

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA

POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL

**DETERMINACIÓN, PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL DE LA
PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO**

(*Capsicum pubescens* R & P).

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA

VALENTINA ANTONIA RANGEL JIMÉNEZ



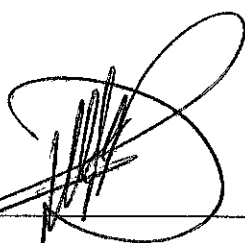
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

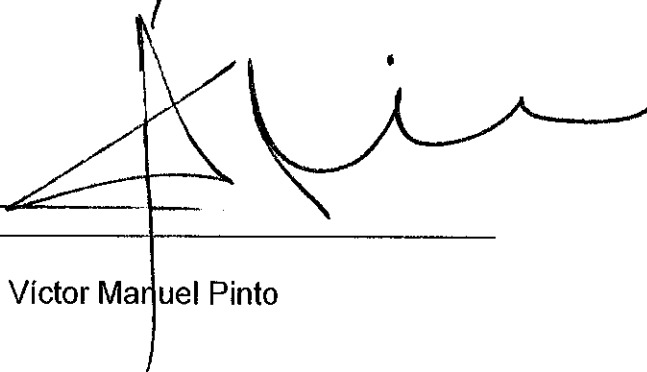
Chapingo, Estado de México, Junio del 2006

La presente tesis titulada "Determinación, patogenicidad y biocontrol de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*Capsicum pubescens*)". Fue realizada por Valentina A. Rangel Jiménez bajo la dirección del comité asesor que se indica, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Director 
Dr. Marcelo Acosta Ramos

Asesor 
M.C Francisco Ponce González

Asesor 
Dr. Víctor Manuel Pinto

Chapingo México Junio de 2006

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Datos generales

Nombre: Valentina Antonia Rangel Jiménez

Lugar de nacimiento: Pachuca Hidalgo

Profesión: Ingeniero Agrícola especialista en Agroecosistemas

Formación Académica

Licenciatura: Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México (1996-2001)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología agrícola, por otorgarme la gran oportunidad de realizar mis estudios de maestría en Protección Vegetal.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por su invaluable apoyo así como su paciencia, determinación y amistad, para que este trabajo llegara a buen termino. Siempre le estaré agradecida.

Al Dr. Francisco Ponce González por su ayuda para la realización de esta tesis ademas de proporcionarme el material vegetal necesario.

Al Dr. Víctor Manuel Pinto por su disposición y ayuda para la realización de esta tesis.

Al M.C. Lino Gasca por su disposición y amistad para que se realizara el presente trabajo.

Al M.C. Antonio Mariscal Amaro y Rodrigo por su apoyo y valiosa amistad para así hacer más amena la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa Navarrete Maya, por su ayuda incondicional además de ser un ejemplo a seguir.

Al encargado del laboratorio de virus: Mario, los trabajadores del laboratorio de semillas en Fitotecnia y los encargados de la librería en Chapingo (El Sr. Jasso, Doña Anita, y Doña Chabe). Gracias por su ayuda y disponibilidad al requerir alguna ayuda o material.

Valentina Rangel Jiménez

DEDICATORIA

A mi hijo Tambache

Por ser el regalito más precioso que me ha dado la vida al cual dedico esta tesis

A Oscar

Por ser el hombre que más quiero en esta vida, brindarme lo mejor de si, paciencia, amor y además de juntos ser los padres de un hijo maravilloso.

A mis padres, la mama Olí y papa Yeyo

Los mejores padres que pude tener, que siempre han sido orgullo y motivación de muchas de las cosas que he realizado y realizare en la vida, espero siempre seguir contando con su incondicional apoyo y amor.

A mis hermanos: Pecas y Jano

Que los adoro y estoy orgullosa de ellos por ser los mejores hermanos, siempre maravillosos y que a pesar de algunos tropiezos juntos nunca rendirnos, espero sigamos queriéndonos y llevándonos bien siempre.

A mis amigos

A due donas grandiozas: **Tania** y **Naneth** per sempre estare con me e adesso sere amicci y a ti **Ime** siempre presente, tu **Omar** por ser tan lindo. A mis grandes amigos: **Alonso, Ismael, Toño, Rodrigo, Vincenzo, Susy, Honorato, Martín, Miriam, Márian, Pera, Lino, Nereo**, gracias por brindarme su amistad y ayuda incondicionalmente nunca olvidare todos los maravillosos momentos que pasamos juntos en esta maestría y deseo sinceramente que triunfen en todo lo que realicen.

A ti Tutter

Por siempre estar ahí e impulsarme retos en la vida

Valentina Rangel Jiménez

CONTENIDO

Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Prólogo	xi
Resumen general	xii
General summary	xii

CAPITULO 1

**DETERMINACIÓN, PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL DE LOS AGENTES
CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE
MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P).**

1.	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
	Objetivos	2
2.	REVISION DE LITERATURA	4
2.1	Importancia del cultivo de chile	4
2.2	Importancia económica mundial	4
2.3	Importancia del chile en México	4
2.4	Origen y usos	5
2.5	Taxonomía	5
2.6	Botánica y fisiología	6
2.6.1	Análisis nutritivo	6
2.7	Enfermedades	6
2.7.1	<i>Phytophthora capsici</i> Leo.	6
2.7.1.1	Antecedentes	6
2.7.1.2	Hospedantes	7
2.7.1.3	Sintomatología y daño	7
2.7.1.4	Morfología	8
2.7.1.5	Ciclo de vida	9

2.7.1.6	Epidemiología	9
2.7.1.7	Manejo de la enfermedad	9
2.7.2	<i>Rhizoctonia solani</i>	10
2.7.2.1	Antecedentes	10
2.7.2.2	Hospedantes	10
2.7.2.3	Sintomatología y daño	11
2.7.2.4	Morfología	11
2.7.2.5	Ciclo de vida	12
2.7.2.6	Epidemiología	12
2.7.2.7	Grupos de anastomosis	12
2.7.3	<i>Fusarium oxysporum</i> (Atkinson)	13
2.7.3.1	Antecedentes	13
2.7.3.2	Hospedantes	13
2.7.3.3	Sintomatología	13
2.7.3.4	Morfología	14
2.7.3.5	Ciclo de vida	14
2.7.3.6	Epidemiología	14
2.7.3.7	Manejo de la enfermedad	14
2.8	Biocontroladores	15
2.8.1	<i>Bacillus subtilis</i>	16
2.8.1.1	Características	16
2.8.2	<i>Trichoderma harzianum</i>	19
2.8.3	Hongos formadores de micorrizas	21
3	LITERATURA CITADA	24

CAPITULO 2

DETERMINACIÓN Y PATOGENICIDAD DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P).

RESUMEN	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUCCION	31
Objetivos	31
2 MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1 Asociación constante de los hongos con los síntomas	32
2.1.1 Material vegetal	32
2.1.2 Aislamiento de hongos	32
2.1.3 Purificación de los hongos e incremento de inóculo	32
2.1.4 Identificación de los hongos aislados	34
2.1.5 Determinación de la patogenicidad	36
2.2 Fase de invernadero	36
2.2.1 Preparación del material vegetal	36
2.2.2 Preparación del inóculo	36
2.2.3 Inoculación de plantas	36
2.2.4 Reaislamientos	38
2.2.5 Variables evaluadas	38
2.2.6 Diseño del experimento	39
2.2.7 Análisis de resultados	39
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1 Frecuencia de aislamiento de hongos obtenidos de la marchitez del chile manzano	40
3.2 Sintomatología e incidencia de la marchitez del chile manzano	42

3.3	Evaluación de la altura de plantas	46
3.4	Reaislamiento de los hongos	49
4	CONCLUSIONES	51
5	LITERATURA CITADA	52

CAPITULO 3

MANEJO BIOLÓGICO DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO (*Capsicum pubsens* R & P).

	RESUMEN	54
	ABSTRACT	55
1	INTRODUCCIÓN	56
	Objetivos	57
2	MATERIALES Y MÉTODOS	58
2.1	Preparación y cuantificación del inóculo	58
2.1.1	De <i>Rhizoctonia solani</i>	58
2.1.2	De <i>Fusarium oxysporum</i>	58
2.1.3	De <i>Phytophthora capsici</i> Leo	59
2.2	Preparación del material vegetal	59
2.3	Inoculación de los hongos fitopatógenos	59
2.4	Aplicación de los biocontroladores	60
2.5	Variables evaluadas	62
2.6	Diseño experimental	62
2.7	Análisis estadístico	62

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
3.1	Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez (<i>R. solani</i>) en plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>R. solani</i>.	63
3.2	Comportamiento de la altura de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>R. solani</i>.	66
3.3	Comportamiento del rendimiento (numero de flores) de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>R. solani</i>.	67
3.4	Comportamiento del peso seco de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>R. solani</i>.	67
3.5	Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i>.	68
3.6	Comportamiento de la altura de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>F. oxysporum</i>.	71
3.7	Comportamiento del rendimiento (número de flores) y peso seco de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>F. oxysporum</i>.	71

3.8	Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>P. capsici</i> .	72
3.9	Comportamiento de altura de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>P. capsici</i> .	75
3.10	Comportamiento del rendimiento (numero de flores) y peso seco de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con <i>P. capsici</i> .	75
3.11	Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos (<i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>).	76
3.12	Comportamiento de altura de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>).	78
3.13	Comportamiento del rendimiento (número de flores) de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos (<i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>).	79

3.14	Comportamiento del peso seco de las plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos <i>R.</i> <i>solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>).	79
4	CONCLUSIONES	81
5	LITERATURA CITADA	82

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO 2		Pag.
Cuadro 1	Diseño del experimento para determinar la patogenicidad y sintomatología de hongos aislados e inoculados en plantas de chile manzano (<i>C. pubescens</i>) con dos o tres hojas verdaderas.	37
Cuadro 2	Frecuencia de aislamiento de hongos obtenidos de síntomas de pudrición de cuello y raíz en chile manzano (<i>C. pubescens</i>) en el Municipio de Coatepec de Harinas, Estado de México.	40
Cuadro 3	Comportamiento de la altura en plantas de chile manzano acuerdo a los agentes causales de la marchitez del chile (<i>C. pubescens</i>) y al tipo de inoculación.	49
 CAPITULO 3 		
Cuadro 1	Diferentes tratamientos para el manejo biológico de los patógenos de la raíz del chile manzano (<i>C. pubescens</i>).	61
Cuadro 2	Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (número de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con <i>R. solani</i> .	64
Cuadro 3	Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (número de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con <i>F. oxysporum</i> .	69
Cuadro 4	Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (número de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con <i>P. capsici</i> .	74
Cuadro 5	Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (número de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con la mezcla de hongos (<i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>).	77

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 2	Pag.
Figura 1 Crecimiento en medio PDA de las colonias, síntomas de partes aisladas e inducidos de los patógenos involucrados en la pudrición de raíz, cuello y marchitez de chile manzano (<i>C. pubescens</i>): a) Colonia de <i>P. capsici</i>, b) Pudrición de raíz de donde se aisló <i>P. capsici</i>, c) Síntomas inducidos por <i>P. capsici</i>, d) Colonia de <i>R. solani</i>, e) Pudrición de raíz de donde se aisló <i>R. solani</i>, f) Síntomas inducidos por <i>R. solani</i> g) Colonia de <i>F. oxysporum</i>, h) Estrangulamiento de cuello de donde se obtuvo <i>F. oxysporum</i>, i) Síntomas inducidos por <i>F. oxysporum</i>. j) Colonia de <i>P. aphanidermatum</i>, k) Síntomas de marchitez del cual se aisló a <i>P. aphanidermatum</i>, l) Síntomas inducidos por <i>P. aphanidermatum</i>.	41
Figura 2 Incidencia de plantas muertas (marchitez) a los 66 ddi (días después de la inoculación) de acuerdo al tipo de agente causal de la pudrición de raíz, cuello y marchitez de chile manzano y en función del tipo de inoculación.	43
Figura 3 Altura final (en cm) de las plantas de chile manzano inoculadas con diferentes patógenos y formas de inoculación a los 66 días después de la inoculación.	47
Figura 4 Evaluación de la altura de planta a los 33 días después de la inoculación, a). Comparación de la altura entre los diferentes hongos de derecha a izquierda <i>R. solani</i>, <i>P. capsici</i>, <i>F. oxysporum</i> y <i>P. aphanidermatum</i>; b). Escaso crecimiento y síntomas de clorosis causado por <i>R. solani</i>; c). Muerte de planta causada por <i>R. solani</i>; d). Evaluación de la altura de planta a los 66 días después de la inoculación, comparación de la altura entre los diferentes hongos de derecha a izquierda <i>R. solani</i>, <i>P. capsici</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>P. aphanidermatum</i> y testigo; e). Síntomas de marchitez causados por <i>P. capsici</i>; y f). Muerte de planta causada por <i>P. capsici</i>.	50

CAPITULO 3

- Figura 1** Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *R. solani*. 65
- Figura 2** Altura final (cm) de las plantas de chile manzano tratadas con diferentes productos biocontroladores e inoculadas con diferentes hongos patógenos (*R. solani*, *P. capsici*, *F. oxysporum* y mezcla de hongos o coctel). 67
- Figura 3** Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *F. oxysporum*. 70
- Figura 4** Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores inoculadas con *P. capsici*. 74
- Figura 5** Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *oxysporum*). 78
- Figura 6** Síntomas de los patógenos involucrados en la pudrición raíz, cuello y marchit en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores y crecimiento de las colonias de partes aisladas. 80

PRÓLOGO

El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar los agentes causales de la marchitez del chile (*Capsicum pubescens* R & P), conocer la patogenicidad de los hongos aislados de la marchitez del chile manzano (*C. pubescens* R & P), evaluar la eficiencia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* a dosis diferentes como agentes biocontroladores de enfermedades de la raíz del chile manzano (*C. pubescens* R & P), determinar el efecto de la forma de aplicación de los agentes de biocontrol y conocer el comportamiento de los hongos formadores de micorrizas en el manejo de patógenos de la raíz del chile. La presente tesis está integrada por tres capítulos, uno de los cuales es el artículo científico que corresponde al capítulo 2. Este artículo y el capítulo 3 fueron escritos de acuerdo a las normas editoriales de la Revista Mexicana de Fitopatología. Por el estilo de escritura de la tesis en artículos o capítulos fue necesario repetir cierta información en algunos capítulos. La introducción general y la revisión de literatura se presentan en el capítulo 1. El capítulo 2 trata sobre la determinación y patogenicidad de los agentes causales de la marchitez del chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P), en donde se obtuvieron los resultados siguientes: dentro de los patógenos que intervienen en la marchitez del chile se encontraron a *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Los tres hongos fueron patógenos y causaron marchitez en la planta, *R. solani* causó estrangulamiento del cuello de la planta y en la fase de transplante fue el que causó la intensidad mayor de la enfermedad. *P. capsici* fue el más agresivo causando marchitez, necrosis de cuello, y desprendimiento de la epidermis de la raíz. El capítulo 3 aborda sobre el manejo biológico de los agentes causales de pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*C. pubescens*), con los resultados siguientes: La aplicación de Endo-Rhyza® (D2) en la dosis mas alta, al momento de la siembra, protegió (80%) a las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) de la infección contra *Phytophthora capsici* y 73% de la infección causada por la mezcla de hongos (coctel); el producto biológico T-22® (*Trichoderma harzianum*) protegió 89% a las plantas de chile (*C. pubescens*), contra la infección ocasionada por *Rhizoctonia solani*; el producto biológico Bio-Raíz® protegió 100% a las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) de la infección ocasionada contra *Fusarium oxysporum*.

DETERMINACION, PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P).

DETERMINATION, PATHOGENICITY AND BIOCONTROL OF THE ROOT ROT, NECK ROT AND "CHILE MANZANO" (*Capsicum pubescens* R & P) WILTING.

Valentina Rangel-Jiménez¹

Marcelo Acosta -Ramos²

RESUMEN GENERAL

La presente investigación tuvo como **objetivos:** Determinar los agentes causales de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P); conocer la patogenicidad de los hongos aislados de la pudrición de raíz, cuello y marchitez de *C. pubescens*; evaluar la eficiencia de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y hongos formadores de micorrizas a dosis diferentes como agentes biocontroladores de enfermedades de la raíz y cuello de *C. pubescens*. Los agentes causales de la pudrición de raíz, cuello y marchitez de *C. pubescens* fueron *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*. La mezcla de hongos fue mas patógeno (80%) en comparación con la patogenicidad inducida en forma individual de cada hongo, T-22® protegió en un 87% a las plantas de chile, contra *R. solani*; Bio-Raíz® protegió en un 100% contra *F. oxysporum*; Endo-Rhyza® (D2) aplicada al momento de la siembra, protegió en un 73% de la infección causada por la mezcla de hongos y en 80% contra *P. capsici*, además indujo la altura, peso seco y numero de flores mayor.

Palabras clave: marchitez, Incidencia, manejo biológico, enfermedades de la raíz, eficacia.

