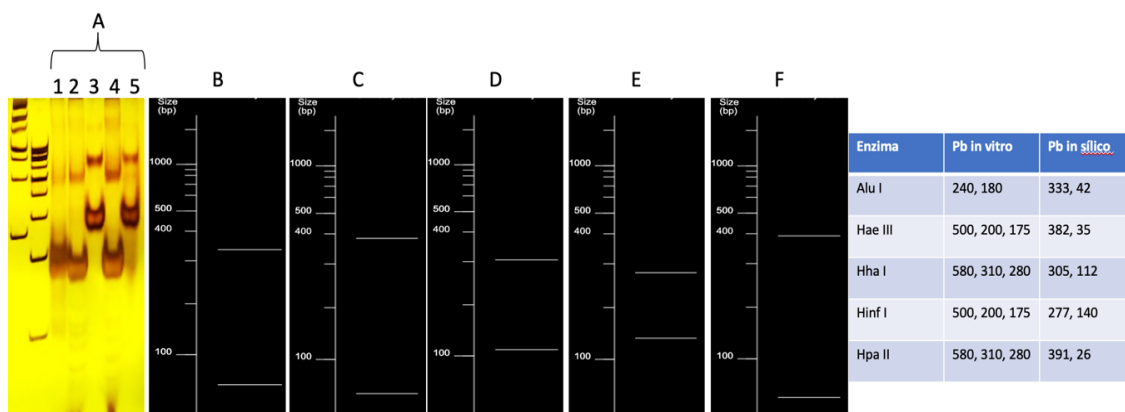


Figura 22. Gel acrilamida 9 % (amarillo) de *Fusarium nirenbergiae* con enzimas de restricción: A1 (*AluI*), A2 (*HaeIII*), A3 (*HhaI*), A4 (*HinfI*) y A5 (*HpaII*), vs geles *in silico* (negro) usando las mismas enzimas del gel *in vitro*: *AluI* (B), *HaeIII* (C), *HhaI* (D), *HinfI* (E) y *HpaII* (F).

La comparación entre los perfiles de restricción obtenidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 9 % (*in vitro*) y los patrones generados *in silico* mostró una alta concordancia general en el número y distribución relativa de fragmentos para las distintas especies de *Fusarium* analizadas (*F. clavum*, *F. falciforme*, *F. languescens*, *F. noneumartii*, *F. curvatum* y *F. nirenbergiae*), así como para las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* y *HpaII*. Si bien los tamaños fragmentarios estimados a partir de los geles de acrilamida presentaron ligeras variaciones respecto a los valores teóricos calculados *in silico*, dichas discrepancias se consideran esperables, dado que la migración electroforética puede verse influenciada por factores técnicos como la resolución del gel, la

conformación secundaria del ADN, la intensidad de tinción y la precisión en la estimación visual de las bandas. No obstante, estas diferencias no afectaron la interpretación global de los patrones de restricción, ya que la correspondencia en el número de fragmentos y en su jerarquía de tamaños se mantuvo consistente entre ambos enfoques.

En conjunto, los resultados respaldan que los geles de acrilamida *in vitro* constituyen una herramienta confiable para la discriminación de especies de *Fusarium* cuando se utilizan en combinación con análisis *in silico*, que permiten validar y complementar los datos experimentales. Esta aproximación integrada fortalece la robustez del análisis molecular, especialmente en estudios en los que la precisión absoluta del tamaño fragmentario no es crítica, sino la comparación de patrones de restricción entre taxones.

4.3.4 Dendrogramas

El análisis de agrupamiento UPGMA basado en la matriz binaria obtenida con la enzima *AluI* permitió identificar dos grupos principales entre las especies de *Fusarium* evaluadas (Figura 23).

El grupo I estuvo conformado por *F. curvatum*, *F. languescens*, *F. noneumartii* y *F. falciforme*. Dentro de este grupo *F. curvatum* y *F. languescens* presentaron la menor distancia genética, lo que indica una elevada similitud en sus patrones de bandas. Posteriormente, *F. noneumartii* se integró al mismo clado, mostrando una afinidad genética con dichas especies, aunque con ciertas variaciones en el perfil obtenido. Por otra parte, *F. falciforme* se agrupó a una mayor distancia, evidenciando una menor similitud respecto a las demás especies del grupo.

El grupo II estuvo integrado por *F. clavum* y *F. nirenbergiae*, las cuales formaron un clado bien definido y separado del Grupo I. Este agrupamiento sugiere una elevada similitud genética entre ambas especies y una marcada diferenciación con respecto al resto de los aislamientos evaluados.