GENERAL SUMMARY

The present research had the following objectives: to determine the causal agents of root rot, neck rot and "chile manzano" (*Capsicum pubescens* R & P.) wilting; to find out the pathogenicity of fungi isolated from root rot, neck rot and *C. pubescens* wilting; to evaluate the efficiency of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* and the fungi that produce mycorrhizae at different doses as biocontrol agents for root and stem base diseases and for *C. pubescens* wilting. The causal agents of root rot, neck rot and *C. pubescens* wilting were *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*; The mixture of these three above fungi was the most pathogenic, killing 80% of the plants, in comparison to the pathogenic induced by each individual causal agent. T-22® protected 89% of the plants against *R. solani*; Bio-Raíz® protected 100% of the plants against *F. oxysporum*; Endo-Rhyza® (D2) applied at the moment of sowing protected 73% of the plants from the infection produced by the fungi mix and protected 80% of the plants against *P. capsici*, besides increasing height, dry weight, and number of the flowers.

Key words: Incidence, biological management, root diseases, efficient, *P. capsici*.

¹ Tesista

² Director de tesis

¹ Thesis writer

² Director thesis

CAPÍTULO 1

DETERMINACIÓN, PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P).

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum pubescens* R & P), es uno de los componentes de la dieta mexicana, considerado como un alimento culturalmente importante en México. La gran diversidad de climas que existen en México, unido a la variación en tipos de chile, permiten que se pueda producir todo el año (Díaz 1957). En México el 80% del área sembrada es explotada bajo riego y el 20% es de temporal y de humedad residual. México le dedica un área mayor a esta hortaliza que al tomate rojo 76 000 y 47 000 ha. respectivamente, (SAGARPA, 2001). Además, es el país con la superficie y producción mayor en el mundo, ya que es favorecido por la mayor variedad genética de *Capsicum* que posee. Dentro de la gran variedad y tipos de chile, esta el chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P.) uno de los mas picosos, ocupando el segundo lugar después del habanero. En México se cultiva en huertos familiares y superficies menores a 5 ha, ubicados en regiones de clima templado con altitudes de 1700 a 2400 msnm (Díaz 1957).

Entre las enfermedades más importantes del cultivo de chile se encuentran las causadas por patógenos de la raíz que inducen "la marchitez o tristeza del chile" causada por *Phytophthora capsici* Leonian, la cual afecta de forma grave a los cultivos de chile, debido a que causa enfermedad en plántulas (Redondo 1983). Siendo las épocas más sensibles, el transplante y la fructificación. Otros hongos asociados a la marchitez son: *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, debido a la similitud en los daños, por lo cual no esta bien definida su distribución (SAGARPA, 2002). El control químico hasta la fecha es el método más utilizado para el combate de estas enfermedades (De la Garza, 1996).

La problemática de la utilización inadecuada de los fungicidas y fumigantes, es que generan resistencia en los hongos, contaminación ambiental y toxicidad, lo cual ha motivado la búsqueda de otros métodos efectivos y no perjudiciales para combatir los patógenos de plantas. La mayoría de los fungicidas utilizados a principios de los años setentas se caracterizaban porque su forma de acción era de contacto y por esta razón únicamente se aplicaban en forma preventiva, (Pérez-Moreno *et al.*, 2002). Desafortunadamente, el mal uso y desconocimiento de estrategias integrales de manejo trajeron consigo problemas de resistencia en diferentes partes del mundo, (M. Stefanova, 2002).

Por lo anterior y debido a que los fungicidas sistémicos pueden hacer que los patógenos generen resistencia, en la actualidad existen opciones diferentes de fungicidas biológicos que han dado resultados alternos. El uso de microorganismos antagónicos naturales o manipulados genéticamente para inhibir la habilidad de los patógenos de la raíz que causan enfermedades en las plantas, presentan ventajas económicas y ecológicas (inocuas) sobre muchos otros métodos de control.

Una respuesta positiva y concreta a la campaña mundial de limpieza del planeta es la utilización de microorganismos antagónicos competitivos para la protección de los cultivos de los patógenos fúngicos de las raíces de las plantas, en particular especies del género *Trichoderma*, al igual que algunas bacterias como *Bacillus subtilis* han merecido la atención máxima como agentes de biocontrol, teniendo así otras opciones y con ello se contribuye a aminorar el uso desmedido de productos sintéticos, (M. Stefanova, 2002).

En base a lo anterior, se realizó la presente investigación con los objetivos siguientes:

1. Determinar los agentes causales de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P).
- 2.- Conocer la patogenicidad de los hongos aislados de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*C. pubescens* R & P).

3.-Evaluar la eficiencia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* a dosis diferentes como agentes biocontroladores de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*C. pubescens* R & P).

4.-Determinar el efecto de la forma de aplicación de los agentes de biocontrol

5.- Conocer el comportamiento de los hongos formadores de micorrizas en el manejo de patógenos causantes de pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del cultivo de chile

El cultivo del chile se ha hecho universal, esta presente en casi todas las zonas templadas y cálidas del mundo (Nuez, 1996). Las investigaciones botánicas confirman el origen y domesticación del género *Capsicum* en el Nuevo Mundo, porque no existe evidencia de su presencia en otros continentes antes del descubrimiento de América. Según los etimólogos, tampoco hay referencias anteriores al siglo XVI en lenguas tan antiguas como el Sánscrito, Griego y Chino (Long, 1986).

2.2 Importancia económica mundial

El continente con la extensión mayor dedicada al cultivo de chile fue Asia, ya que ocupó más de la mitad del total de la superficie mundial en el 2002; los países que destacan en orden de importancia fueron; China, Turquía, Indonesia, Corea y Japón. El segundo lugar en superficie lo ocupó el continente Africano destacando Nigeria, Egipto, Argelia, Túnez y Ghana, y en América: México y Estados Unidos. En Europa los países principales productores fueron la ex Yugoslavia, España, Rumania, Bulgaria, Hungría e Italia (FAO 2003).

2.3 Importancia del chile en México

El chile es un cultivo tradicional y de importancia cultural en México ya que ha sido utilizado como alimento desde la época prehispánica. Es un elemento muy importante en la dieta del mexicano. Existen restos arqueológicos registrados de este cultivo en el Valle de Tehuacan, Puebla, con fechas que datan del 5, 000 y 7, 000 años a.C., que lo confirman como un ingrediente obligado de la comida mexicana desde hace miles de años (Long, 1986). México ocupó un lugar importante en la producción mundial, ya que solo fue superado por China en el 2002 (Galindo, A. J. 1962). En la última década (1992-2002), de acuerdo a los promedios de los datos proporcionados por la FAO (2003), la superficie dedicada al cultivo de chile en México se incremento en 82% y la producción en 137%. México fue uno de los principales abastecedores de chile a los mercados de

Estados Unidos, en la última década. Estados Unidos compró el 99.8% del volumen total de las exportaciones, principalmente en los meses de noviembre cuando las condiciones climáticas limitan la producción del cultivo en este país (FAO, 2003).

2.4 Origen y usos

El chile es originario de Sudamérica. Sus principales usos: el alimenticio, como condimento desde tiempos muy remotos. A pesar de la introducción de los condimentos europeos, el chile se emplea de preferencia por la mayoría de los habitantes, incluyendo la totalidad de la población campesina. Ornamental: Utilizado en diferentes tipos de adornos. Cultural: El chile se ha convertido junto con el maíz en el símbolo de México. Industria: cosmética, ya que se utiliza en la elaboración de shampoo y jabón (Zapata, *et al.*, 1992; Rico 1983).

2.5 Taxonomía

Capsicum deriva del griego: de Kapso (picar) y según otros de kapsakes (cápsula). El género pertenece a la familia de las solanáceas y la clasificación es la siguiente (Nuez, 1996):

División: Spermatophyta

Linea: Angiospermae

Clase A: Dicotyledones

Rama 2: Malvales-tubiflorae

Orden XXI: Solanaceae (Personatae)

Familia: Solanaceae

Genero: *Capsicum*

Especie: *C. pubescens*

2.6 Botánica y Fisiología

Es una planta con tendencia a ser anual pero también hay formas perennes. Tiene ramas rectas y simples en forma estrella y flores lilas en las axilas de las hojas. Las flores son sustituidas después por bayas (fruto) jugosas, estas son verdes al principio y después cambian a rojas, amarillas o moradas y contienen muchas semillas aplanadas en forma de riñón, blancas y con sabor picoso, (Thompson ,1997).

Se conocen muchas variedades y formas, algunas difíciles de describir desde el punto de vista botánico pero de un modo general se puede decir que se trata de plantas anuales o semiherbáceas, de hojas alternas y flores pequeñas blancas, verdosas o violáceas; el fruto es una baya por lo común alargada, cuya pulpa tiene un sabor más o menos picante. Hay también algunas que son subarborescentes vivaces y los frutos son variados en su forma, color y tamaño (Nuez-F. et al., 1996).

2.6.1 Análisis nutritivo

En el chile principalmente, se ha encontrado una sustancia llamada capsicina, que actúa como excitante de la piel de modo semejante a como lo hace la mostaza. Su análisis revela que por cada 100 gramos de porción comestible obtenemos las vitaminas: A (67.5 g), C (131 g) y E (0.8g), que son fuente importante de antioxidantes, (Zapata, *et al.*, 1992; Rico 1983).

2.7 Enfermedades

2.7.1 *Phytophthora capsici*. Leonina.

2.7.1.1 Antecedentes

El genero *Phytophthora* fue descrito por vez primera por Anton de Bary en 1876. Sin embargo, la especie fue reportada en nuevo México, Estados Unidos., en 1922 por Leonian, atacando cultivos de pimiento, En general, en México se calcula que el 40% de las plantas de chile mueren por esta enfermedad aproximadamente (Romero, 1993).

2.7.1.2 Hospedantes

El Oomiceto *Phytophthora capsici* es el agente causal de la enfermedad más universalmente conocida del chile (Ortega, 1990). Esta enfermedad, afecta de forma grave a los cultivos de chile, pudiendo causar enfermedad en plántulas e incluso, plantas adultas de otras solanáceas y cucurbitáceas (Zamora, 1996).

Originalmente se pensó que solo afectaba al chile, en la actualidad se sabe que también puede destruir campos enteros de zanahoria, tomate, berenjena, cucurbitáceas y últimamente en cacao y ejote en un tiempo muy corto, debido a su gran velocidad de crecimiento y abundante esporulación (Romero, 1993).

2.7.1.3 Sintomatología y daño

El hongo puede provocar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. La pudrición del cuello y la subsiguiente marchitez brusca son los síntomas más característicos. La primera manifestación de la enfermedad es la flacidez en las hojas, especialmente al medio día cuando la evapotranspiración alcanza su intensidad mayor, aunque por las mañanas se logra recuperar la turgencia, sin embargo cuando la enfermedad agudiza la marchitez es irreversible (García, 1990).

El hongo *P. capsici* no tiene preferencia por algún tejido, por lo que es capaz de infectar cualquier parte de la planta, sin importar la edad de la misma. En almácigos la enfermedad se presenta en manchones y se extiende rápidamente; el síntoma que se observa es el "Damping-off" o secadera de las plántulas de almacigo. La infección primaria se inicia a nivel del suelo, los tallos atacados presentan una mancha de color castaño rojizo que avanza hacia arriba y llega a cubrir todo el contorno del tallo; la parte invadida pierde turgencia, cae o queda erguida (Espinoza, 1999).

El daño se presenta en preemergencia y postemergencia; en el primer caso la semilla solo alcanza a germinar y la radícula se muestra de color café con muerte rápida, en el segundo la planta presenta flacidez progresiva hasta marchitarse por completo, apreciándose así en el cuello un estrangulamiento café oscuro que luego ocasiona la muerte. El estrangulamiento

por lo general se presenta después de la floración con una incidencia mayor que en preemergencia; los puntos dañados se colorean rápidamente y se arrugan sin que la planta cambie de coloración. Puede provocar atizonamiento de hojas y una pudrición hundida de frutos con un crecimiento blanco en el interior del fruto. El hongo penetra por el cuello de la planta, provoca una pudrición dura y ocasiona la marchitez de la planta, la cual es causada básicamente por una toxina que secreta el hongo y mata a las células por taponamiento de los haces vasculares (Mendoza, 1990).

En frutos también se han señalado ataques en postcosecha. El origen de estos ataques suelen ser infecciones no percibidas en los frutos en el momento del empaque. El transporte refrigerado usual de los frutos retrasa el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, los primeros síntomas sobre la superficie externa del pericarpio se manifestaron como manchas pequeñas, acuosas, que se agrandan con el tiempo. Sobre ellas se puede desarrollar un moho algodonoso blanco. Este moho también se puede producir exclusivamente en la parte interna del fruto (Nuez-F., *et al.*, 1996).

2.7.1.4 Morfología

La especie *Phytophthora capsici* pertenece a la familia Pythiaceae, al orden Pythiales y la clase oomycetes (Kirk, *et al.*, 2001).

Es un hongo heterotálico de micelio cenocítico, con abundantes ramificaciones lisas, e hinchadas y de colonia finamente radiada; esporangióforo simple o ramificado de forma robusta y gruesa con un hinchamiento cercano a la base del esporangio, el cual es ovoide y guarda la relación 1.7 de largo por ancho, de crecimiento indeterminado y simpodio simple, papila conspicua, desviada, frecuentemente con dos papilas, clamidosporas ausentes o raras; oogonio de esférico a subesférico, de paredes lisas; anteridios basales anfíginos de 2 a 21 micras de largo por 12 a 17 micras de ancho; oosporas generalmente apleróticas, esféricas a subesféricas con pared gruesa lisa, de un diámetro promedio de 31.5 micras, esféricas a subesféricas con pared gruesa a lisa, de un diámetro promedio de 31.5 micras (Romero, 1983).

2.7.1.5 Ciclo de vida

Habita el suelo de forma natural, sobreviviendo sobre y dentro de la semilla, otra formula de inóculo primario son las oosporas que son capaces de sobrevivir en el invierno (Galindo, 1962). La infección se puede presentar en la etapa de plántulas pero el problema principal se observa en la época de floración (Mendoza, 1990).

Se ha encontrado que el micelio y los esporangios de *P. capsici* sobreviven por menos de siete días en suelo seco y 62 en suelo húmedo; debido a que la mayoría de los oomycetos son acuáticos y por lo tanto muy susceptibles a la sequía (Ramírez, 1980).

2.7.1.6 Epidemiología

P. capsici puede sobrevivir en el suelo por medio de clamidosporas o sobre restos vegetales. Por ello, la práctica cultural de enterrar las plántulas enfermas no es recomendable. En efecto, el hongo, vive saprofiticamente sobre los restos descompuestos, con riegos sucesivos, produce esporangios y zoosporas que son distribuidas por el agua, las cuales difunden la enfermedad (Nuez-F, *et al.*, 1996).

Los factores bióticos que juegan un papel muy importante en el desarrollo epidémico de la enfermedad son: el inóculo primario, temperatura, luz, humedad ambiental y lluvias abundantes. Las condiciones favorables de temperatura se ubican entre 11 a 35° C con una óptima para el máximo desarrollo del patógeno de 26 a 28° C. Dicho factor acompañado de una humedad relativa alta en el suelo, se puede tener una infestación alta del patógeno sobre los cultivares de chile. El desarrollo rápido del hongo puede ser debido a la cantidad de inóculo existente, aunado a un mal drenaje del suelo. Sin embargo, en algunas áreas se ha observado la pérdida total del cultivo cuando la temperatura nocturna es baja (14-18°C) y la precipitación alta (Mendoza, 1993).

2.7.1.7 Manejo de la enfermedad

La rotación de cultivos ayuda a prevenir esta enfermedad evitando la siembra sucesiva de hospedantes susceptibles de *P. capsici* como son: jitomate, calabaza y pepino, eliminando cualquier planta que muestre marchitez, uso de semillas sanas, elaborando surcos altos,

evitando así que el agua de riego o lluvia nunca llegue a la base de las plantas, así como, procurando que el terreno donde se establezca el cultivo este nivelado y tenga buen drenaje (Galindo, 1962; Garcia Morató, 1996).

El manejo químico es eficiente para la prevención de la enfermedad salvo en casos de infestación extrema del suelo. Los fungicidas que comúnmente se han empleado con éxito para el control de *P. capsici* son Ridomil Gold 4E (Metalaxil 48%), Tokat 240 (Metalaxil 25.3), Aliette (Fosetil -Al) y Previcur N (Propamocarb clorhidratado) (Perez -Moreno., 1990; González-Villalobos, 1997; Fernández-Herrera *et al* 2005; Galván- Lamas *et al.*, 2005).

2.7.2 *Rhizoctonia solani*

2.7.2.1 Antecedentes

En el genero *Rhizoctonia*, la especie *R. solani* es la más importante y fue descrita en 1815 por De Candolle. En 1853 Kuhn describió a esta especie distribuida en todo el mundo, donde la humedad y la temperatura son adecuadas además ataca a una gran variedad de plantas silvestres y cultivadas. El concepto de la especie ha sido modificado en reiteradas oportunidades a causa de la gran variabilidad morfológica que presentan los hongos incluidos en este grupo (León, 1978).

2.7.2 .2 Hospedantes

Rhizoctonia solani Kuhn. Es un habitante del suelo con capacidad patogénica tan extraordinaria que se encuentra en plantas de todo tipo, ataca un gran numero de especies tales como: malas hierbas, árboles forestales y casi cualquier cultivo agrícola como: soya, frijol, chile, chícharo, espinaca, camote, papa, tomate, zanahoria, apio, rábano, remolacha azucarera, bulbo de tulipán, y nabo (Mendoza, 1993).

2.7.2 .3 Sintomatología y daño

En condiciones favorables ataca las semillas antes de que germinen, en otros casos la semilla es atacada después de germinar, también daña plantas y tejidos suculentos. En plantas grandes se ha encontrado causando marchitez con amarillamiento por la pudrición del cuello y raíz (Mendoza, 1990).

El hongo *R. solani* se identifica por causar lesiones húmedas y hundidas de tamaño variable y con una coloración café canela a café rojizo, las áreas oscuras o necróticas son más evidentes cuando el tejido atacado es grande, si las condiciones son favorables, las infecciones se extienden y adquieren un aspecto hundido y pueden llegar a cubrir la base del tallo y destruir raíces, como consecuencia se debilita la planta o causa un acentuado amarillamiento. En plantas de más de 15 cm. de altura ocasiona marchitez y en las raíces se observan áreas necróticas (Agrios, 1999).

2.7.2 .4 Morfología

Este patógeno se incluye dentro del orden *Mycelia sterilia* debido a que durante muchos años se pensó que era incapaz de producir algún tipo de esporas ya sea sexual o asexual. Actualmente se sabe que produce basidiosporas en su fase sexual, siendo esta especie un Basidiomyceto, El estado imperfecto (micelio y esclerocios), es usualmente citado como *Rhizoctonia solani*. Kuhn. El nombre para el estado perfecto o basidial es *Thanatephorus cucumeris* Frank Donk. Las esporas del hongo solo se forman durante condiciones especiales de laboratorio y son extremadamente raras en la naturaleza (Agrios, 1999).

El hongo no presenta fructificaciones asexuales; los esclerocios son de color café a negro, de forma variable y frecuentemente pequeños pero no muy compactos y formados por filamentos miceliales y ramas saliendo aproximadamente en ángulo recto (Romero,1988), además presenta constricciones muy marcadas en las septas y la ramificación se origina subterminalmente a la septa (Mendoza, 1990).

2.7.2 .5 Ciclo de vida

R. solani es un habitante natural del suelo donde persiste como hifa o esclerocio. Su diseminación es por el agua, tejidos vegetales y el hombre, logra vivir hasta por 5 años, al germinar el crecimiento hifal penetra directamente al tejido, luego causa la muerte por enzimas que ablandan el tejido que le servirá como alimento (De la Garza, 1996).

Se ha encontrado que la capacidad de infección del hongo se ve afectada por diferentes factores, entre los que destacan, la cantidad de inoculo presente en el suelo, temperatura, y humedad principalmente (Hooker, 1981).

2.7.2 .6 Epidemiología

Se favorece su desarrollo con un exceso de humedad en el suelo y una temperatura de 15 ° C, sin embargo para la germinación del esclerocio es necesario una humedad alta y una temperatura de 21 a 25 °C (Mendoza, 1990). También se ha visto la incidencia en áreas tropicales con suelo mal drenado, desconociéndose factores de resistencia vertical, pero si se sabe que en plantas con más de 2 o 3 hojas que han sido afectadas, no presentaran susceptibilidad posterior (Butler, 1955).

2.7.2 .7 Grupos de anastomosis.

Como consecuencia de la cantidad enorme de especies descritas a través del análisis de características miceliales, aspectos que por su variabilidad son poco confiables, comenzaron a surgir estudios sustentados que muchos hongos identificados como *R. solani* correspondieron a otros hongos, cuya morfología hifal guarda estrecha similitud con la que posee la especie referida (Nuez 1996).

Las hifas de *Rhizoctonia* son capaces de presentar anastomosis (fusión hifal), y los aislamientos han sido clasificados de acuerdo a la compatibilidad entre ellos en grupos de anastomosis denominados AGs (Hooker, 1981).

2.7.3 *Fusarium oxysporum* (Atkinson)

2.7.3.1 Antecedentes.

El genero *Fusarium* es uno de los más importantes económicamente, ya incluye muchas especies patogénicas, las cuales causan enfermedades en un gran rango de plantas. Hay especies las cuales producen toxinas que afectan el desarrollo de las plantas (Nelson., 1981).

Fusarium oxysporum es una de las especies más variables dentro del género, estas incluyen poblaciones las cuales causan marchitamiento vascular, afectando a la raíz, la corona, tubérculos, cormos y bulbos (Beckman 1987). Sin duda alguna esta especie de *Fusarium* sp. es la más ampliamente distribuida y perjudicial en la agricultura, se sabe que *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Snyder es la forma especial que mas ataca al cultivo de chile. Este se observo primero observado en Nuevo México durante 1918, después se encontró en América del Sur y Europa (Romero, 1988).

2.7.3.2 Hospedantes.

Tiene un gran número de hospedantes entre los que se encuentra: jitomate, papa, frijol, chícharo, cebolla, col, rábano, pepino, chile, melón, sandia, plátano, café, tabaco, gladiolo, algodón y lino (Romero, 1988).

2.7.3.3 Sintomatología

Es común un ataque en el tejido vascular, pero sin embargo, no ocasiona pérdidas considerables al menos que la temperatura del suelo y aire aumenten durante gran parte de la estación (Agrios, 1991). En cuanto a los síntomas es común una caída de hojas inferiores, así mismo en los tejidos internos de la raíz y el tallo se observa una coloración pardo oscura que corresponde a las lesiones externas que estrangulan al tallo gradualmente (Reche, 1991). También se reporta un doblado de las hojas inferiores debido a una pudrición húmeda de la raíz, la cual termina con un desprendimiento de la epidermis y una excreción de goma. También se ha visto una clorosis intervenal y muerte en plántulas (Cepeda, 1984).

2.7.3.4 Morfología.

El patógeno *F. oxysporum* produce micelio entre rosado y blanco a manudo con matiz purpúreo o violeta. Presenta una gran cantidad de microconidios pequeños e hialinos producidos en conidióforos pequeños, presentan forma oval-elipsoide, erectas o curvadas; clamidosporas terminales o intercalares con medidas de 6 a 11 micras de diámetro, tiene pared engrosada que puede ser lisa o rugosa, son abundantes y se generan de forma radial o intercalar, normalmente son solitarias pero en ocasiones se forman en pares o en cadenas; macroconidios finos con pared delgada, células apicales terminadas en curva, con longitud máxima de 18 a 56 micras por 2.7 a 6 micras de ancho y producidos en conidióforos alargados dentro de un esporodoquio, (Romero, 1993).

2.7.3.5 Ciclo de vida

El ciclo vida de este hongo comienza cuando las raíces de plántulas sensibles se ponen en contacto con hifas desarrolladas a partir de clamidosporas. Ahí el hongo penetra por aberturas naturales, heridas de laboreo o por vía directa en tejidos tiernos, una vez dentro invade las células y empieza a causar marchitez, luego crece hacia la región del xilema, después se desarrolló en las traqueideas de los vasos, posteriormente invade el parénquima, donde segrega enzimas pectolíticas que destruyen el xilema parcialmente, vasos leñosos y traqueidas. Por ultimo produce conidios y los libera para continuar nuevamente el ciclo (Agrios, 1991).

2.7.3.6 Epidemiología

El inicio de la enfermedad se ve favorecido con elevadas humedades relativas y temperaturas altas del suelo, mismas que son necesarias para la germinación de los conidios y el crecimiento del micelio subsiguiente (Mendoza, 1999).

2.7.3.7 Manejo de la enfermedad

Por lo que recomienda el uso de las estrategias siguientes: Utilización de plántulas y sustratos sanos, no realizar los trasplantes profundos, buen control del riego, evitando encharcamientos y retirando los goteros de las plantas, evitar regar con agua portadora de la enfermedad y en su caso, tratarla con productos adecuados, limpieza de embalses y canales

de riego, una medida buena es cubrirlos y utilizar conducciones cerradas para evitar que entre suciedad en ellos, en parcelas infectadas conviene llevar a cabo desinfecciones para el cultivo siguiente, siendo una opción buena la solarización, (Stefanova, 1995).

2.8 Biocontroladores

En lo que se refiere a Biocontroladores, su desarrollo comercial ha recibido un incremento muy significativo en los últimos 5 años, en primer lugar por que se han logrado grandes avances en el aislamiento y caracterización de cepas nuevas de microorganismos que poseen propiedades fungicidas. El proceso fue inicialmente lento por las propiedades inherentes de las cepas naturales, las cuales requerían del hospedante para poder propagarse. Con el desarrollo de herramientas nuevas en la industria de la biología molecular y mas específicamente en el área de tecnologías de fermentación, este obstáculo se ha salvado logrando una relación mejor costo beneficio para las empresas que se dedican al desarrollo de estos productos (Stefanova, 2002).

Los biofungicidas se han clasificado de manera comercial en tres categorías: 1) Aquellos que controlan enfermedades de la raíz, 2) los que controlan enfermedades del follaje y 3) aquellos que se utilizan en los tratamientos poscosecha y almacén (Hofstein, 1998).

Todos estos tipos de biofungicidas han sido extensamente documentados desde hace varias décadas, sin embargo pocos de ellos se han logrado registrar y de estos sólo unos cuantos se han colocado en el mercado con éxito (Hofstein, 1998). Entre ellos podemos mencionar a: *Burkholderia cepacia* (Deny™, CCT, Carlsbad, CA), *Agrobacterium radiobacter* (Nogall™, Bio Care Technology), *Bacillus subtilis* (Kodiak HB™ y Epic™, Gustafon) y *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop™, Kemira OY) (Hebbar, 1998).

Como antecedentes del desarrollo de los biofungicidas tenemos que Frear en 1955, hace alusión en su libro "Chemistry of the pesticides", de las propiedades fungistáticas de la viridina, una sustancia producida por *Trichoderma viridae*. Otro antibiótico producido por *T. viridae* es la gliotoxina al cual se le encontró características fungicidas, así también podemos mencionar a la antymicina, clavicina y la estreptomycinina.

2.8.1 *Bacillus subtilis*

Chazaro (1956), realizó uno de los primeros estudios en México sobre las amilasas producidas por una cepa de *Bacillus* aislada de pulque (bebida obtenida del maguey), reclasificando a la bacteria como *Bacillus subtilis*, y mencionando la importancia que esta bacteria podrían tener en la industria de la fermentación.

Aun no se ha demostrado que alguna bacteria ataque y parasite directamente a hongos, pero en el caso de *Bacillus subtilis*, al parecer es antagónica a ciertos hongos fitopatógenos que habitan en el suelo, a los cuales destruye mediante secreciones enzimáticas o tóxicas (Agrios, 1991).

2.8.1.1 Características

Bacillus subtilis es una bacteria móvil, gram positiva, formadora de esporas, en forma de bastón, que se encuentra comúnmente en el suelo (Olsen, 1967). En el núcleo de las endoesporas se sintetiza ácido dipicolínico y se incorporan iones de calcio, lo que le da la capacidad de soportar elevadas temperaturas, desecación, radiación y la acción de ácidos y desinfectantes químicos (Brock *et al.*, 1987). Su tolerancia termal alta asegura su supervivencia después de tratamientos al suelo con vapor por otro lado se ha encontrado que estimula el crecimiento de plántulas de algunos cultivos ya que es, favorecida, por suelos ricos en materia orgánica y con contenidos de nitrógeno altos, que la estimulan a producir antibióticos poco solubles en agua, lo cual garantiza un control permanente en el suelo (Olsen, 1967; Utkhede, 1983; Baker, 1983; Pusey, 1988).

El mecanismo de actividad de *Bacillus subtilis* consiste en la producción de una sustancia que inhibe la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas, también ataca los tubos germinativos; los deforma (Baker, 1983). Otras sustancias como las Bacitracinas son formadas y éstas bloquean la formación de la pared celular. Entre otras propiedades destaca la habilidad de degradar polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos por acción de enzimas hidrofílicas extracelulares (Brock *et al.*, 1987).

Muchas de las sustancias contra los hongos que produce *B. subtilis* son polipéptidos el cual es inhibidor y contiene 95% de proteínas y 5% de carbohidratos (Baker, 1983).

La mayoría de las evaluaciones que se han realizado con *Bacillus subtilis* han sido para controlar hongos en el suelo, no obstante las pocas evaluaciones que se han hecho contra enfermedades del follaje, han demostrado buenos resultados (Muiño, 1994). Fucikovsky *et al.*, (1989), encontraron que dos aislamientos de *bacillus spp* a nivel de laboratorio, son antagonistas a hongos de importancia económica tales como: *Phytophthora capsici*, *P. citricola*, *P.cinnamomi*, *Pythium sp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina*. Por su parte Baker (1983), por su parte mencionó que un aislamiento de *B. subtilis* APPL-1, fue el tratamiento mejor, ya que mostró la más grande reducción (95 %) en el número de pústulas cuando este se aplicó a las plantas inoculadas con *Uromyces phaseoli* var. *Típica*, en frijol bajo invernadero.

Filipi *et al.* (1985), evaluaron la actividad de 160 cepas bacterianas, de las cuales la cepa M51, correspondiente a *Bacillus subtilis*, ejerció control durante dos meses contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *F. roseum* en clavel.

Pusey (1988) utilizó *B. subtilis* como tratamiento contra la pudrición morena del durazno *Monilia fruticola*, en líneas de empaque y empaques caseros, observando resultados buenos. Aguilar (1992), evaluó una cepa de *Bacillus subtilis* para el control *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp* y *Ramularia tulasnei* Sacc., en fresa y concluyó que esta tuvo una eficacia similar con el testigo comercial (iprodiona) el cual mostró un control bueno (76%) de estos patógenos.

Badel y Kelemu (1994) mencionaron que la presencia de *Bacillus subtilis* en medios de cultivo redujeron de manera significativa del crecimiento micelial, la germinación y producción de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*, así como una preparación (filtrados) de antibióticos producidos por esta bacteria mostró efectos fungicidas en contra de *Thanatephorus cucumeris*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemathianum*, *Phytophthora parasitica* y *Pyricularia oryzae*. El efecto inhibitorio de estos filtrados de medios de cultivos

fue comparado con un tratamiento con Benomyl, y se observó mejores resultados con *B. subtilis* (70%).

Robles (1997), encontró que el tratamiento de captan 400 + Kodiak (una cepa de *Bacillus subtilis*) fue el mejor para la germinación de plantas, sin embargo no encontró diferencias marcadas con el testigo en el control de *Fusarium* spp., por lo que argumentó que posiblemente la bacteria no se pudo establecer normalmente.

Tejeda et al., (1998), mencionaron que debido a la producción de antibióticos, la bacteria *Bacillus subtilis*, se ha utilizado para el control de muchos patógenos de la raíz, como *Phytophthora* sp y *F. oxysporum*. *B. subtilis* se ha encontrado que tiene efecto antagónico contra *Rhizoctonia solani* por lisis del micelio, y que el grado de protección varía con el suelo y grupos de hongo presentes (Olsen y Baker, 1998).

PHC® Healthy Star 12-16-12 es un biofertilizante soluble en agua, está formulado para mejorar la salud nutricional, vigor, color, de las plantas, vegetales y frutas. Contiene una calidad alta de combinación de elementos solubles con extractos de levaduras, maltodextrina, biofertilizantes orgánicos y bacterias fijadoras de nitrógeno y además antagónicas a algunos hongos patógenos del suelo como son: *Colletotrichum* sp, *Phytophthora* sp y *F. oxysporum*. PHC® Healthy Star 12-16-12 contiene *Bacillus subtilis* (1.65x10⁹ufc/Kg), *B. Lincheformis* (1.65x10⁹ufc/Kg), *B. megaterium* (1.65x10⁹ufc/Kg), *B. polymyxa* (1.65x10⁹ufc/Kg), *B. thuringiensis* (1.65x10⁹ufc/Kg), y *Paenibacillus azotofixans* (1.65x10⁹ufc/Kg), solubilizadoras de fósforo y promotores de crecimiento derivadas de Citokinas del extracto de algas marinas. Además contiene aminoácidos y vitaminas, derivadas de ingredientes como las algas, levaduras y azúcares. Su método de aplicación es disolver 0.5 Kg en 100 litros de agua de PHC® Healthy Star 12-16-12 y se drena la zona de la raíz de la planta. Para mejores resultados se recomienda aplicar 2 veces al mes.

2.8.2 *Trichoderma harzianum*

En el caso de hongos, especies de *Trichoderma* son antagonistas muy conocidos, particularmente en el suelo, además de ser un organismo que se caracteriza por su rápido crecimiento, involucra competencia, antibiosis, así como interacciones hiperparasitarias, lo cual hace a este género atractivo para su uso como agente de biocontrol (Blakeman, 1982; Bisset, 1984).

El género *Trichoderma* incluye un conjunto de especies con variadas características bioquímicas y moleculares. Hasta la fecha se han descrito varias especies (*T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. anhamatum*, *T. atroviridae* y *T. asperellum*) que poseen actividad antifúngica sobre un amplio espectro de fitopatógenos. La actividad antagónica de *Trichoderma* se lleva a cabo, entre otros factores, gracias a las enzimas líticas que excretan al medio. Las enzimas líticas β -1,6 glucanasa, β -1,4 glucanasa, β -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa expresadas por *Trichodermas* son inducibles, tienen una gran importancia en el sustrato presente en el medio de inducción en el que son producidas (Castillejo *et al.*, 2000).