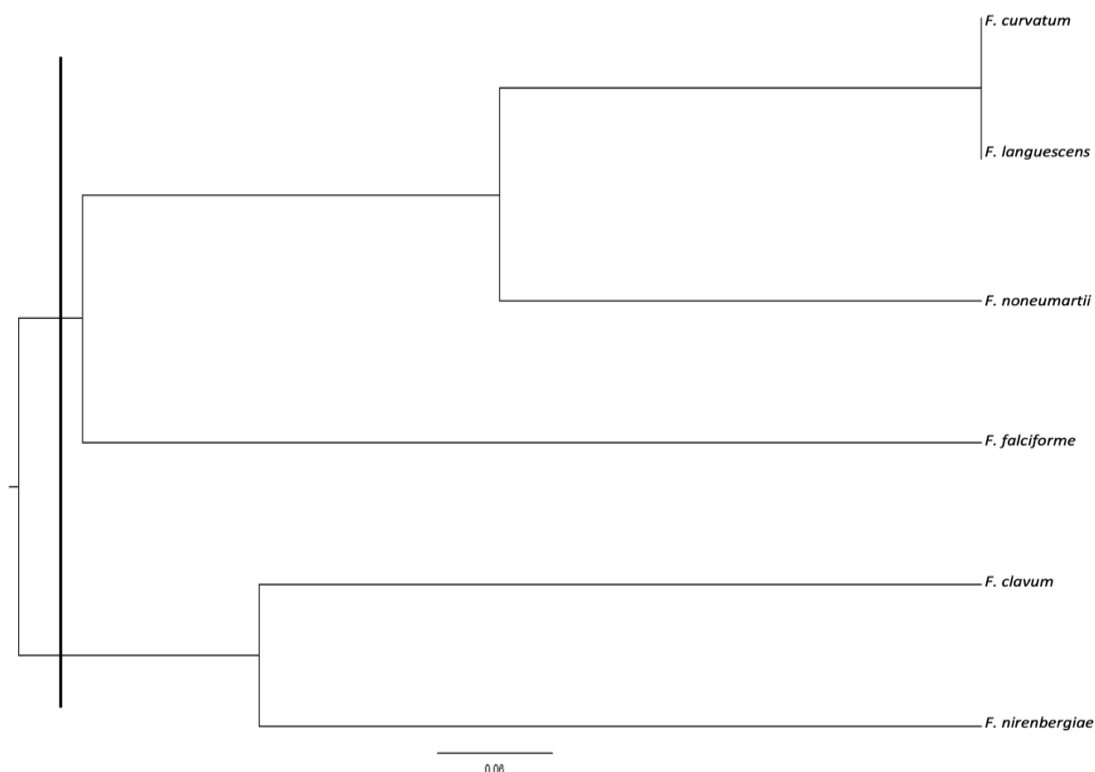


Figura 23. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima *AluI* de *Fusarium*.

El análisis de agrupamiento UPGMA basado en la matriz binaria obtenida con la enzima *HaeIII* permitió identificar dos grupos principales entre las especies de *Fusarium* evaluadas (Figura 24).

El Grupo I estuvo conformado por *F. curvatum*, *F. languescens*, *F. noneumartii* y *F. falciforme*. Dentro de este agrupamiento *F. curvatum* y *F. languescens* presentaron la menor distancia genética, indicando una elevada similitud en sus perfiles de restricción. Posteriormente, *F. noneumartii* se integró al mismo clado. Mostrando afinidad genética con dichas especies, aunque con un mayor grado de diferenciación. Por su parte, *F. falciforme* se agrupó a una distancia superior, evidenciando el patrón molecular más divergente entro del Grupo I.

El Grupo II estuvo integrado por *F. clavum* y *F. nirenbergiae*, las cuales formaron un clado bien definido y separado del Grupo I. Este agrupamiento evidenció una elevada similitud entre ambas especies y una diferenciación marcada respecto al resto de los aislamientos analizados.

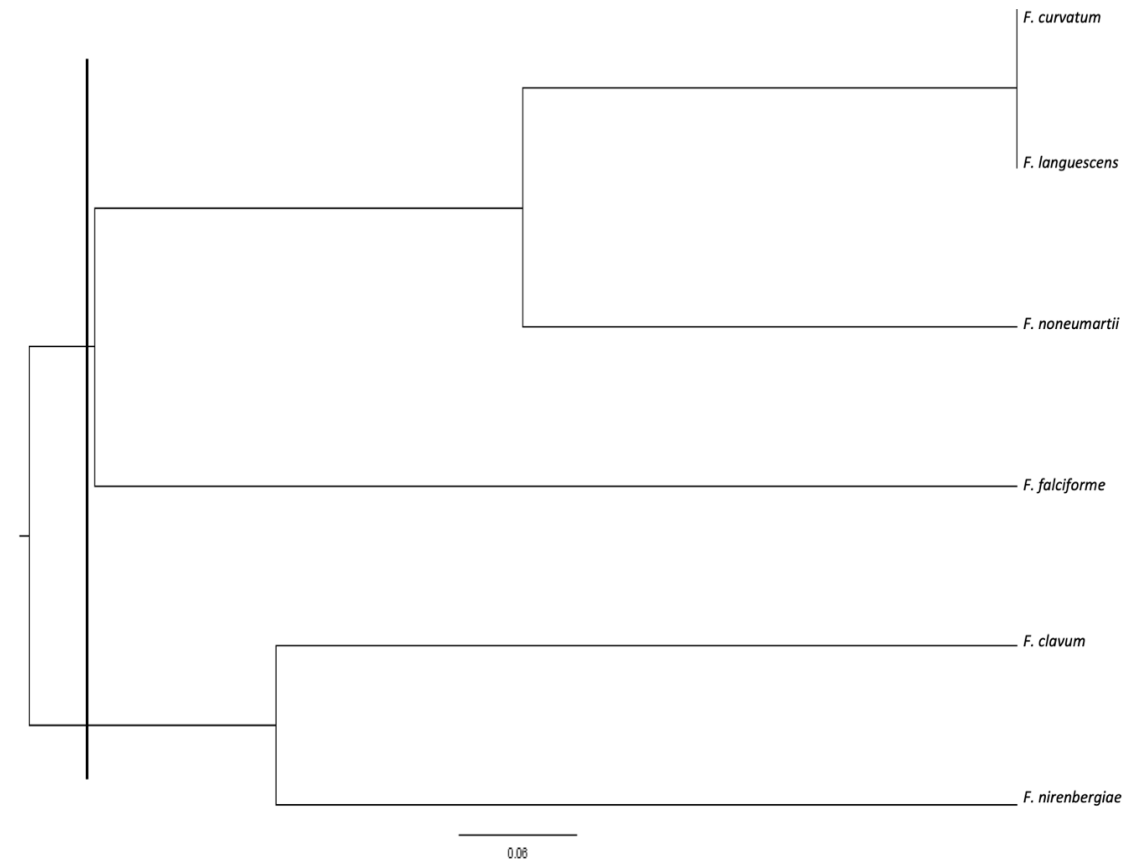


Figura 24. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima *HaeIII* de *Fusarium*.

El análisis de agrupamiento UPGMA basado en la matriz binaria obtenida con la enzima *HhaI* permitió identificar tres grupos principales entre las especies de *Fusarium* evaluadas (Figura 25).

El Grupo I estuvo conformado por *F. languescens*, *F. noneumartii* y *F. curvatum*. Dentro de este agrupamiento *F. languescens* y *F. noneumartii* presentaron la menor distancia genética, indicando una elevada similitud en sus perfiles de restricción. Posteriormente, *F. curvatum* se integró al mismo clado, mostrando

afinidad genética con ambas especies, aunque con un mayor grado de diferenciación molecular.

El Grupo II estuvo integrado por *F. falciforme* y *F. nirenbergiae*, las cuales formaron un clado bien definido y claramente separado del Grupo I. Este agrupamiento sugiere una mayor similitud genética entre dichas especies en comparación con el resto de los aislamientos analizados.

Por otra parte, *F. clavum* conformó el Grupo III, separándose como una rama independiente a una distancia genética considerable del resto de las especies evaluadas. Este comportamiento indica un perfil molecular altamente diferenciado detectado mediante la enzima *HhaI*.

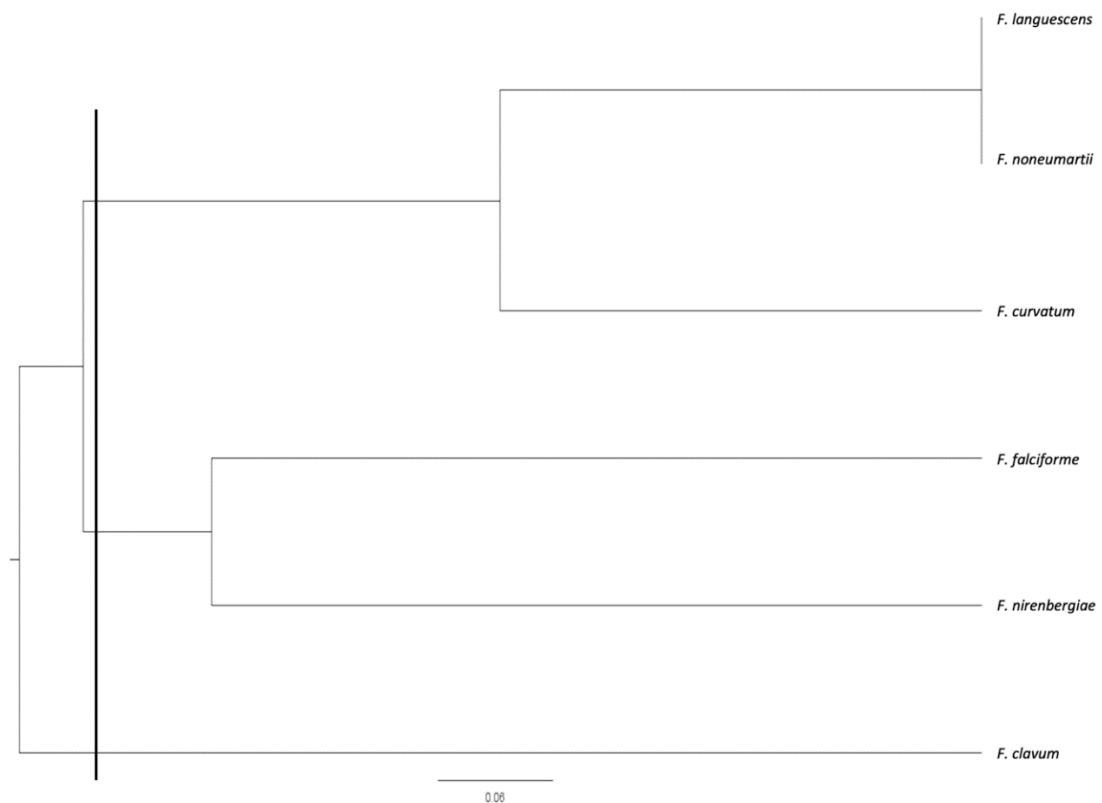


Figura 25. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima *HhaI* de *Fusarium*.

El análisis de agrupamiento UPGMA basado en la matriz binaria obtenida con la enzima *HinfI* permitió identificar tres grupos principales entre las especies de *Fusarium* evaluadas (Figura 26).

El Grupo I estuvo conformado por *F. curvatum* y *F. nirenbergiae*, las cuales se agruparon estrechamente indicando una elevada similitud genética y perfiles de restricción altamente relacionados.

El Grupo II estuvo integrado por *F. languescens* y *F. noneumartii*. Ambas especies mostraron afinidad genética entre sí, evidenciando patrones moleculares compartidos, aunque diferenciados con respecto a los observados en el Grupo I.

Por otra parte, *F. clavum* y *F. falciforme* conformaron el Grupo III, agrupándose a una mayor distancia genética respecto a los Grupos I y II. Dentro de este agrupamiento, *F. falciforme* presentó el patrón molecular más divergente, evidenciando un perfil de restricción altamente diferenciado.