Trichoderma harzianum es un agente biológico controlador de fitopatógenos que se formula como polvo humectable, se usa ampliamente contra hongos tales como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Plasmopara cubensis*, *Pseudoperonospora* sp, *Monilia* sp, entre otros (Araya, 2000). No es tóxico para animales, ni humanos, no contamina el agua, ni es tóxico a peces, se puede aplicar a las semillas (Barrón, 2002).

El hongo *T. harzianum* es también un habitante del suelo tiende a poblar las raíces, por tanto compete con fitopatógenos por exudados y espacio, por lo cual reduce las posibilidades de desarrollo del patógeno, es decir entra en contacto con el suelo y sus hifas comienzan a crecer formando ramificaciones que se dirigen hasta el micelio del hongo perjudicial (Stefanova, 2002).

Harman (1996), afirmó que los fungicidas a base de este hongo aplicados en conjunto con otros fungicidas químicos tiene una relación favorable pues los sintéticos ofrecen protección a corto plazo, mientras que *T. harzianum* funciona a largo plazo y este mismo autor hace

énfasis en que *T. harzianum* se mezcla en tanque con iprodiona, el primero actúa como un excelente sinergista para controlar a *Botrytis cinerea* en uva.

El genero *Trichoderma* en general, es considerado como uno de los agentes de biocontrol más promisorios debido a sus propiedades antagónicas a los fitopatógenos y puede localizarse en la rizósfera y así proteger a las raíces pero también se ha observado su efectividad en enfermedades foliares en un rango amplio de cultivos, así como en pudriciones postcosecha de algunos frutos. Sin embargo, se sabe que en el follaje no controla muy bien debido quizá a que es un habitante natural del suelo y por ello se adapte totalmente a sobrevivir en la parte aérea de las plantas. Aun con esto, el éxito del biocontrol se ha incrementado marcadamente en los últimos años para patógenos que infectan flores y hojas, tal es el caso de *Colletotrichum gloosporoides*, (Alabouvette, C. 1998).

A diferencia de los pesticidas, "*Trichoderma*" no deja residuos en la tierra y actúa como un habitante natural del suelo (respetando el sabor natural de cultivos comestibles). "*Trichoderma*" subsiste en cualquier territorio, pero antes se tiene que adaptar. Se adapta perfectamente en los suelos arcillosos y arenosos (Neyra, 1992).

En un ensayo de frijol, Tu, (1997) indico que *Trichoderma viride*, *Gliocadiumn roseum* y *Bacillus subtilis* en comparación con Benomylo para el control del moho blanco en frijol, en el cuarto año, la eficacia en el control de *T. viride* era eficaz y comparable con el de Benomylo.

Liu (1965) y Richard (1983), aislaron y evaluaron los microorganismos del suelo y encontraron a *Trichoderma viridae* como el más abundante. Al tratar la semilla de remolacha con esporas de este hongo, dio buena protección a plántulas contra ahogamiento preemegente causada por *Pythium* sp.

PHC T-22® es un fungicida biológico preventivo para el control de enfermedades de un gran número de especies vegetales. El ingrediente activo es un microorganismo benéfico *Thichoderma harzianum* Cepa T-22 (KRL-AG2). Al ser aplicado a las semillas u otro material

de propagación, así como al suelo y al follaje, se desarrolla rápidamente, dando protección a la raíz contra patógenos como *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Cylindrocladium* y *Thielaviopsis*. Su modo de acción de PHC T-22® es inhibir el crecimiento de hongos patógenos del suelo y el follaje mediante procesos de competencia natural formando una coraza alrededor de la raíz de la planta y procesos de micoparasitismo necrotrófico de hongos parásitos. Su método de aplicación es en aplicaciones al suelo se puede incorporar al sustrato o mezcla de siembra comercial antes de llenar los contenedores y efectuar la siembra o transplante. Para activar el producto al sistema de riego. En una dosis de 0.6-0.9 Kg/m³, coloniza la raíz en un lapso de 24-72 horas formando un escudo protector contra el ataque de hongos patógenos, en un periodo de 8 a 12 semanas. Se recomienda hacer dos o tres aplicaciones adicionales a lo largo del ciclo del cultivo a intervalos de 60 a 45 días, reforzando su efecto. A la segunda y tercera dosis se recomienda reducir la dosis al 50% de la dosis inicial (PHC 2005).

2.8.3 Hongos formadores de micorrizas

Los hongos formadores de micorrizas son el grupo más importante para la horticultura, dentro de su grupo, existen alrededor de 150 especies pertenecientes a los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* (*Glomaceae*), *Acaulospora* y *Entrophosphora* (*Acaulosporaceae*), *Gigaspora* y *Scutellospora* (*Gigasporaceae*), clasificadas dentro del orden Glomales (clase zigomycetes) son hongos biótrophicos conocidos como Micorrizas Vesículo Arbuscular (MVA), que establecen relaciones simbióticas obligadas con el sistema radical de la mayoría de las plantas vasculares (Gianinnazi, 1991; Morton y Beny, 1990; Walter 1992).

Los hongos formadores de micorrizas se adicionan a la raíz produciendo una planta más sana, debido a que el micelio del hongo consume los exudados de las raíces, compitiendo con los patógenos no permitiéndoles obtener alimento. Cada punto de unión con la raíz libera antibióticos y fungistáticos que recubren su superficie protegiéndola de hongos y bacterias; libera hormonas de crecimiento (IAA, IPA, IBA, NAA), favoreciendo el enraizamiento de plantas e incrementando la superficie de acción de las raíces. Los hongos formadores de micorrizas producen mayor desarrollo de la raíz, parte aérea, resistencia a condiciones de sequía y suelos pobres de nutrientes pudiendo llegar a ser el hongo

formador de micorriza fuente de elementos esenciales como N y P. También se ha observado disminución en la mortandad por trasplante, aumento en el desarrollo una vez germinada la semilla y un mayor éxito en campo ya que la planta se encontrará con mas vigor para soportar el cambio entre el medio favorable del vivero al campo (Regés, 2000).

La colonización de las raíces por hongos formadores de micorrizas arbusculares ha demostrado proteger o reducir la extensión de las enfermedades producidas por los patógenos de la raíz, principalmente hongos y nemátodos (Azcon y Barea, 1992).

Los hongos formadores de micorrizas se pueden aplicar diluídos en agua de riego al momento de la siembra, cuando se prepara el sustrato, en el momento del repique de la plántula, al momento de llevarlo a campo, y hasta un mes y medio antes de repicar si es a raíz desnuda. Se puede emplear en condiciones muy variables, tanto de temperatura como de pH y los agroquímicos y fungicidas de uso normal en la agricultura no afectan su rendimientos (Regés, 2000).

El cultivo del chile a demostrado respuesta a la inoculación con hongos formadores de micorrizas. Bagyraj y Sreeramulu (1982) inocularon chile a la siembra en el almácigo, sin tratar al suelo, seis semanas después lo transplantaron, observando que la inoculación puede sustituir el 50% de la fertilización fosfatada, midiendo como respuesta el peso seco de frutos y contenido de ácido ascórbico entre otras variables además induce una proporción mayor de recursos hacia la fructificación.

PHC® Endo-Rhyza Mini Plug, es un inoculante de hongos formadores de micorrizas, vesículo arbusculares (VAM) adecuado para una gran variedad de especies, desde forestales y frutales hasta hortícolas como cebolla, chile, tomate, berenjena, pepino sandía y melón. El producto esta formulado para inocular sustratos comerciales utilizados en sistemas de propagación masiva de plantas en contenedor de cavidades múltiples (Charola o tubete) de bajo volumen. Tiene beneficios como: Promover la formación de raíces alimenticias y la asimilación de agua e induce la tolerancia a la sequía, Incrementa la disponibilidad de nutrientes minerales, aumenta la supervivencia al transplantar y desarrollo en suelos pobres y

ácidos, altas temperaturas y en presencia de metales tóxicos y bajos en materia orgánica e incrementa la resistencia a enfermedades de la raíz y nematodos. Su modo de acción se da cuando al colonizar la rizosfera los hongos formadores de micorrizas penetran las raíces jóvenes de la plántula, formando vesículas y arbuscúlos en el interior de las células de la endodermis, los cuales posteriormente dan lugar a un abundante sistema radical, proporcionando a la plántula una mayor resistencia al estrés hídrico y nutricional así como a microorganismos patógenos del suelo y nematodos, así como aumento de la productividad y rendimiento (PHC 2005).

Cada kg de PHC® Mini Plug contiene 635,000 esporas de cepas seleccionadas de cuatro diferentes especies de hongos micorrizicos (*Entrophospora colombiana* 158,750 esporas, *Glomus intraradices* 158,750 esporas, *G. etunicatum* 158,750 esporas, *G. clarum* 158,750 esporas y Formononetrina 1%), la formononetrina es un bioestimulante natural de hongos VAM. Todas las esporas están libres de patógenos y certificadas mediante el registro de su código genético (ADN). El método de aplicación de PHC® Mini Plug está formulado para inocular en los estadios tempranos del crecimiento de la plántula, por lo que debe mezclarse bien en el sustrato antes de colocar la semilla. La dosis recomendada para utilizarse en sistema de producción de transplantes (charola de 200 cavidades) de acuerdo al tipo de cultivo en este caso Chile es de 1.5g por cada charola. El material inerte utilizado en su formulación es vermiculita, la cual facilita su aplicación al sustrato de siembra (PHC 2005).

3. LITERATURA CITADA

Agrios, G.N. 1991. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. pp 428-432.

Aguilar, C.C. 1992. Control químico del moho gris (*Botrytis cinerea*), antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides*) y la peca de la hoja (*Rumularia tulasnei*) en fresa. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 53p.

Alabouvette, C. 1998. Joint action of microbials for disease control. In: Hall, R.F and Meen, J.J. (Eds). Biopesticides, use and delivery. Human press. New Jersey. USA. pp. 117-135. 625.

Araya, G. J. 2000. Programa de Leprosis de los cítricos. Universidad de Costa Rica. pp. 56-58.

Azcon A., C. y M. Barea J. 1996. Interacciones de las micorizas arbusculares con microorganismos de la rizosfera en micorizas; recurso biológico del suelo. Guerrero F., E. (Ed) Bogota; Colombia pp. 46-69.

Bagyaraj D.J. y K.R. Sreeramulu 1982. Preinoculation with *Va* micorriza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizar. Plant and soil 69:375-381.

Baker, C.J. 1983. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant diseases. 69: pp 770-772.

Barron, R. M. 2002. Sensibilidad in vitro del Agente causal de la antracnosis de los cítricos, *Colletotrichum gloesporoides*. Tesis profesional. Dpto. Parasitología agrícola Chapingo México 58p.

Becman, C.H. (1987). The nature of kilt diseases of plants. APS Prees, Monesota. 312p.

Bedel, J. And Kelemu, S. 1995. In vitro inhibition of *Colletotrichum gloesporoides* penz and other pytopathogenic fungi by culture filtrates of *Bacillus subtilis*. Fitopatología Colombiana. 145p.

Beker, C. J. Stavely. J. R. Thomas, C. A. and Mac Fall. J.S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* o *Uromy phaselices* and development of rust pustules on bean leves. Phytopatology 73: pp.1148-1152.

Blakeman, J.P. and L. Fokkema. 1982. Potential for Biological Control of Plant disease on the Phylloplane. Ann. Rev. Phytopathol. 20:167-192.

Blutler, S.E. J. 1955. Plant Patology. Mc Millan and Company limited. London. 215p

Brock, T.D; D.W. Smith and M.T. Madigan. 1987. Microbiología 4a edición. Prentice Hall. Hispanoamericana S.A. 906 p.

Castillejo M. A., P. Santorum, E. Monte y M. Garcia R. 2000. Influencia de los nutrientes en la expresión de enzimas líticas por cepas de *Trichoderma* utilizadas como agentes de biocontrol. In: X Congreso Sociedad española de Fitopatología: Valencia, Esp. 3-6 de Octubre. 69p.

Cepeda S. M. 1984. Revisión bibliográfica de las enfermedades causadas por *Fusarium* sp. Dpto. de Parasitología Agrícola, UAAAN. Saltillo, Coahuila. pp. 72-74.

Chazaro, G.M. 1956. Estudio de las amilasas de una cepa de Marburg de *Bacillus subtilis* aislada en pulque. Tesis profesional. IPN. México, D.F. pp.38-41.

De la Garza, G.J.L. 1996. Fitopatología general. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, N.L. 98p.

Díaz, P.A. 1957. El cultivo del chile. Escuela nacional de Agricultura. Chapingo, México 53p.

Espinoza, L.L. (1999). Etiología de la pudrición de Raíz y cuello del chile. Tesis de Licenciatura. UACH, Parasitología Agrícola. Chapingo México. pp.22-25.

FAO (2002) Yearbook of production. Roma.

Filippi, C.G. 1985. Efecto antagínista di batteri terricoli su *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi. Estratto da: L'agricoltura Italiana. Paccini editore. Pisa Italia. 115p.

Frear, D.E.H. 1995. Chemistry of the pesticides. D.Van Nostrand Company.N.Y.USA. 200 p.

Fucikovsky, Z.L.;Luna;C.Lopez. 1989. Bacterial antagonist to *Pseudomonas solanacearum* in potatoes and some others plant patógenos. Proc. /t hint. Conf. Plant Pathogens Bacteria. Budapest, Hungary. Z. Klement (Ed.). pp. 201-206.

Galindo, A. J. 1962. Marchitez de las plantas de chile causado por *Phytophthora capsici* L. Revista de fitopatología Mexicana 17 (1): 122-123.

García, E. 1990. Regulación fitosanitario de productos bioracionales. In: memoria XXVII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Uruapan, Mich.

García B.J.I. 1990. Control químico de la Marchitez del chile causado por *Phytophthora capsici* L. Revista de fitopatología Mexicana 15(1): 81-84.

Giaaninazzi, S.1991. Vesicular-arbuscular (endo micorrizas:cellular, biochemical and genetic aspects. Agric. Ecosystems Env.35:105-119.

Hebbar,K.P. 1998. Biological control of seedling diseases. In : Hall. R.F. and Meen, J.J. (Eds). Biposticides, use and delivery. Human press. New Yersey. USA. Pp. 103-116 625.

Heungens, K., and Parke, J.L. 2001. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology* 91:383-391.

Hofstein, R. 1998. commercial development of biofungicide. In: Hall, R.F. and Meen, J.J. (Eds). *Biopesticides, use and delivery*. Human press. New Jersey. USA. pp. 77-102.

Hooker, W.J. 1981 *Compendium of potato diseases*. American Phytopatology Society. USA.

Klotz, L.V., Nelson, P.E., & Toussoun, T.A. (1988). A medium for enhancement of clamydospore formation in *Fusarium* species. *Mycologia*: 15:108-109.

Leon, G.H. 1978. *Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa SARHCIAPAN, Culiacán Sin.* 213p.

Liu, S.Y.; K.V. Edwar. 1965. Control of *Phytium* infection in table beet seedlings by antagonist microorganisms. *Phytopathology* 55:986-989.

Long-Solis, J. 1986). *Capsicum y cultura, la historia del chilli*. Fondo de Cultura económica. México. 22p

Mendoza, Z. C. 1990. *Diagnostico de enfermedades fungosas*. UACH. Depto. De Parasitología Agrícola Chapingo, México. pp 35-39

Mendoza, Z. C. 1996. *Enfermedades fungosas de las hortalizas*. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Méx. 85p.

Mendoza, Z. C. 1999. *Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa*. In. *Hortalizas; plagas y enfermedades*. Anaya, R.S. y Romero, N.J. (Eds). Editorial Trillas, México. pp 32-34.

Montealegre, J. 2000 Utilization of bioantagonist microorganisms to biocontrol of *R. solani* on tomato. *Fac. de Agronomía, Univ. Católica Valparaíso-Chile*. 64p.

Morales, H. L. 2000. Rango de hospedantes de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, aislado de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ram). 52p.

Muñoz, B., Saenz, M. (1994). Efecto de los plaguicidas sobre *Trichoderma* spp. resúmenes 90 Aniversario INIFAT; VII Jornada Científica, La Habana, 5-7 abril, pp. 70-71.z

Nelson P.E. (1991). History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology* 81:1045-1048.

Neyra, M. 1992. Evaluación técnica de *Trichoderma* spp. en el cultivo de tomate contra damping - off bajo condiciones de producción en hidropónico. Informe técnico de investigación, Unidad Toxicología, Prueba de productos, INISAV, La Habana Cuba. 6p.

Nuez, F., Gil, R., Costa, J. (1996). El cultivo de pimientos Chiles y Ajies. Madrid España. pp 15-19.

Olsen, C.M. and Baker, K.F. 1968. Selective heat treatment of soil, and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. Phytopatology 58: pp 79-87.

Ortega R. (1990). Resistencia a *Phytophthora capsici* Loen. En Pimiento. Colección tesis Doctorales INIA 89. MAPA, Madrid. 98p

Priyatmojo, A., Yotani, Y., Hattori, K., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2001. Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. Plant Dis. 85:1200-1205.