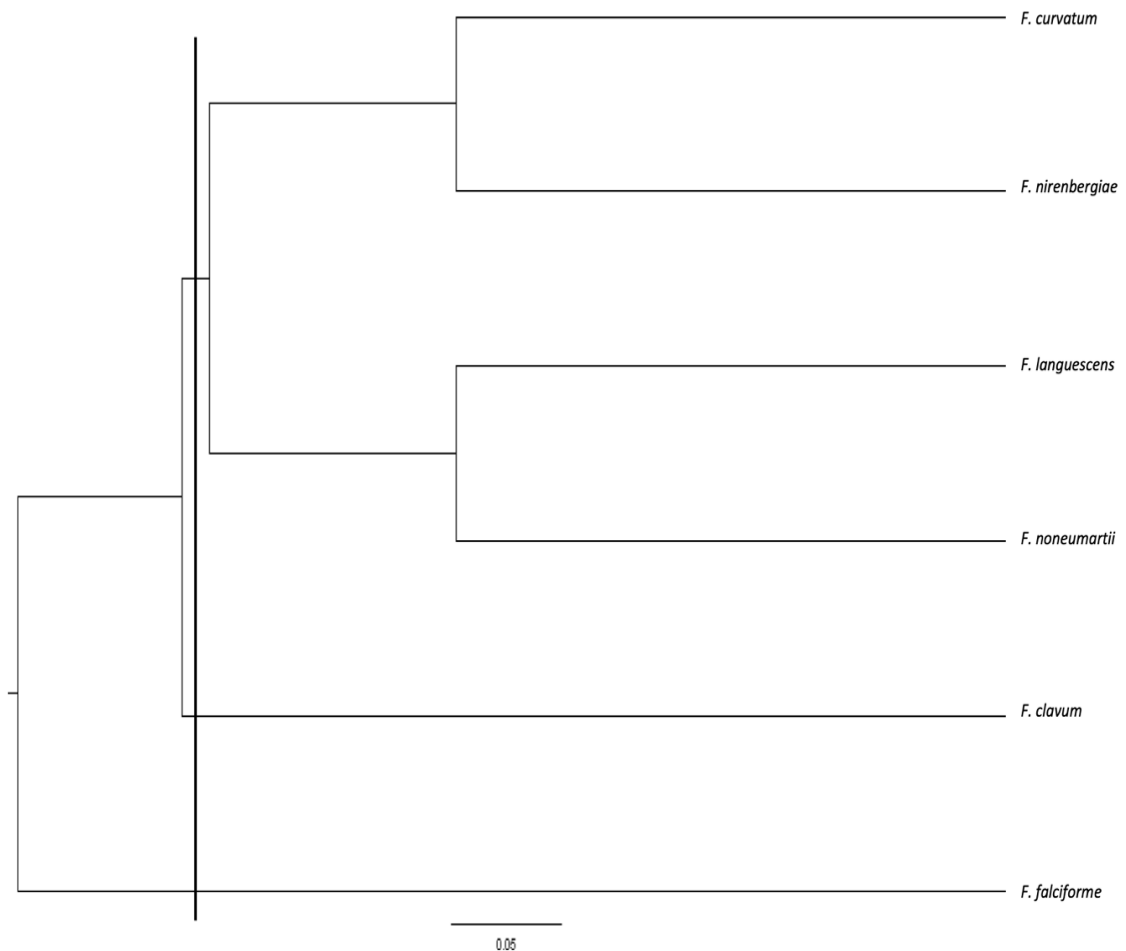


Figura 26. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima *HinfI* de *Fusarium*.

El análisis de agrupamiento UPGMA basado en la matriz binaria obtenida con la enzima *HpaII* permitió identificar tres grupos principales entre las especies de *Fusarium* evaluadas (Figura 27).

El Grupo I estuvo conformado por *F. languescens*, *F. noneumartii* y *F. curvatum*. Dentro de este agrupamiento, *F. languescens* y *F. noneumartii* presentaron la menor distancia genética, evidenciando una elevada similitud en sus perfiles de restricción. Posteriormente, *F. curvatum* se integró al mismo clado, mostrando una afinidad genética con ambas especies, aunque con un mayor grado de diferenciación molecular.

Por otra parte, *F. clavum* conformó el Grupo II, separándose como una rama independiente respecto al Grupo I, lo que indica un perfil molecular diferenciado.

El Grupo III estuvo integrado por *F. falciforme* y *F. nirenbergiae*, las cuales formaron un clado bien definido y separado del resto de las especies evaluadas. Este agrupamiento sugiere una mayor similitud genética entre ambas especies y una diferenciación marcada con respecto a los demás aislamientos analizados.

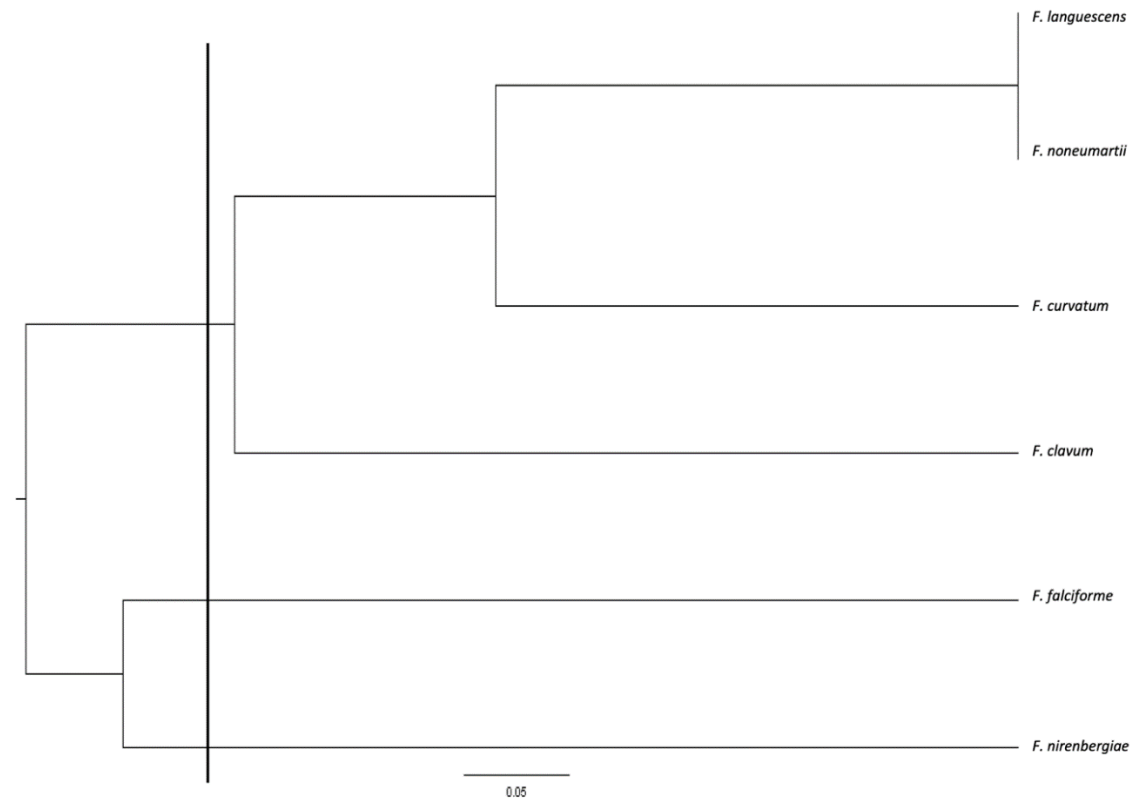


Figura 27. Dendrograma UPGMA generado a partir de los patrones de restricción obtenidos con la enzima *HpaII* de *Fusarium*.

5 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron integrar evidencias fisiológicas, microbiológicas y moleculares relacionadas con la interacción entre especies de *Fusarium* asociadas a marchitez vascular y diferentes estrategias de manejo en *Capsicum* spp. En conjunto, los hallazgos demostraron que tanto la susceptibilidad del hospedante como la capacidad patogénica y variabilidad genética de los aislados influyen directamente en el desarrollo de la enfermedad y en la respuesta de control biológico.

En las pruebas de patogenicidad, las diferencias observadas entre variedades de *Capsicum* spp. evidenciaron que la constitución genética del hospedante desempeña un papel fundamental en el establecimiento de la enfermedad. La alta severidad registrada en algunos cultivares coincide con lo descrito por Di Pietro et al. (2003), quienes señalaron que las diferencias anatómicas y bioquímicas en el sistema radical pueden modificar la atracción, penetración y colonización de *Fusarium* spp. Asimismo, la elevada agresividad observada en *F. nirenbergiae* representa un hallazgo relevante, ya que esta especie perteneciente al complejo *Fusarium oxysporum* ha sido asociada recientemente con cuadros severos de marchitez vascular. Lombard et al. (2015) indicaron que la virulencia de este complejo está relacionada con la presencia de efectores SIX (secreted in xylem), capaces de facilitar la evasión de las respuestas de defensa del hospedante y acelerar el progreso de la enfermedad.

La reducción del vigor, el desarrollo radicular y la severidad observada en plántulas infectadas también puede explicarse por la capacidad del patógeno para invadir el sistema vascular de la planta. Kashyap et al. (2020) y Srinivas et al. (2019) documentaron que, tras la colonización de las raíces, *Fusarium* spp. se establece dentro del xilema, donde la acumulación de hifas y estructuras defensivas vegetales como tilosas y depósitos de callosa provocan la obstrucción del flujo hídrico. Como consecuencia, disminuye el transporte de agua y nutrientes hacia los tejidos superiores, generando síntomas típicos de marchitez,

clorosis y colapso fisiológico. En este sentido, los resultados obtenidos confirman que la severidad observada en *Capsicum* spp. no depende únicamente de la presencia del patógeno, sino también de la capacidad fisiológica de cada cultivar para tolerar el daño vascular ocasionado.

De manera complementaria, la ausencia de interacción estadísticamente significativa entre variedades de *Capsicum* y especies de *Fusarium* sugiere que las diferencias de severidad estuvieron determinadas principalmente por el nivel inherente de resistencia o susceptibilidad genética del hospedante. Gordon (2017) señaló que el empleo de genotipos tolerantes constituye una de las alternativas más sostenibles para disminuir la incidencia de marchitez vascular en cultivos establecidos en suelos infestados, debido a que limita la progresión de la enfermedad y reduce las pérdidas productivas.

Respecto al control biológico, los ensayos de antagonismo *in vitro* evidenciaron que la eficacia de *Trichoderma* spp. depende tanto de la especie utilizada como de la estrategia de inoculación implementada. La superioridad mostrada por *T. asperellum* durante la confrontación simultánea demostró una elevada capacidad competitiva frente a *Fusarium* spp., lo cual coincide con lo reportado por Da Silveira et al. (2021), quienes describieron que esta especie posee una rápida colonización del sustrato y una importante producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas y proteasas, capaces de degradar la pared celular de otros hongos fitopatógenos. Asimismo, Tyskiewicz et al. (2022) señalaron que el antagonismo de *Trichoderma* involucra mecanismos complejos de competencia, antibiosis y micoparasitismo, permitiendo al antagonista reconocer, adherirse y degradar las hifas del patógeno para aprovechar posteriormente los nutrientes liberados.