Pérez-Moreno, L., Salinas, G.J., y Octavio-Medina L. 1990. Control genético y químico de la marchitez del chile (*Capsicum Nahum* L.) causado por el hongo *Phytophthora capsici* Leo., en la región de Irapuato, Guanajuato., México. Revista Mexicana de Fitopatología 8 (1): 71-76.

Pérez-Moreno, L., Duran-Ortiz, L.J., Ramirez-Malagón, R., y Sanchez-Pale, J.R. 2002. Compatibilidad Fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo., Revista Mexicana de Fitopatología 21 (1): 19-25.

PHC 2005. T22®, Root Shield/Plant shield Fungicida biológico para la raíz y el follaje. Especificaciones técnicas. Plant Health Care de México S.A. de C.V. 2p.

PHC 2005. 12-16-12®. Biofertilizante foliar y/o fertirrigación para frutales y plantas en general. Especificaciones técnicas. Plant Health Care de México S.A. de C.V. 2p.

PHC 2005. Healthy Star 3-4-3®. Biofertilizante para y plantas y árboles en general. Especificaciones técnicas. Plant Health Care de México S.A. de C.V. 2p.

Pusey, P.L. and Wilson, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis* plant diseases. 68: pp 753-756.

Ramírez, M. C. 1998. Evaluación de fungicidas en tratamiento a semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para el control de *Rhizoctonia solani* en Chapingo, Méx. Tesis de licenciatura. Dpto. de Parasitología Agrícola UACH Chapingo, México. 75p

Redondo, J.E. 1983. Histopatología de las plantas de chile afectadas por *Phytophthora capsici* leo. Revista Mexicana de Fitopatología 12 (1) 101-107.

Regés, A.2000. Micorrizas. Altavista. <http://www.micorriza laboratorios.net.ar/>

Robles, G .P. L. 1997. Evaluación del Kodiak (*Bacillus subtilis*) en el tratamiento a semilla para el control de enfermedades radicales en maíz en Chapingo, Edo. De México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. Pp 41.

Romero, C. S. 1998. Hongos fitopatógenos. Parasitología Agrícola Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México 347 p.

Saborío-Mora, M., Pacheco-López, H. 1993. Reacción de progenitores e híbridos de *Capsicum* a la inoculación artificial con *Phytophthora capsici* en condiciones de campo. Manejo integrado de plagas. 30:11-14.

SAGARPA. 2000 anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Servicio de Información y estadística agroalimentaria y pesquera. México D.F.

SAGARPA 2002. Resumen Nacional de la producción de chile en México servicio de Información Agroalimentaria y pesquera México, D.F. SIACO.

Stefanova, M., Sandoval, I., Fernández, A. 1995. Compatibilidad entre cepas de *Trichoderma* spp. y agentes biopesticidas, biofertilizantes y bioestimulantes. Informe técnico de investigación, INISAV. 8p.

Tejeda, G., López, M. and Castellanos, J. J. 1998. Bench-scale bioreactor production of *Bacillus subtilis* for the control of phytopathogenic fungi and bacteria. Revista ICIDCA sobre los derivados de la Caña de Azúcar. 32(3):pp 1-6.

Thompson, H.C. 1997. Vegetable crops. 5 ed. Mc Graw Hill Book, New York-Toronto-London.

Utkhede, R.S. and Rahe, J.E. 1993. Interactions of antagonist and pathogens in biological control of onion white rot. Phytopathology 73: pp 890-310.

Valadez, L.A. 1989. Producción de hortalizas. Ed. Limusa. México D.F. 51p.

Zapata, M. N., Bañón, S., y Cabrera, P. 1992. El pimiento para pimentón. Madrid, España. Editorial mundi-Prensa. 17p

CAPITULO 2

DETERMINACIÓN Y PATOGENICIDAD DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO

(*Capsicum pubescens* R & P).

RESUMEN

Se aislaron los hongos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* de plantas de chile manzano, con síntomas de pudrición de raíz, cuello y marchitez. Se obtuvieron cultivos puros de cada uno de los hongos y se inocularon en forma individual y en mezcla (coctel), en plantas de chile manzano con dos pares de hojas verdaderas, en tres formas diferentes de inoculación; al suelo, a la raíz y al cuello más un testigo sin inocular, bajo condiciones controladas en invernadero. Los objetivos fueron: 1) Determinar el o los agentes causales de la marchitez del chile manzano. 2) Conocer la sintomatología y patogenicidad que inducen cada uno de los hongos aislados de plantas con síntomas de marchitez en chile manzano. De los síntomas de pudrición de cuello, raíz y marchitez se obtuvo a los hongos: *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* en un 30, 40, 20 y 10 % respectivamente. Se determinó como agentes causales de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano a *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*. *R. solani* indujo estrangulamiento, pudrición corchosa y rojiza a nivel del cuello, detuvo el crecimiento de las plantas, causó hojas cloróticas y conforme avanzo el tiempo, se defoliaron. *Phytophthora capsici* causó necrosis de raíz, marchitez y muerte de plantas. *F. oxysporum* desarrollo clorosis (amarillamiento), perdida de turgencia, pudrición de raíces y detuvo el crecimiento de algunas plantas. La mezcla de hongos (coctel), causo la incidencia mayor (80%) de plantas muertas o con síntomas de marchitez en un tiempo menor en comparación con la patogenicidad inducida en forma individual de cada hongo. La inoculación a la raíz y al suelo fueron las técnicas mejores para la inoculación de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum* con respecto a la inoculación al cuello. *R. solani* fue el que mas afectó la altura inoculado al suelo en grano de trigo colonizado.

DETERMINATION AND PATHOGENICITY OF THE CAUSAL AGENTS OF ROOT ROT, STEM BASE ROT AND CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P) WILTING.

ABSTRACT

The fungus *R. solani*, *P. capsici*, *F. Oxysporum* y *P. aphanidermatum* were isolated of "chile manzano" plants with symptoms of root and stem base rot. Pure cultivations were obtained each one of the fungus, and were inoculated each one in individual way and in mix of the fungus in "chile manzano" plants with two left pares in three different forms of inoculation; root, stem base and soil and one test under conditions controlled in greenhouse. The objectives were: 1) to determinate the causal agents or agent of *C. pubescens* wilting. 2) to find out the pathogenicity and know the sintomatology that producing each one of the fungus, isolation of the plants with root rot, stem base rot and "chile manzano" wilting symptoms in "chile manzano" plants. Of the symptoms in root rot, stem base rot and "chile manzano" wilting were obtained the fungus: *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* in a 30, 40, 20 y 10 % respectively. The causal agents of root rot, stem base rot and *C. pubescens* wilting were *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*. *R. solani* induced strangler, reddish and cork-like rotting in the stem base, and stop the growth in the plants, manifested the yellow of foliage and in the next time the lefts coming loose. *Phytophthora capsici* caused root's necrosis, wilting and total death of the plants. *Fusarium oxysporum* produced yellow of foliage, swelling lees, root rotting and stop the growth in some plants. The fungal mixture (coctel), was the most pathogenic, killing the 80% of the plants with wilting symptoms in less time in comparison to the pathogenicity inducted by each individual causal agent. The inoculation to the root and the soil were the best technique to the inoculation of *P. capsici*, *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum* in comparison with the stem base inoculation. Moreover *R. solani* had the highest effect against plant size when it was inoculated to the soil with colonized wheat grain.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos que se encuentran en el suelo tienen gran importancia, ya que muchos son fitopatógenos que atacan a las plantas de interés económico a través de la raíz o a nivel del cuello (Rodríguez, 2002). Dentro de los diversos problemas fitosanitarios, que atacan al cultivo del chile en México se mencionan a hongos que ocasionan marchitez en las plantas. Las enfermedades fungosas que afectan a la raíz del chile son: pudrición de cuello, ahogamiento o damping-off ocasionado por el hongo *Rhizoctonia solani* Kúnh; marchitez del chile inducida por *Phytophthora capsici* y la marchitez ó pudrición seca causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, (Beckman, 1987). Recientemente, Black *et al.*, (1993) señalaron que la marchitez del chile es causada por *F. oxysporum* y *Phytophthora capsici*, sin embargo a pesar de que existen muchos reportes de la marchitez del chile, no se cuenta con suficiente información que permita diferenciar la marchitez del chile causada por *Fusarium*, con la causada por la asociación de este con *P. capsici* (Black *et al.*, 1993). Así mismo Bauer (1997), menciona que los hongos principales que más inciden en la manifestación de la marchitez del chile son *Fusarium* sp, *Phytophthora* sp y *Rhizoctonia* sp. Aunado a lo anterior *Rhizoctonia solani* ocasiona síntomas en el cultivo de chile que a menudo son confundidos por su similitud con los daños causados por *P. capsici*, por lo que aun no esta bien definida su distribución sintomatología e importancia en este cultivo (Mendoza, 1996). En base a lo anterior seria de gran interés fitopatológico realizar investigaciones que permitan dilucidar si la marchitez del chile manzano es causada por un sólo hongo, o por un complejo de hongos patógenos, así como establecer cual o cuales son los síntomas que inducen en forma individual y en complejo (mezcla). Debido a lo anterior se realizó la presente investigación con los objetivos siguientes:

- Determinar el o los agentes causales de la marchitez del chile (*Capsicum pubescens* R & P).
- Conocer la sintomatología y patogenicidad que inducen cada uno de los hongos aislados de plantas con síntomas de la marchitez del chile manzano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Asociación constante de los hongos con los síntomas

2.1.1 Material vegetal

Se colectaron 10 plantas de chile manzano (*C. pubescens*) con síntomas de marchitez, achaparramiento, amarillamiento, necrosis y pudrición en raíz y cuello, en Coatepec de Harinas, Edo. de México, en el mes de mayo de 2004 en época de floración y amarre de frutos. Las plantas se colocaron en bolsas de polipapel y se trasladaron al Laboratorio de Hongos Fitopatógenos del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo, para llevar a cabo el aislamiento de los hongos.

2.1.2 Aislamiento de hongos

Para el aislamiento de los hongos, las plantas se clasificaron por síntoma y parte infectada, como pudrición de cuello y raíz, coloración rojiza de raíz y desprendimiento de la corteza. De cada uno de los síntomas, se tomaron 50 muestras (mitad de tejido enfermo y mitad sano), estas muestras se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante dos minutos después se enjuagaron en agua destilada esterilizada, se secaron con sanitas esterilizadas y después sembraron (cuatro muestras por caja) en cajas petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y finalmente se incubaron a 25°C en luz blanca por 72 horas. Después se determinó la frecuencia de aislamiento de cada hongo para cada síntoma, en base a la forma y color de las colonias de hongos que crecieron en las muestras. Finalmente, se llevaron a cabo reaislamientos de cada una de las colonias obtenidas (Acosta-Ramos, 2002), y se identificaron en base a sus características morfológicas y por comparación con claves taxonómicas.

2.1.3 Purificación de los hongos e incremento de inóculo

Cultivo monoconidial de *Fusarium* spp. Se utilizaron cultivos de ocho días de edad que llenaron las cajas petri, a las cuales posteriormente se les agregaron 10 mL de agua destilada estéril con Tween 20 al 0.1% y con una aguja de disección se removió la superficie

del micelio de los hongos para desprender los conidios. La solución resultante se vació a un tubo de ensayo (solución madre) (Morales, 1996).

Posteriormente se adicionó 1 mL de la solución madre a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada esterilizada, el cual se mezcló vigorosamente y de esta última se tomó nuevamente 1 mL, el cual se pasó a otro tubo con 9 mL de agua destilada esterilizada y así sucesivamente hasta obtener una concentración baja (conidios dispersos). Enseguida tres gotas de la suspensión con conidios dispersos se sembraron y distribuyeron homogéneamente con un triángulo de vidrio en cajas de petri con medio PDA, las cuales se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 a 36 h. Posteriormente, los crecimientos miceliales (conidios germinados) se separaron y transfirieron a cajas con PDA; de esta forma se obtuvieron los cultivos monoconidiales (Morales, 1996). Cada aislamiento se incrementó masivamente en cinco cajas con PDA.

Cultivo homocariótico de *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp. Se reaislaron reaislamientos de los hongos *Phytophthora* y *Pythium* (obtenidos de los aislamientos iniciales) en cajas petri con medio V8-agar, las cuales se expusieron por 5 días en luz blanca a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, una vez que llenaron las cajas petri se procedió a realizar la toma de 10 discos con micelio y medio de cultivo de 5 mm de diámetro. Los discos se colocaron en cajas petri esterilizadas que contenían dos hojas de chile aparentemente sanas (Quintero, 1968; Jiménez, 2000), previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% por 4 min, y enjuagadas con agua destilada esterilizada, a las cajas petri se les adicionaron 10 mL de agua destilada esterilizada para cubrir la mitad del grosor de los discos. Las cajas con los discos se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en luz blanca por 72 h.

El material se revisó diariamente en el microscopio estereoscópico y compuesto bajo los objetivos 10X y 40X, para confirmar la presencia de esporangios y una vez confirmada (aproximadamente dos a ocho días después), se indujo la liberación de zoosporas. Para esto, a las cajas petri se les aumentó la cantidad de agua esterilizada hasta cubrir el micelio y después se colocaron a una temperatura de 4°C por 15-20 min (Jiménez, 2000), en este caso la metodología se modificó ya que no se logró la liberación de las zoosporas, por lo que se

colocó en refrigerador a 10° C por tres horas. La exposición repentina del hongo a cambios bruscos de temperaturas, incide en la división protoplasmática de los esporangios que liberan las zoosporas (Fawcett y klotz, 1998).

Posteriormente se extrajo 1 mL de la suspensión de zoosporas y se colocó en un tubo con 9 mL de agua destilada esterilizada, se mezcló y se tomó 1 mL nuevamente, el cual se paso a otro tubo con 9 mL de agua destilada esterilizada y así sucesivamente hasta obtener una concentración baja de zoosporas (zoosporas dispersas). Tres gotas de una solución con zoosporas dispersas se sembraron y distribuyeron homogéneamente con un triángulo de vidrio esterilizado en cajas petri con medio de cultivo V8-agar. Las cajas se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en luz blanca. Después de 12 horas, las zoosporas emitieron sus tubos germinativos, por lo que se reaislaron individualmente con la ayuda de una aguja hipodérmica de insulina y se sembraron (reaislaron) en cinco cajas petri con V8-agar (Quintero, 1968; Jiménez, 2000).

En el caso de las colonias de *Rhizoctonia* se dejaron crecer en PDA para después reaislirlas a través de la técnica de punta de hifa (se corta una parte final e individual del micelio) después se siembra en cajas de petri con PDA, de ahí se obtuvo un cultivo puro (punta de hifa), el cual se sembró en PDA por tres días y posteriormente de ahí tomar 3 discos de micelio (de 7mm de diámetro) que se colocaron en matraces de 500 mL con semillas de cebada (esterilizada previamente tres veces durante 20 min a 121°C) y 100 mL de agua esterilizada, los matraces se incubaron durante 10 días en oscuridad a 25° C y se revolvieron regularmente para obtener una colonización uniforme de los granos. Una vez echo esto el suelo se infecto con 2% (peso/peso) del grano de cebada colonizado con el hongo (Priyatmojo, et al 2001).

2.1.4 Identificación de los hongos aislados.

Se realizaron montajes permanentes de cada uno de los hongos obtenidos, las preparaciones se observaron al microscopio compuesto. La identificación a especie, se hizo con la ayuda de claves especializadas (Sneh, 1996; Romero, 1998; Booth, 1971, Waterhouse 1963). Dicha actividad se realizó tomando en cuenta las características de las estructuras

vegetativas y reproductivas de los hongos, así como por mediciones de sus estructuras reproductivas.

Identificación de la especie de *Fusarium*. Para la identificación de especie de *Fusarium* se utilizó la forma del macroconidio. También se uso la presencia o ausencia de clamidosporas como un aspecto y característica muy importante ya que es un criterio primario en la identificación. La morfología de las colonias, la tasa de crecimiento en PDA se uso como un criterio de identificación secundario (Klotz *et al.*, 1998). Para promover la formación de macroconidios se utilizó el medio de cultivo suelo agar (Klotz *et al.*, 1998). Para su preparación se utilizaron 250 g de suelo de arcilla negra previamente secado y tamizado a este se le agregaron 15 g de agar por litro de agua destilada, se agitó constantemente hasta quedar una masa pastosa y uniforme, se esterilizo en una olla de presión por 15 min a 15 Lb al termino se dejo enfriar y se vació a cajas petri de vidrio, una vez frió el medio se procedió a sembrar discos de PDA con el micelio del hongo y se colocó detrás de una ventana (luz natural) a temperatura ambiente (17 a 23 °C) dándole luz de día y oscuridad en la noche, con ello se promueve la formación de macroconidios y clamidosporas.

Identificación de la especie de *Phytophthora capsici*. La especie se identifico según las claves de Waterhouse (1963), y Erwind Ribeiro (1996). Se tomaron en cuenta las características siguientes: tipo de micelio (cenocítico o septado), forma de los esporangios y oosporas y forma de la colonia.