La elevada inhibición observada en *T. asperellum* sugiere que este aislado presentó una respuesta más agresiva y eficiente frente a las especies de *Fusarium* evaluadas. En contraste, *T. harzianum* y *T. virens* mostraron una inhibición moderada-alta, aunque menor en comparación con *T. asperellum*. Zin

y Badaluddin (2020) mencionaron que algunas cepas comerciales de *Trichoderma* pueden perder competitividad debido a procesos de selección enfocados en estabilidad y conservación, reduciendo parcialmente su velocidad de colonización frente a aislados más adaptados. De igual manera, Alfiky y Weisskopf (2021) indicaron que inhibiciones superiores al 80 % suelen asociarse con una disminución considerable de mortalidad y una mejora en el vigor de plántulas bajo condiciones de invernadero, debido a la reducción del crecimiento micelial y la producción de metabolitos tóxicos por parte del patógeno.

En este contexto, los resultados obtenidos respaldan el potencial de *T. asperellum* como agente de biocontrol sostenible frente a la marchitez vascular en *Capsicum* spp. Además de presentar una rápida velocidad de respuesta y colonización, este antagonista mostró consistencia estadística en su capacidad inhibitoria, característica considerada esencial para el éxito de programas modernos de biocontrol, tal como señalaron Tilocca et al. (2020).

Por otra parte, los análisis moleculares realizados mediante el gen *tef-1 α* permitieron corroborar la identidad taxonómica de las especies de *Fusarium* evaluadas y establecer relaciones filogenéticas consistentes entre los aislados. La obtención de amplicones uniformes y la concordancia observada entre los patrones de restricción *in silico* e *in vitro* confirmaron la utilidad de la técnica PCR-RFLP como herramienta confiable para la diferenciación genética de microorganismos fitopatógenos. Ramírez-Moreno et al. (2004) señalaron que pequeñas variaciones en la movilidad electroforética pueden deberse a diferencias en la amplificación, digestión o estructura del ADN, sin comprometer necesariamente la validez diagnóstica de los resultados. Del mismo modo, Berg (2012) destacó que la PCR-RFLP continúa siendo una metodología ampliamente utilizada por su rapidez, accesibilidad y capacidad para detectar polimorfismos entre especies estrechamente relacionadas.

Los dendrogramas generados mediante UPGMA permitieron observar patrones de agrupamiento consistentes entre algunas especies, particularmente entre *F.*

curvatum y *F. languescens*, lo que sugiere una estrecha cercanía filogenética. Crous et al. (2021) indicaron que las especies pertenecientes al complejo *Fusarium oxysporum* presentan una diversificación relativamente reciente, por lo que es común encontrar regiones genómicas altamente conservadas entre taxones relacionados. En contraste, la diferenciación observada en *F. nirenbergiae* y *F. clavum* evidenció una mayor divergencia genética, resultado que coincide con la elevada virulencia mostrada por *F. nirenbergiae* durante las pruebas de patogenicidad. Geiser et al. (2021) mencionaron que los polimorfismos presentes en el gen *tef-1α* suelen relacionarse con procesos adaptativos y diferencias evolutivas entre especies de *Fusarium*.

En conjunto, la integración de herramientas fisiológicas, microbiológicas y moleculares permitió obtener una visión más completa sobre la interacción entre *Fusarium* spp., *Capsicum* spp. y *Trichoderma* spp. Los resultados obtenidos fortalecen la importancia de combinar estrategias de identificación molecular con métodos de manejo biológico para el estudio y control de enfermedades vasculares en cultivos agrícolas. Además, la correcta delimitación taxonómica de los aislados utilizados proporcionó mayor confiabilidad a los análisis de patogenicidad y antagonismo desarrollados, aspecto considerado indispensable en estudios fitopatológicos modernos debido a la alta variabilidad genética presente en el género *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

6 CONCLUSIONES

La presente investigación permitió demostrar que las especies de *Fusarium* asociadas a la marchitez vascular del chile presentan diferencias importantes en su capacidad patogénica, generando distintos niveles de incidencia, severidad y afectación fisiológica en genotipos de *Capsicum* spp. Entre las especies evaluadas, *F. nirenbergiae* destacó por mostrar la mayor agresividad, provocando un incremento significativo en la severidad de la enfermedad y una reducción considerable en el vigor y desarrollo de las plantas. Asimismo, se comprobó que la respuesta varietal fue diferencial, observándose una mayor

susceptibilidad en los genotipos Guajillo y Habanero, mientras que Jalapeño presentó una menor afectación, lo que sugiere la existencia de mecanismos de tolerancia natural que podrían ser aprovechados en programas de mejoramiento genético y manejo fitosanitario.

De igual forma, los ensayos de antagonismo *in vitro* permitieron confirmar la capacidad inhibitoria de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma harzianum* frente a distintas especies de *Fusarium*. Los resultados demostraron que el nivel de inhibición dependió tanto de la especie antagonista como del tipo de confrontación utilizada, siendo la confrontación simultánea la que permitió evidenciar una mayor competitividad de los antagonistas. Entre los tratamientos evaluados, *T. asperellum* presentó consistentemente los mayores porcentajes de inhibición micelial, mostrando una mayor rapidez de establecimiento y capacidad de competencia frente al patógeno. Esto permitió identificar a esta especie como la alternativa con mayor potencial para el desarrollo de estrategias sostenibles de control biológico dirigidas al manejo de enfermedades vasculares asociadas a *Fusarium* en cultivos de Chile.