Identificación de la especie de *Pythium aphanidermatum*. La especie se identificó según las claves de Romero (1980). Se tomaron en cuenta las características siguientes: tipo de micelio (cenocítico o septado), forma de los esporangios y oosporas.

Identificación de la especie de *Rhizoctonia solani*. Se identificó a especie según las claves de Sneh *et al.* (1991). Tomando en cuenta tipo de micelio.

2.1.5 Determinación de la patogenicidad

Cada uno de los aislamientos obtenidos se inocularon en plantas aparentemente sanas de *C. pubescentes* con la finalidad de reproducir los síntomas observados de los aislamientos y muestreos realizados. La metodología fue la siguiente:

2.2 Fase de invernadero

El experimento se llevó a cabo en el invernadero de Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2.1 Preparación del material vegetal

El semillero se estableció con *C. annum* en charolas plásticas de 200 cavidades con sustrato de peat moss en el invernadero del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo. Las plantas se mantuvieron a temperatura de $18 \pm 4^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $80 \pm 5\%$ (Mora, 1993). Una vez que las plantas tuvieron 2 o tres pares de hojas verdaderas se sembraron en vasos de unicel de un litro con suelo esterilizado en proporción de 1:1 de una mezcla de suelo de monte y peat moss.

2.2.2 Preparación del inóculo

De los aislamientos homocarióticos de *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*, punta de hifa de *Rhizoctonia solani* y monoconidiales de *Fusarium oxysporum* se hicieron suspensiones acuosas de zoosporas y conidios respectivamente. Posteriormente con un hemacitómetro se realizó un conteo por triplicado, de cada una de las suspensiones y una vez conocida la concentración de zoosporas, propagulos y conidios de cada hongo, se ajustó hasta obtener las concentraciones siguientes; 5×10^3 zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$ de *Pythium* (Heungens, K., y Parke, J.L 2001), 2.5×10^3 zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$ de *Phytophthora capsici* (Velásquez, 2003), 3×10^5 conidios $\cdot \text{mL}^{-1}$ de *Fusarium oxysporum*. (Montes, 1992), y *Rhizoctonia solani* se cultivó de dos formas a) en PDA (suspensión micelial mediante raspado superficial del medio de cultivo, llevándose la solución a una concentración de 86×10^3 propagulos $\cdot \text{mL}^{-1}$ y b) en grano de cebada 2% (peso/peso) del grano de cebada colonizado con *Rhizoctonia*, (Priyatmojo, et al 2001).

2.2.3 inoculación de plantas

Se utilizaron 160 plantas de chile manzano (*C. pubescens*) con dos o tres hojas verdaderas (30 días de edad) sembradas en vasos de unicel de un litro con suelo esterilizado en proporción de 1:1 de una mezcla de suelo de monte y peat moss. De estas, 30 se inocularon con *F. oxysporum*, 30 con *P. aphanidermatum*, 30 con *P. capsici*, 30 con *R. solani* y 30 se inocularon con la mezcla de los 4 hongos; de las 30 plantas inoculadas con cada hongo y mezcla, 10 se inocularon al suelo, 10 a la raíz y 10 al cuello y las últimas 10 se dejaron como testigo (sin inocular), (Cuadro 1).

Cuadro. 1 diseño del experimento para determinar la patogenicidad y sintomatología de hongos aislados e inoculados en plantas de chile manzano (*C. pubescens*) con dos o tres hojas verdaderas.

Hongos	Tipo de inoculación	Nº de plantas
<i>F. oxysporum</i>	Raíz	10
	Cuello	10
	Suelo	10
<i>P. capsici</i>	Raíz	10
	Cuello	10
	Suelo	10
<i>P. aphanidermatum</i>	Raíz	10
	Cuello	10
	Suelo	10
<i>R. solani</i>	Raíz	10
	Cuello	10
	Suelo	10
Mezcla de hongos (coctel)	Raíz	10
	Cuello	10
	Suelo	10
Testigo (Plantas sin inoculo)	-	10

La cantidad de inóculo utilizado se indico anteriormente en el punto 2.2.2.

1. En la inoculación al suelo; los hongos *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum* y se aplicaron al suelo a una dosis de 50 mL de cada una de las suspensiones de inóculo a las

concentraciones antes señaladas. El hongo *R. solani* se agrego al suelo a una dosis de 2% (peso/peso) del grano de cebada colonizado con el hongo (20 gramos de grano infectado por Kg de suelo).

2. En la inoculación a la raíz, se usaron plántulas extraídas de las charolas, a las raíces de dichas plantas se les realizaron heridas. Las raíces de estas plantas se sometieron en inmersión en una suspensión (100mL) de inoculo (conidios, zoosporas o propágulos) durante 30 min.

3. En la inoculación al cuello, a las plantas se les realizo una herida (3 mm aproximadamente) con una aguja de disección. Posteriormente, a cada planta se le agregaron 1 mL de inoculo (conidios, zoosporas y propágulos) previamente preparado a las concentraciones antes indicadas.

Después de la inoculación, las plantas se colocaron en el invernadero a una temperatura de $18 \pm 4^\circ \text{C}$, humedad relativa de 80% y a capacidad de campo.

2.2.4 Reaislamientos:

Después de que transcurran 30 días después de la inoculación y aparición de síntomas se procedió a hacer siembras (reaislamientos) del tejido de las plantas inoculadas inicialmente en medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ con luz blanca durante 72 horas. Posteriormente, los hongos que se obtuvieron de las siembras, se montaron preparaciones. Finalmente se compararon los síntomas y estructuras morfológicas de los hongos obtenidos originalmente en las plantas enfermas en los muestreos con los inducidos y reaislados de las inoculaciones en las pruebas de patogenicidad.

2.2.5 Variables evaluadas:

Se determinaron la incidencia de las enfermedades y la altura de las plantas a los 12, 33 y 66 días después de la inoculación. Así como la frecuencia de aislamiento (una sola vez) y la sintomatología inducida durante todo el experimento. La incidencia se considero como el numero de plantas que muestren síntomas típicos de la enfermedad, con respecto al número

total de plantas muestreadas y se expresa en porcentaje. La altura de la planta se midió con una regla y se expreso en cm.

2.2.6 Diseño del experimento

Se uso un diseño factorial 5X3 (4 hongos, la mezcla y 3 formas de inoculación mas un testigo). La unidad experimental fue una planta con 10 repeticiones.

2.2.7 Análisis de resultados

La frecuencia de aislamiento y la incidencia de la enfermedad se analizaron gráficamente y numéricamente. Los datos de la altura de las plantas se sometieron a un análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) con ayuda del paquete estadístico SAS (System analitical statical).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Frecuencia de aislamiento de hongos obtenidos de la marchitez del chile manzano

De los 50 aislamientos realizados de las plantas de chile manzano con síntomas de marchitez (pudrición de cuello) colectadas en el municipio de Coatepec de Harinas, Estado de México, se aislaron a los hongos siguientes: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* en un 40, 30, 20 y 10 % respectivamente. Mientras que del síntoma de pudrición de raíz se obtuvieron a los mismos hongos en un 20, 50, 20 y 10 % respectivamente (Cuadro 2) la mayoría de los aislamientos obtenidos en este estudio correspondieron a *P. capsici* y *R. solani*. Lo anterior difiere un poco con lo reportado por Durán (2001), quien realizó un estudio para identificar a los hongos causantes de la marchitez de chile en la región del Bajío en Guanajuato, encontrando en 110 plantas muestreadas con síntomas de la enfermedad, a *P. capsici* (9%), *Fusarium* spp. (29%), y *Rhizoctonia* spp. (75%); este último se encontró en todos los sitios muestreados, por lo que concluyo que la marchitez de chile en esa región era causada por *Rhizoctonia* spp. Sin embargo, en este estudio se realizaron pruebas de patogenicidad y el comportamiento fue diferente, lo cual se dilucida en apartados posteriores.

Cuadro 2. Frecuencia de aislamiento de hongos obtenidos de síntomas de pudrición de cuello y raíz en chile manzano (*Capsicum pubescens*) en el Municipio de Coatepec de Harinas, Estado de México.

PUDRICION DE CUELLO *(FA).		PUDRICION DE RAIZ *(FA)	
<i>Phytophthora capsici</i>	30%	<i>Phytophthora capsici</i>	50%
<i>Pythium aphanidermatum</i>	10%	<i>Pythium aphanidermatum</i>	10%
<i>Fusarium oxysporum</i>	20%	<i>Fusarium oxysporum</i>	20%
<i>Rhizoctonia solani</i>	40%	<i>Rhizoctonia solani</i>	20%

- FA= Frecuencia de aislamiento

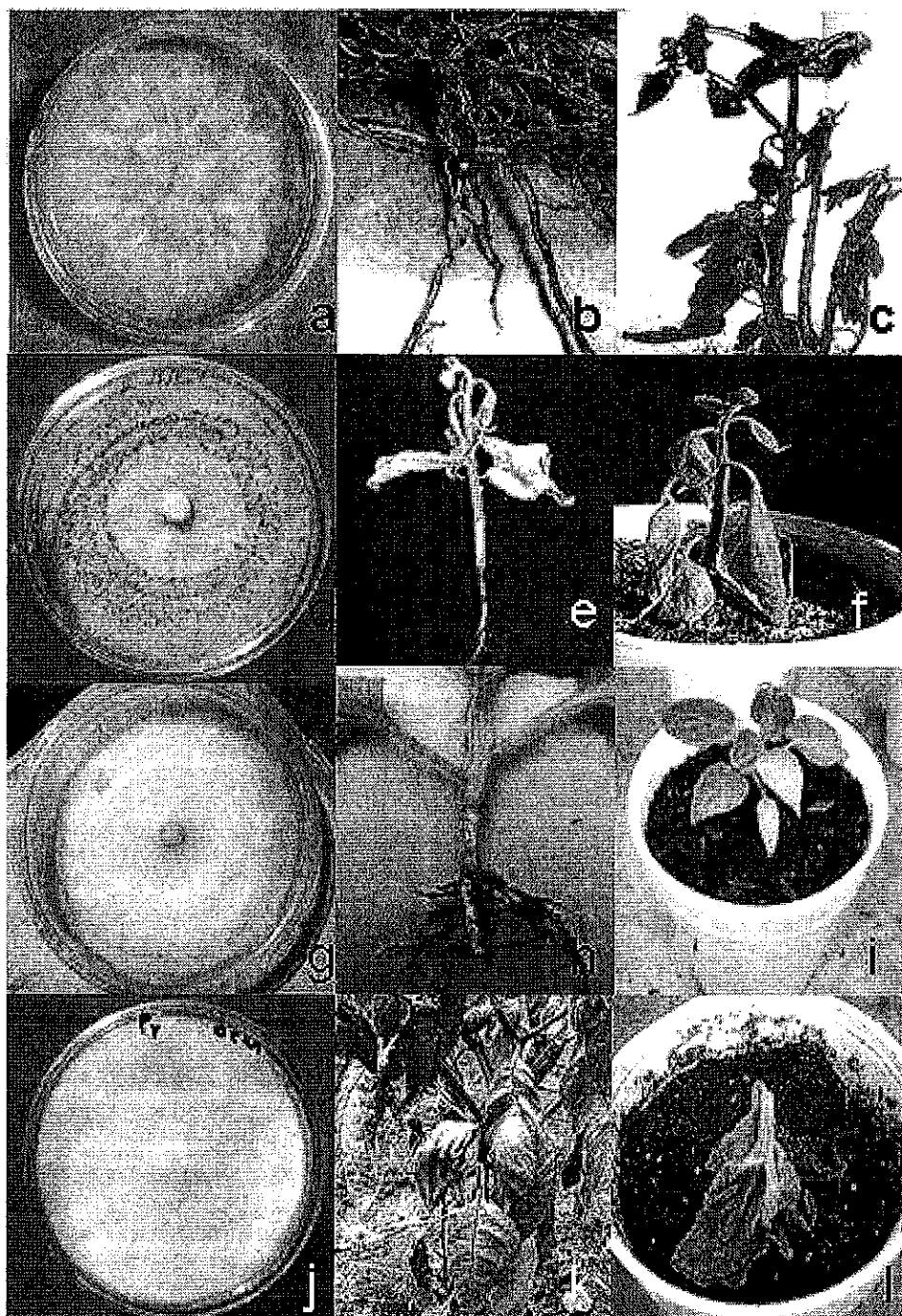


Figura 1. Crecimiento en medio PDA de las colonias, síntomas de partes aisladas e inducidos de los patógenos involucrados en la pudrición de raíz, cuello y marchitez de chile manzano (*C. pubescens*): a) Colonia de *P. capsici*, b). Pudrición de raíz de donde se aisló *P. capsici*, c) Síntomas inducidos por *P. capsici*, d) Colonia de *R. solani*, e) Pudrición de raíz de donde se aisló *R. solani*, f) Síntomas inducidos por *R. solani* g).Colonia de *F. oxysporum*, h) Estrangulamiento de cuello de donde se obtuvo *F. oxysporum*, i) Síntomas inducidos por *F. oxysporum*. j) Colonia de *P. aphanidermatum*, k) Síntomas de marchitez del cual se aisló a *P. aphanidermatum*, l) Síntomas inducidos por *P. aphanidermatum*.

3.2 Sintomatología e incidencia de la marchitez del chile manzano

Rhizoctonia solani inoculada al suelo indujo los síntomas siguientes: 1) estrangulamiento a nivel de cuello, 2) pudrición corchosa y rojiza en el cuello, 3) detuvo el crecimiento de muchas plantas, las cuales permanecieron con las hojas cloróticas (amarillamiento) y conforme avanzo el tiempo, se defoliaron (Fig. 1 e y f). Dichos síntomas se observaron en plántulas que tenían una altura mayor a 15 cm. La marchitez de dichas plantas quizá se debió a un estrangulamiento y pudrición a nivel de cuello y raíz. Algunos de los síntomas antes mencionados coinciden con los señalados por Agrios (1999), quien mencionó que *R. solani* cuando infecta a las plantas presentan lesiones (pudriciones) de color rojizo en el cuello, las cuales se extienden y adquieren un aspecto hundido y pueden llegar a cubrir la base del tallo y destruir raíces, como consecuencia se debilita la planta o muestran un amarillamiento acentuado. Las otras técnicas de inoculación (a la raíz y cuello de la planta) no indujeron síntomas considerables de la enfermedad (Fig. 2). *R. solani* fue el patógeno que causó la incidencia mayor de la enfermedad, ya que indujo la mortandad mayor de plantas (44 %) cuando se inoculó al suelo (Fig.2), este comportamiento se pudo deber a que este tipo de inoculación permite al hongo establecerse adecuadamente y permanecer en el suelo continuamente, ya que el hongo mantiene su patogenicidad al penetrar a los granos de cebada. Esto coincide con lo mencionado por Priyatmojo, *et al* (2001) quienes citaron a este método como uno de los más eficientes para la inoculación de *Rhizoctonia* spp.

Phytophthora capsici inoculado a la raíz causó: 1) necrosis de raíz, 2) marchitez y 3) muerte de plantas (Fig 1, b c), estos daños producidos por *Phytophthora* coinciden con los reportados por Kapoor and Thakur (1987), quienes señalaron que *Phytophthora capsici* por sí sola es capaz de causar daños fuertes en plántulas y que la infección puede iniciar en cualquier parte de la planta, a nivel de suelo, brote terminal o a mitad del tallo, pero la infección primaria se produce a nivel de suelo. Lo anterior hace inferir que por eso *P. capsici* causó más daño durante los primeros 12 días después del trasplante o inoculación, ya que en esta etapa de desarrollo, las plántulas son muy susceptibles al ataque de cualquier tipo de patógeno, debido a que sus mecanismos de defensa en esa etapa son limitados, pues sus tejidos aun permanecen poco lignificados y fácilmente pueden ser dañados. Así mismo, dicho comportamiento de la incidencia se pudo deber a que al sacar la raíz e inocular el patógeno,

este pudo penetrar fácilmente por raicillas dañadas y trozadas, lo cual hizo muy susceptible a la plántula de chile. La inoculación de *P. capsici* a la raíz fue la más agresiva a los 12 días (Fig. 2) después de la inoculación, debido a que causo la muerte de 33% de las plantas, con respecto a las inoculaciones realizadas al suelo y cuello de las plantas (Fig. 2). Aunque dicho patógeno es mas agresivo durante el inicio de la floración y amarre de frutos (Mendoza, 1996).