Por otra parte, el análisis molecular basado en PCR-RFLP del gen *tef-1 α* permitió corroborar la identidad taxonómica de las especies de *Fusarium* evaluadas y diferenciar efectivamente los aislados mediante patrones de restricción específicos. La alta concordancia observada entre los resultados experimentales y los análisis *in silico* confirmó la confiabilidad de esta metodología como herramienta complementaria para la identificación molecular de especies fitopatógenas. Asimismo, los patrones de agrupamiento obtenidos evidenciaron relaciones filogenéticas consistentes entre algunas especies, lo que fortaleció la interpretación de los resultados de patogenicidad y antagonismo desarrollados durante la investigación.

En conjunto, los resultados obtenidos permitieron integrar información fisiológica, microbiológica y molecular relevante sobre la interacción entre *Fusarium* spp., *Capsicum* spp. y *Trichoderma* spp., aportando bases científicas útiles para el

diseño de estrategias de manejo fitosanitario más precisas y sostenibles. Además, la correcta identificación molecular de los aislados, junto con la evaluación de su comportamiento patogénico y su respuesta frente a agentes antagonistas, contribuye al fortalecimiento de futuros programas de diagnóstico, prevención y control de enfermedades vasculares en sistemas de producción de chile.

7 LITERATURA CITADA

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27(4), 617–631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Aguirre-Hernández, E., & Muñoz Ocotero, V. (2015). El chile como alimento. *Ciencia*, 66(3), 16–23. https://amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/66_3/PDF/Chile.pdf
- Albañil-Juárez, J. A., Mariscal Amaro, L. A., Martínez Martínez, T. O., Anaya López, J. L., Cisneros López, H. C., & Pérez Ramírez, H. A. (2018). Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11, 2191–2197. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i11.797>
- Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
- Awise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2381-9>
- Barboza, G. E., Carrizo García, C., Leiva González, S., Scaldaferrro, M., & Reyes, X. (2019). Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PloS One*, 14(1), Article e0209792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792>
- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379–382. <https://doi.org/10.1094/phyto-72-379>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology: the official*

- journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7(4), 249–260.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15666245/>
- Berg, H. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis—valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In S. Magdeldin (Ed.), *Gel electrophoresis—Principles and basics* (pp. 316–334). InTech.
<https://doi.org/10.5772/37724>
- Bosland, P. W., & Lindsey, D. L. (1991). A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Disease*, 75(10), 1048–1050. <https://doi.org/10.1094/PD-75-1048>
- Bosland, P. W., & Votava, E. J. (2012). Introduction. In P. W. Bosland & E. J. Votava (Eds.), *Peppers: Vegetable and spice capsicums* (2nd ed., pp. 1–12). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845938253.0001>
- Brown, T. A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 10, 616.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Chan-Chunab, N., Sauri Duch, E., Olivera Castillo, L., & Rivas Burgos, J. I. (2011). Evaluación de la calidad en la industrialización del chile habanero (*Capsicum chinense*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12 (2), 222–226.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81320900014>
- Crous, P., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K., Schroers, H., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G., Lamprecht, S., Cai, L., Rossman, A., Stadler, M., Summerbell, R., Taylor, J., Ploch, S., Visagie, C., ...Thines, M. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies In Mycology*, 98, Article 100116.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>
- Da Silveira, A. A., Andrade, J. S. P., Guissoni, A. C. P., da Costa, A. C., de Carvalho E Silva, A., da Silva, H. G., Brito, P., de Souza, G. R. L., & Fernandes, K. F. (2021). Larvicidal potential of cell wall degrading enzymes from *Trichoderma asperellum* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biotechnology Progress*, 37(5), Article e3182.
<https://doi.org/10.1002/btpr.3182>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

- Desjardins, A. E., & Proctor, R. H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024>
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracul, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 315–325. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Eshbaugh, W. H. (1993). History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In J. Janick & J. E. Simon (Eds.), *New crops* (pp. 132–139). Wiley.
- FAOSTAT. (2024). *Cultivos y productos de ganadería*. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Geiser, D. M., Al-Hatmi, A. M. S., Aoki, T., Arie, T., Balmas, V., Barnes, I., Bergstrom, G. C., Bhattacharyya, M. K., Blomquist, C. L., Bowden, R. L., Brankovics, B., Brown, D. W., Burgess, L. W., Bushley, K., Busman, M., Cano-Lira, J. F., Carrillo, J. D., Chang, H.-X., Chen, C.-Y., ... Zhang, X. (2021). Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. *Phytopathology*, 111(7), 1064–1079. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>
- Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Bhattacharyya, M. K., Brandt, M. E., Brown, D. W., Burgess, L. W., Chulze, S., Coleman, J. J., Correll, J. C., Covert, S. F., Crous, P. W., Cuomo, C. A., De Hoog, G. S., Di Pietro, A., Elmer, W. H., Epstein, L., Frandsen, R. J. N., ... Zhang, N. (2013). One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103(5), 400–408. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE>