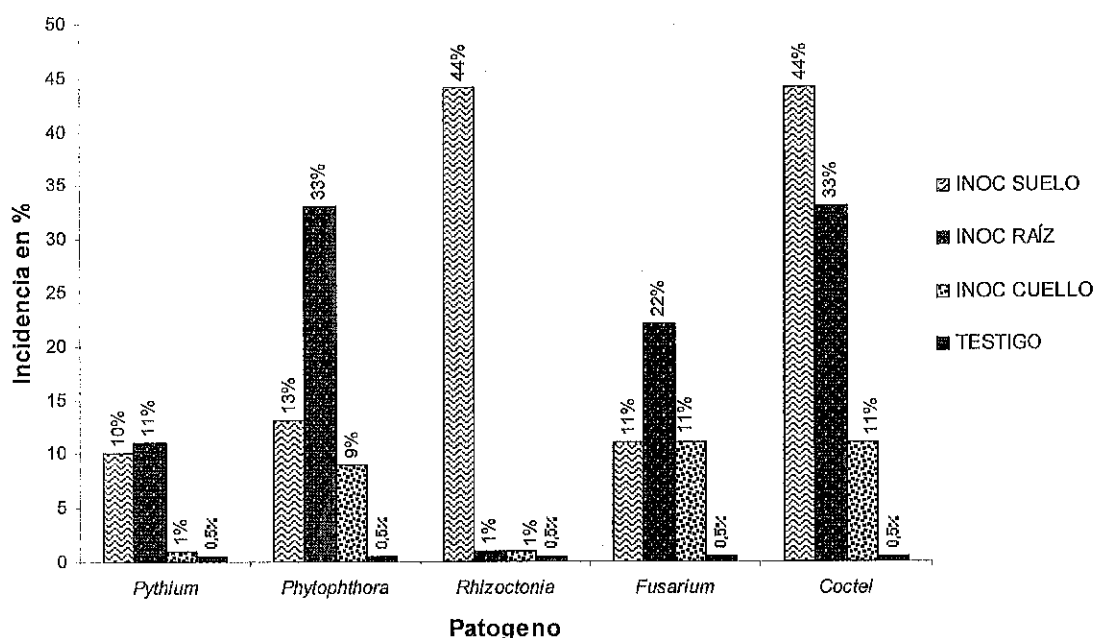


Figura 2. Incidencia de plantas muertas (marchitez) a los 66 ddi (días después de la inoculación) de acuerdo al tipo de agente causal de la pudrición de raíz cuello y marchitez de chile (*Capsicum pubescens*) y en función del tipo de inoculación.

Fusarium oxysporum desarrolló síntomas de: 1) clorosis intervenal, 2) pérdida de turgencia, y 3) pudrición de raíces (Fig. 1). Estos últimos síntomas coinciden con los reportados por Apodaca, (1999), quien mencionó que *Fusarium oxysporum* es capaz de causar marchitez en hortalizas, además señaló a este patógeno como el causante de la pudrición de la corona y de la raíz y marchitez de plantas del chile en el estado de Sinaloa. Así mismo, dicho autor indicó los síntomas siguientes: clorosis intervenal, flacidez, defoliación parcial, y muerte gradual. El período de incubación (desarrollo de síntomas) de *F. oxysporum* fue más lento, comparado con los otros hongos, ya que los síntomas de la enfermedad se manifestaron

severamente hasta los 66 días después de la inoculación. Este hongo indujo una incidencia de 22% de plantas muertas por estrangulamiento de cuello y defoliación (inoculado a la raíz) a los 66 días después de la inoculación (Cuadro 3). Además se ha reportado que *F. oxysporum* penetra a las raíces y tallos a través de heridas por lo que el tipo de inoculación a la raíz, usado en esta investigación tuvo mejores resultados. Sin embargo, la incidencia baja de este patógeno se pudo deber a lo que menciona Romero (1994); quien señalo que este patógeno es un habitante excelente del suelo, por lo que una vez establecido en el, permanece ahí indefinidamente a través de estructuras de resistencia y eso hace que la planta no presente una muerte súbita pero si pueda afectar a la planta constantemente hasta causarle su muerte. Así como a la posible pérdida de patogenicidad por el exceso en el numero de reaslamientos.

Pythium aphanidermatum, inoculado tanto a la raíz como al suelo causo los síntomas siguientes: 1) marchitamiento de la planta, 2) pudrición de raíz y 3) debilitamiento general de las plantas. *P. aphanidermatum* fue el patógeno que mostró una incidencia menor en los tres tipos de inoculación, a la raíz, suelo y cuello con 1,11 y 10% respectivamente, presentándose a los 12 días la mortandad mayor de las plantas (**Cuadro 3**). Esto se pudo deber a una concentración baja de zoosporas (5×10^3 zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$) que se inocularon de *P. aphanidermatum* ya que las zoosporas son la fuente de inoculo primario, así como a los riegos constantes en el sustrato de Peat mooss pudieron ocasionar la pérdida de zoosporas por filtración o lavado como lo mencionaron Ristano (1999) y Pernezny *et al.*, (2003).

En la mezcla de hongos (Cóctel) inoculados al suelo indujeron los síntomas siguientes: 1) estrangulamiento a nivel de cuello, 2) pudrición corchosa y rojiza en raíces y 3) marchitamiento general de las plantas. El tipo de inoculación al suelo fue el que tuvo una incidencia mayor de la enfermedad (44%). (**Fig. 2**). Dicho comportamiento se puede atribuir al hongo *R. solani* el cual se reasoló con una frecuencia mayor (60%), (**Fig. 2**), y además fue el que causo la incidencia mayor en la inoculación individual. Además este hongo tiene un periodo de infección corto Priyatmojo, *et al* (2001), pudiendo influir esto en una ventaja mayor a tejidos jóvenes y suculentos en comparación con los otros patógenos.

En contraste a *R. solani*, *Phytophthora capsici* requiere temperaturas entre 25 y 28 ° C y humedad relativa alta (90%) para lograr su proceso de infección que sucede cuando son liberadas las zoosporas que son móviles en suelos saturados de humedad, detienen su movimiento cuando se adhieren a la epidermis de las plantas, germinan e infectan al penetrar por lenticelas, estomas y heridas (Mendoza, 1996). Sin embargo al no controlar factores en esta investigación como la temperatura que oscilo entre 18 y 30°C, los riegos que se administraron no fueron suficientes evaporándose rápidamente, *P. capsici* pudo realizar un proceso de enquistamiento debido a que la humedad o el agua libre no fueron favorables para su dispersión, (Tsao ,1969). *P. capsici* no tuvo un porcentaje tan alto de frecuencia de reislamiento en el coctel como *R. solani* sin embargo fue el segundo mas frecuente con una presencia de 30% de los reislamientos realizados en la inoculación al suelo, esto se puede relacionar a lo mencionado por, Ristaino *et al.*, (1993); Edwin and Ribeiro, (1996); Pernezy *et al.*, (2003) quienes mencionaron que es a través del suelo, ya sea por salpique, contacto de raíces sanas con enfermas de una planta o por medio del viento, hacen que las raíces se ponga en contacto con el inoculo o que el inoculo se mueva hacia las raíces. Lo cual quizá pudo influir en que la inoculación al suelo fuese uno de los métodos más eficaces para la penetración de este patógeno.

En cuanto a la frecuencia baja de reislamiento de *Fusarium oxysporum* 5% inoculado como coctel se pudo deber a lo reportado por Galindo (1962), quien realizo estudios en donde si bien existe una especie de *Fusarium* patógena en chile, esta no es la responsable de la mayor parte de la marchitez observada en México. En este trabajo, Galindo aisló a los géneros *Fusarium*, *Phytophthora* y *Pythium* y probó la patogenicidad de cada uno de ellos y como resultado encontró que el único capaz de causar enfermedad en las plantas fue *Phytophthora* spp, por lo que considero a los otros hongos como saprofitos que invaden los tejidos previamente atacados por *Phytophthora*.

La ausencia en la frecuencia de reislamiento de *Pythium aphanidermatum* en el cóctel (mezcla de patógenos), quizás se puede deber a la cantidad baja de inoculo (5×10^3 zoosporas•mL⁻¹), o una patogenicidad baja de dicho aislamiento lo cual pudo hacer que las zoosporas del hongo no penetraran y por lo tanto no sobrevivieran. Dichas especulaciones se

basan en lo indicado por Mitchell and Rayside (1986), quienes usaron diferentes cantidades de inóculo (zoosporas) de *Pythium* spp. y en la cantidad mas alta (50×10^3 10^3 zoosporas $\cdot \text{mL}^{-1}$) obtuvieron una colonización de 30 a 60% la cual fue alta en comparación con las otras cantidades pero baja en general, por lo que concluyeron que existe una relación alta entre la cantidad de inóculo y la actividad saprofita del patógeno, ya que la cantidad de inóculo aumenta la colonización debido a la multiplicación fungal del patógeno. En el mismo sentido Nuez *et al.*, (1996), mencionaron que este patógeno se desarrolla bajo condiciones de humedad alta tanto en el suelo como en el ambiente (95% de humedad). Por lo que las condiciones en el invernadero fueron inferiores, pudiendo esto influir a que el patógeno no tuviera una infección buena en la planta. Así mismo, Agrios (2001), Black *et al.*, (1993), Kapoor and Thakur, (1987); Chin *et al.*, (1996), Galindo (1962) y Apodaca (1999), reportaron que el agente causal principal de la marchitez del chile es *Phytophthora* spp. y *Rhizoctonia* spp., mientras que *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. son considerados saprofitos y/o habitantes naturales del suelo.

3.3. Evaluación de la altura de plantas

R. solani inoculada al suelo (**Cuadro 3**) fue el patógeno que más afecto a la variable altura, ya que las plantas de chile manzano registraron la altura menor durante las tres evaluaciones realizadas durante los 66 días (**Fig.3 y 4**), dicho comportamiento también se aprecio en el análisis general; con una altura promedio de 12.25 cm (**Cuadro 3**), le siguieron la mezcla de hongos inoculada al suelo (*P. capsici*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum*) con una altura promedio de 15.03 cm. Dicho efecto inducido por *R. solani* y la mezcla inoculados al suelo fue significativamente diferentes y mayores con respecto a *Fusarium oxysporum* inoculado al suelo y cuello (**Cuadro 3**), a *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* y la mezcla inoculados al cuello. Lo siguiente indico que *R. solani* fue el hongo más patogénico tanto en la inoculación individual como en la mezcla al suelo.

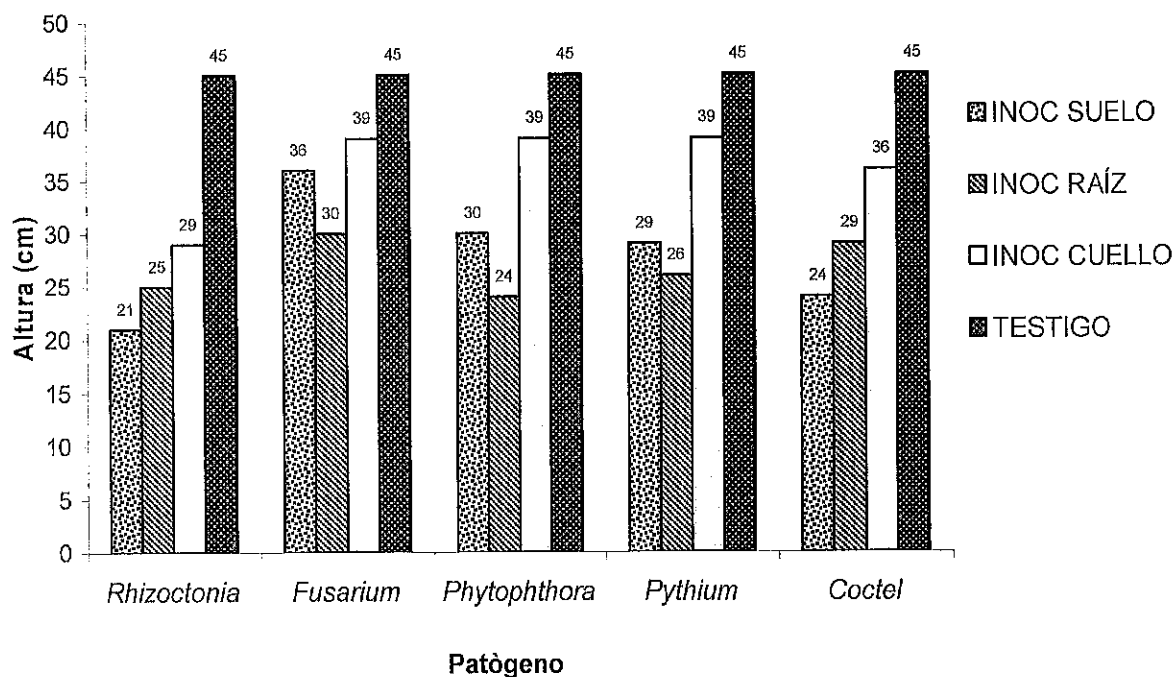


Fig. 3 Altura final (en cm.) de las plantas de chile manzano inoculadas con diferentes patógenos y formas de inoculación a los 66 días después de la inoculación.

Fusarium oxysporum inoculado a la raíz fue la combinación hongo-método de inoculación que más afectó la altura (**Fig. 3**) con respecto a los demás métodos, ello se pudo deber a que este tipo de inoculación permitió que el hongo penetrara fácilmente por las raicillas que fueron dañadas al desprender la planta y al realizarse la inoculación, ya que se puso en contacto la raíz con el inoculo durante 30 min. Sin embargo una de las inoculaciones más reportadas para este patógeno es al cuello, aunque en este estudio no se tuvo tanto éxito, lo cual se pudo deber a que las plantas de chile contienen compuestos químicos que les pueden conferir resistencia, por ejemplo Egea *et al.*, (1996), mencionaron que el chile cuenta con la presencia de capsidiol (fitoalexina presente en plantas de chile) y ácidos fenólicos que han dado indicios de resistencia contra algunos patógenos habitantes del suelo.

Pythium aphanidermatum inoculado al suelo presentó una menor altura de planta con respecto a los demás patógenos, en general en este estudio se pudo observar que este

patógenos fue el que causo el daño menor respecto a los demás patógenos, ya que indujo la incidencia menor de la enfermedad, lo cual se pudo deber a que la patogenicidad de los hongos esta condicionada por diversos factores tanto de manejo (tipos de inoculación, fertilización etc.), como ambientales (Humedad, temperatura del suelo y ambiental, pH y composición del suelo, presencia de organismos antagónicos. (Lida *et al.*, 1983) indicaron la influencia que tiene la humedad del suelo sobre la incidencia del ahogamiento en pepino causado por *F. oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* y encontraron que *F. oxysporum* fue más agresivo cuando el suelo tenia una humedad del 55%, bajo estas condiciones *P. aphanidermatum* mostró una patogenicidad baja, en contraste este hongo mosto mayor agresividad en suelo con 95% de humedad. Así mismo, Nuez *et al.*, (1969) y Romero (1993), señalaron que existe una correlación muy estrecha principalmente entre temperatura y humedad, la cual, aumentan la capacidad de reproducción y potencial patogénico de los hongos, por ejemplo algunos géneros que causan ahogamiento como *Rhizoctonia*, *Pythium*, y *Botrytis* son más activos a temperaturas bajas, mientras que otros como *P. capsici* y *Colletotrichum* lo son a temperaturas más altas. Esto aunado con la cantidad baja de inoculo pudo lo cual no permitió el buen desarrollo e incidencia alta de la enfermedad.

Cuadro 3. Comportamiento de la altura en plantas de chile manzano de acuerdo a los agentes causales de la marchitez del chile (*Capsicum pubescens*) y al tipo de inoculación.

Tratamiento	Días después de la inoculación (ddi)			
	12	36	66	* General
1 <i>Rhizoctonia</i> /Suelo	4.88 C	10.44 E	21.44 E	12.25 F
2 <i>Rhizoctonia</i> /Cuello	7.99 B	16.88BCD	29.22BCDE	16.66CDEF
3 <i>Rhizoctonia</i> /Raíz	7.10 BC	13.88 ED	25.88 CDE	16.77CDEF
4 <i>Fusarium</i> /Suelo	7.33 B	18.33BCD	36.11ABCD	20.59 BC
5 <i>Fusarium</i> /Cuello	7.44 B	20.00 BC	39.33 ABC	22.25 B
6 <i>Fusarium</i> /Raíz	7.22 BC	16.00BCDE	30.77BCDE	18.00BCDE
7 <i>Pythium</i> /Suelo	7.00 BC	15.77BCDE	29.77BCDE	17.55BCDE
8 <i>Pythium</i> /Cuello	7.55B	20.66 B	39.11 ABC	22.25 B
9 <i>Pythium</i> /Raíz	7.11 BC	13.88 DE	26.00BCDE	14.51 EF
10 <i>Phytophthora</i> /Suelo	7.22 BC	15.88BCDE	30.33BCDE	17.81BCDE
11 <i>Phytophthora</i> /Cuello	7.00 BC	20.55 BC	39.55 AB	22.37 B
12 <i>Phytophthora</i> /Raíz	6.00 BC	13.88 DE	24.00 DE	15.66 DEF
13 Cóctel/Suelo	6.33 BC	12.55 DE	24.33 DE	15.03 EF
14 Cóctel/Cuello	7.22 BC	17.11 BCD	36.77ABCD	20.37 BCD
15 Cóctel/Raíz	7.11 BC	14.66 CDE	29.66BCDE	17.14 CDE
16 Testigo	10.66 A	32.77 A	45.66 A	29.77 A
DMS	2.38	5.94	13.58	4.84
r ²	0.39	0.67	0.42	0.84
CV	20.24	21.12	25.95	27.61

*General = Análisis promedio de las 3 evaluaciones a los 12, 33 y 66 ddi (días después de la inoculación)

3.4. Reaislamiento de los hongos

De los hongos que se inocularon en forma individualmente (*R. solani*, *P. capsici*, *P. aphanidermatum* y *F. oxysporum*), se reaislaron a todos en un 100%. Sin embargo, en el caso de *P. aphanidermatum* se reaisló en un porcentaje muy bajo (10 %) del total de plantas a las que se les practico el reaislamiento. Así mismo, del coctel no se reaisló a *P. aphanidermatum* a diferencia de los demás hongos como *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*, los cuales tanto

en los reaislamientos individuales, como en el coctel estuvieron presentes en todas las plantas que mostraron síntomas y de donde se llevaron a cabo los reaislamientos de dichos hongos. Por lo que en este trabajo se determino como agentes causales de la marchitez del chile manzano a los hongos siguientes: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*.