- Gibbs, R. A. (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 62(13), 1202–1214. <https://doi.org/10.1021/ac00212a004>
- González-Castro, A., López Orona, C. A., López Urquidez, G. A., & Amarillas Bueno, L. (2023). *Fusarium* spp. causando la enfermedad de marchitez vascular en cultivo de *Capsicum* spp. en Sinaloa, México. *Avances en investigación Agropecuaria*, 27(Especial). <https://doi.org/10.53897/revaia.23.27.20>
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the fusarium wilt syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 23–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), Article pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
- Harman, G. E., Doni, F., Khadka, R. B., & Uphoff, N. (2021). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 529–546. <https://doi.org/10.1111/jam.14368>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Kashyap, A., Planas-Marquès, M., Capellades, M., Valls, M., & Coll, N. S. (2021). Blocking intruders: inducible physico-chemical barriers against plant vascular wilt pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 184–198. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa444>
- Kraft, K. H., Brown, C. H., Nabhan, G. P., Luedeling, E., De Jesús Luna Ruiz, J., D'Eeckenbrugge, G. C., Hijmans, R. J., & Gepts, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy Of Sciences*, 111(17), 6165–6170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308933111>
- Leslie, J., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Lombard, L., van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80(1), 189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- Long-Solis, J., & Vargas, L. A. (2005). *Food culture in Mexico*. Greenwood Press. <https://doi.org/10.5040/9798400652424>
- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>

- Marois, J. J., Fraviel, D. R., & Papavizas, G. C. (1984). Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biology & Biochemistry*, 16(4), 387–390. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90038-5)
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for its identification*. Pennsylvania State University Press.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465–493. <https://doi.org/10.2307/3761407>
- O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., Frandsen, R. J. N., Lysøe, E., Rehner, S. A., Aoki, T., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Kang, S., & Geiser, D. M. (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a Middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important *Fusarium* spp. *Fungal Genetics and Biology*, 52, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- Pathirana, R. (2013). *Peppers: Vegetable and spice capsicums* (2nd ed.), by Paul W. Bosland & Eric J. Votava. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 41(2), 102–103. <https://doi.org/10.1080/01140671.2012.745161>
- Pérez, G. A.; Pineda, D. A.; Latournerie, M. L.; Pam, P. W. y Godoy, Á. C. (2008). Niveles de evapotranspiración potencial en la producción de chile habanero. *Terra Latinoamericana*, 26, 53–59. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S2007-0934201700080174700017&lng=en
- Pernezny, K., Roberts, P. D., Murphy, J. F., & Goldberg, N. P. (2003). *Compendium of Pepper Diseases*. APS Press.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., Berman, M. J., Cooke, R. G., Rademaker, K., Ranere, A. J., Raymond, J. S., Sandweiss, D. H., Scaramelli, F., Tarble, K., & Zeidler, J. A. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315(5814), 986–988. <https://doi.org/10.1126/science.1136914>

- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica; Netherlands Journal of Plant Breeding*, 96(1), 129–133. <https://doi.org/10.1023/a:1002913228101>
- Ploetz, R. C. (2015). *Fusarium wilt of banana*. *Phytopathology*, 105(12), 1512–1521. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-15-0101-RVW>
- Porras, F., González-Pérez, E., & Ramírez, A. (2019). El chile como símbolo cultural en México: historia y tradición. *Estudios de Cultura Otopame*, 11(2), 89–106.
- Ramírez Meraz, M., & Méndez Aguilar, R. (2018). Mejoramiento genético de los chiles comerciales en México. In A. Aguilar-Meléndez, M. A. Vásquez-Dávila, E. Katz, & M. R. Hernández Colorado (Eds.), *Los chiles que le dan sabor al mundo*. IRD Éditions. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.30979>
- Ramírez-Moreno, S., Méndez-Alvarez, S., Martínez-Alonso, M., Esteve, I., & Gaju, N. (2004). Factors affecting interpretation of restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from PCR-amplified bacterial 16S rRNA genes: operon number and primer mismatching. *Current Microbiology*, 48(4), 285–290. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4160-z>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2024, 28 enero). *México, entre los principales productores de chile verde en el mundo: Agricultura*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/mexico-entre-los-principales-productores-de-chile-verde-en-el-mundo-agricultura>
- Skidmore, A., & Dickinson, C. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(76\)80092-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(76)80092-7)
- Srinivas, C., Devi, D. N., Murthy, K. N., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T., Singh, B., Kalagatur, N. K., Niranjana, S., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., Nayaka, S. C., & Srivastava, R. K. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315-1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134–154. <https://doi.org/10.1007/bf01347224>
- Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 323–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
- Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a killer: Microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, 41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>

- Tyskiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek-Ścisł, J. (2022). Trichoderma: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Valadez, E., & Kahl, G. (2022). *Huellas de ADN en genómica de plantas: Métodos y aplicaciones* (2nd ed.). Mundi-Prensa. (Nota: Referencia actualizada al contexto de técnicas modernas de electroforesis).
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005c). *DNA Fingerprinting in Plants*. <https://doi.org/10.1201/9781420040043>
- Winter, P., & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 438–448. <https://doi.org/10.1007/BF00364619>
- Wolcan, S. M., Lori, G. A., Ronco, L., Mitidieri, A. F., & Fernández, R. (2001). Enanismo y podredumbre basal de *Eustoma grandiflorum* y su relación con la densidad de *Fusarium solani* en el suelo. *Fitopatologia Brasileira*, 26(4), 710–714. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000400003>
- Yan, X., Guo, S., Gao, K., Sun, S., Yin, C., & Tian, Y. (2023). The impact of the soil survival of the pathogen of *Fusarium* wilt on soil nutrient cycling mediated by microorganisms. *Microorganisms*, 11(9), 2207. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092207>
- Zhang, Y.-L., Jia, Q.-L., Li, D.-W., Wang, J.-E., Yin, Y.-X., & Gong, Z.-H. (2013). Characteristic of the pepper CaRGA2 gene in defense responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 8985–9004. <https://doi.org/10.3390/ijms14058985>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.09.003>