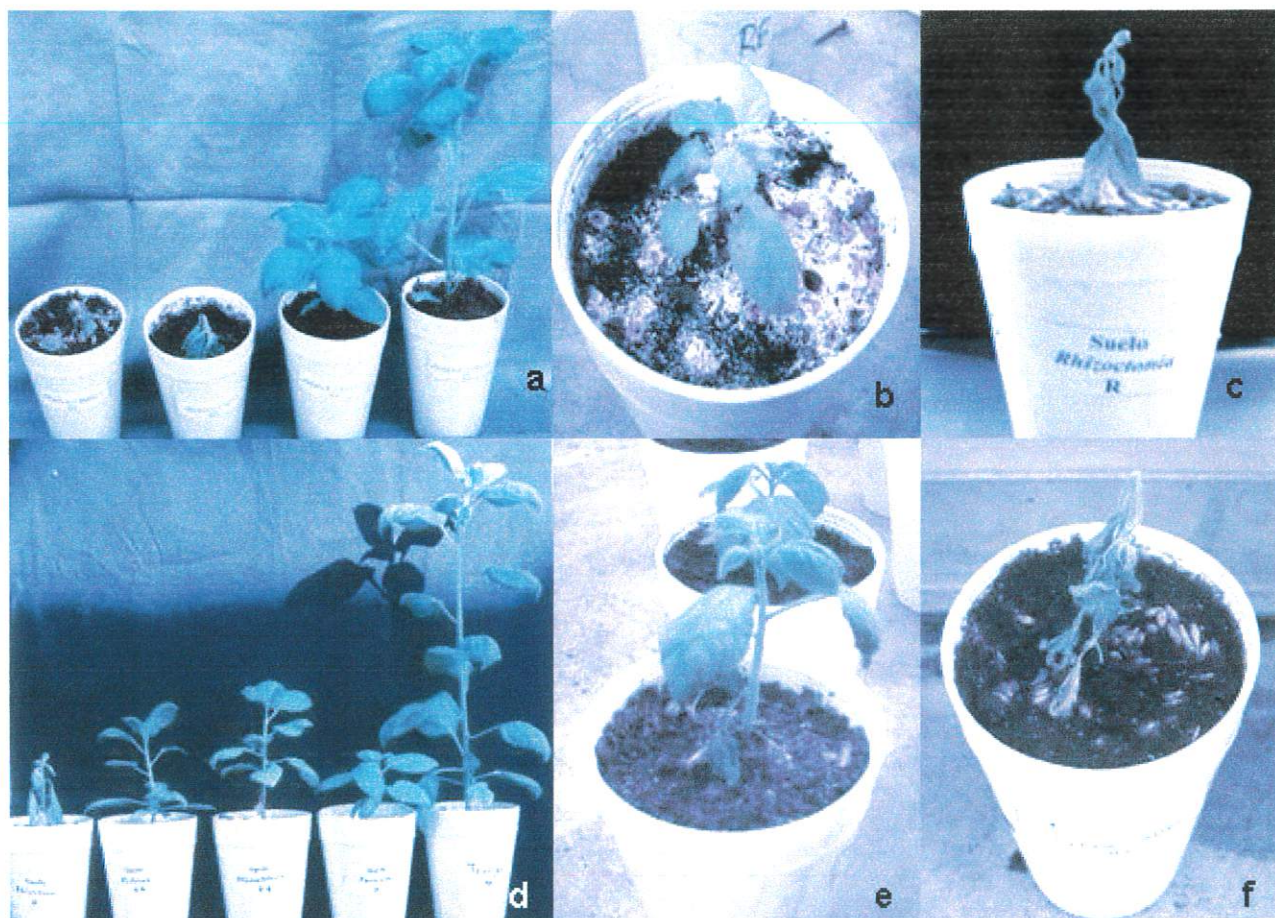


Fig. 4 Evaluación de la altura de planta a los 33 días después de la inoculación, **a).** Comparación de la altura entre los diferentes hongos de derecha a izquierda *R. solani*, *P. capsici*, *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum*; **b).** Escaso crecimiento y síntomas de clorosis causado por *R. solani*; **c).** Muerte de planta causado por *R. solani*; **d).** Evaluación de la altura de planta a los 66 días después de la inoculación, comparación de la altura entre los diferentes hongos de derecha a izquierda *R. solani*, *P. capsici*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum* y testigo; **e).** Síntomas de marchitez causados por *P. capsici*; y **f).** Muerte de planta causada por *P. capsici*.

4. CONCLUSIONES

1. De los síntomas de pudrición de raíz, cuello y marchitez se obtuvo a los hongos: *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* en un 30, 40, 20 y 10 % respectivamente.
2. Los agentes causales de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*capsicum pubescens* R & P) fueron los hongos: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*.
3. *Rhizoctonia solani* indujo estrangulamiento, pudrición corchosa y rojiza a nivel del cuello, detuvo el crecimiento de las plantas, causo hojas cloróticas y conforme avanzo el tiempo, se defoliaron.
4. *Phytophthora capsici* causó necrosis de raíz, marchitez y muerte de plantas.
5. *Fusarium oxysporum* desarrollo clorosis intervenal (amarillamiento), perdida de turgencia, pudrición de raíces y detuvo el crecimiento de algunas plantas.
6. El coctel (mezcla de hongos: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum*) causo la incidencia mayor (80%) de plantas muertas o con síntomas de marchitez en un tiempo menor en comparación con la patogenicidad inducida en forma individual de cada hongo.
7. La inoculación a la raíz y al suelo fueron las técnicas mejores para la inoculación de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum* con respecto a la inoculación al cuello.
8. *R. solani* con el método de inoculación al suelo afectaron mayormente la altura de plantas de chile manzano (*C. pubescens*).

5. LITERATURA CITADA

- Acosta-Ramos, M. (2002). La Antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides* Penz) del mango (*Manguijera indica* L.) c.v. Haden: Patogenicidad, Control químico, Manejo y Epidemiología. Tesis de Doctor EN Ciencias en Fitopatología: Colegio de Posgraduados, Montecillos, Texcoco México. 32 p.
- Agrios, N.G. 1994. Fitopatología. Editorial Limusa. Cd. de México. 756 p.
- Agrios, N.G. 1999. Fitopatología. Editorial Limusa. Cd. de México. 756 p.
- Apodaca, S. M. A. 1999. Algunos aspectos epidemiológicos y de control de *Fusarium oxysporum* Schlecht, f. sp. radicle-licopersici Jarvis y Shomakera en Sinaloa. Tesis Doctoral. Colegio de Posgraduados, Montecillos Edo. de México pp 63-65.
- Bauer, de la I.M.L. 1987. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Ed. Limusa. México. 16 p.
- Beckman, C.H. 1987. the nature of kilt Diseases of plants. The American Phytopathological Society. APS. Press. St Paul. Mn, Estados Unidos de Norte America. 175 p.
- Black, L.L., Gleen, S.K., Hartman, G.L., and Poulos, J.M 1993. *Capsicum* disease; One Field Handbook, Asiatic Center of investigation and Vegetable Development. 98 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, surrey, England. 237 p.
- Duran, O. L.J. 2001 Identificación de los causantes de la "marchitez del chile" en la Región del Bajío. Tesis profesional, Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato. Irapuato, Guanajuato México pp.15-17.
- Egea, C., Garcia P.M., and Candela M.E. 1996. Capsidiol accumulation in *Capsicum annum* stew during the ipersensitive reacction to *Phytophthora capsici*. Journal of plant Patthology 149(6): 762-764.
- Erwin, C.D., and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytoathological Society. Minesota. Estados Unidos de Norte America. 562 p.
- Galindo, A.J. 1962. Marchitez de las plantas de chile causadas por *Phytophthora capsici* Leonian. Revista Mexicana de Fitopatología 18(1): 98-99.
- Heungens, K., and Parke, J.L. 2001. Post infection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. Phytopathology 91:383-391.

Kappor, K. S., and Thakur, P.C. 1987. Control of seed bed losses of capsicum. *Phytopathology* 98: 581-584.

Klotz, L.V., Nelson, P.E., & Toussoun, T.A. (1988). A medium for enhancement of clamydospore formation in *Fusarium* species. *Mycologia*: 108-109.

Leon, G.H. 1978. Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa SARHCIAPAN, Ed. Limusa. Mexico. 96 p.

Matsuoka, K.; Carvalho, M.G.; Poulos, J. 1998. *Phytophthora capsici*. Simposium Brasileiro sobre *Capsicum*. Palestras Universidad Federal Mato Grosso do Sul, Dourados, Brasil. 26 e 27 de abril de 1998. 86 p.

Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de las hortalizas. Parasitología agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Méx. pp. 85-89.

Mora A., G. 2001. Introducción a la epidemiología y manejo de enfermedades de cultivos. Instituto de Fitosanidad Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 89-91 p.

Morales, H.L. 2000. Rango de hospedantes de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, aislado de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ram). Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 52 p.

Nuez, F., Gil, R., Costa, J. (1996). El cultivo de pimientos Chiles y Ajies. Madrid España. pp. 15-19.

Priyatmojo, A., Yotani, Y., Hattori, K., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2001. Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. *Plant Dis.* 85: 1200-1205

Quintero, B., J. Jiménez, P., Gerardo 1992. Control Químico de *Rhizoctonia solani* en Papa en el Valle del Fuerte Sinaloa. Memorias del Congreso Nacional de Fitopatología P. 89

Rodríguez, L.V. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Morelos. México. 105 p.

Romero, C. S. 1998. Hongos fitopatógenos. Parasitología Agrícola Universidad Autónoma Chapingo. México 347 p.

Sneh, B. burpe, L. Ogashi A. 1991 Identification of *Rhizoctonia* Species ADS PREES The American. Phytopathological Society St. Paul, Minesota, Estados Unidos de Norte América. 133 p.

Velásquez – Valle R; y Medina – Aguilar, M. 2003. Pudrición de la raíz del chile (*C. annum* en el norte y centro de México. Ed. Limusa. México. 51p.

CAPITULO 3

MANEJO BIOLÓGICO DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO Y MARCHITEZ DEL CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P).

RESUMEN

Se evaluó la influencia de cuatro productos biológicos comerciales en la eficacia de manejo de los hongos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y la mezcla conjunta de los tres hongos en plantas de chile manzano. El producto biológico T-22® (*Trichoderma harzianum*) protegió en un 89% a las plantas de chile manzano contra la infección ocasionada por *Rhizoctonia solani* (pudrición de cuello y raíz), mientras que el Bio-Raíz® redujo a dicho patógeno en un 64%. La Endo-Rhyza® (D2) (hongos micorrizicos arbusculares) en su dosis mas alta protegió en un (80%) a las plantas de chile manzano de la infección de *Phytophthora capsici* y en un 73% de la infección causada por la mezcla de los tres hongos, además indujo la altura, rendimiento (numero de flores) y peso seco mayores en las plantas de chile inoculadas con *P. capsici*. La aplicación del producto biológico Bio-Raíz® protegió en un 100% a las plantas de chile manzano (*Capsicum pubescens*) de la infección ocasionada por *Fusarium oxysporum*.

**BIOLOGICAL MANAGEMENT OF ROOT ROT, STEM BASE ROT AND CHILE
MANZANO (*Capsicum pubescens* R & P) WILTING**

ABSTRACT

The influence of four commercial biological products in the effectiveness of management of the fungus *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and the combined fungi mix of the three fungus was evaluate in "chile manzano" plants. The product T-22® (*Trichoderma harzianum*) protected in a 89% to the "chile manzano" plants of the infection caused by *Rhizoctonia solani* (stem base rot and root rot), while the Bio-Raíz® reduced at the same pathogen in 64%. The Endo-Rhyza® (D2) in the high doses protected in 80% to the "chile manzano" plants of the infection caused by *Phytophthora capsici* and in 73% of the infection caused by the fungi mix of the three fungus, besides increasing height, dry weight and number of flowers in the "chile manzano" plants inoculated whit *P. capsici*. The application of the biological product Bio-Raíz® protected in 100% to the "chile manzano" plants of the infection caused by *Fusarium oxysporum*.

1. INTRODUCCIÓN

Para el control de fitopatógenos importantes que atacan plantas de interés económico como el chile (*Capsicum pubescens*), es necesario utilizar estrategias diferentes al uso de fungicidas, para disminuir tanto la resistencia de los organismos causantes de la enfermedad, la contaminación y la amenaza que podrían representar los residuos químicos en los alimentos. Una alternativa viable es el control biológico, que es el uso de microorganismos antagonistas o sus subproductos (bacterias y hongos) que puedan controlar directa o indirectamente a los organismos causantes de la enfermedad. El control biológico como medida no química se ha reportado tan efectivo como el control químico teniendo variaciones en su eficacia si no se tiene conocimiento tanto del fitopatógeno como del agente de control (Stanghellini y Miller 1997). Así mismo el control biológico de fitopatógenos se observa como un fenómeno natural, siendo efectivo y ampliamente aceptado contra insectos y malezas, mientras en el caso de los fitopatógenos del suelo como *R. solani*, *F. oxysporum*, y *P. capsici* se ha encontrado con varios obstáculos (Bashan *et al.*, 1996).

Los biocontroladores han recibido un incremento muy significativo en los últimos 5 años debido al aislamiento y caracterización de cepas nuevas que poseen propiedades fungicidas, tal es el caso del género *Trichoderma*, el cual se considera como uno de los agentes de biocontrol más usados debido a sus propiedades antagónicas a los fitopatógenos de la rizosfera (Alabouvette, C. 1998). En base a lo anterior sería de gran interés fitopatológico realizar investigaciones que permitan evaluar la eficacia de algunos biocontroladores tales como: T22 (*Trichoderma harzianum*), Bio-Raíz (*Bacillus subtilis*), Endo-Rhyza (Contiene hongos formadores de micorrizas del género *Entrophospora colombiana*, *Glumus intraradices*, *G. etunicatum* y *G. clarum*) y 3-4-3 (Biofertilizante que contiene bacterias del género *Bacillus*) vs patógenos de la raíz, cuello y marchitez del chile.

Debido a lo anterior se realizó la presente investigación con los objetivos siguientes:

- Evaluar la eficiencia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* como agentes biocontroladores de patógenos de la raíz, cuello y marchitez del cultivo chile (*Capsicum pubescens*).
- Conocer el comportamiento de los hongos formadores de micorriza Endo-Rhyza (Contiene hongos formadores de micorrizas del genero *Entrophospora colombiana*, *Glumus intraradices*, *G. etunicatum* y *G. clarum*) en el manejo de patógenos de la raíz, cuello y marchitez del chile.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se utilizaron aislamientos obtenidos del municipio Coatepec de Harinas Edo. de México, previamente aislados de pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*C. pubescens*) y purificados por tanto se partió de cultivos de punta de hifa de *Rhizoctonia solani*, monozospórico de *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* y monoconidial de *Fusarium oxysporum*, a los cuales se les determinó su patogenicidad en trabajos anteriores realizados por Rangel-Jiménez y Acosta-Ramos (2005), quienes determinaron a *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* como los agentes causales de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en chile manzano.

2.1 Preparación y cuantificación del inóculo

Los aislamientos de *P. capsici* se sembraron en medio de cultivo V8-Agar (V8A) y *F. oxysporum* y *R. solani* en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para su incremento masivo. Después de 12 días de crecimiento se procedió a la preparación y cuantificación del inóculo de cada uno de los aislamientos, tal y como se indica a continuación.

2.1.1. De *Rhizoctonia solani*

A matraces de 500 mL, llenos con granos de cebada esterilizada por 20 min. a 121° C, se les colocó 3 discos de micelio (de 7mm de diámetro) de *R. solani* y 100 mL de agua destilada esterilizada y se incubaron durante 10 días en oscuridad a 25° revolviéndose homogéneamente para obtener una colonización uniforme de los granos. Una vez que los matraces se colonizaron, las plantas se infectaron con 2% (peso/peso) del grano de cebada colonizado por el hongo (Priyatmojo, *et al* 2001).

2.1.2. De *Fusarium oxysporum*

El contenido de 10 cajas de PDA (cubiertas totalmente por el crecimiento del hongo), se le agregó agua destilada esterilizada y se trituró en una licuadora de uso doméstico para luego aforar la suspensión a un litro. Esta suspensión se colocó en un tamiz para eliminar los trozos grandes y el resto de líquido se pasó a través de una triple malla de manta de cielo. Posteriormente se determinó la concentración de una solución madre de conidios por

triplicado con la ayuda de un hemacitómetro, y se ajustó una concentración a 300,000 conidios $\cdot$ mL⁻¹ de *F. oxysporum* (Morales, 1996).

2.1.3 De *Phytophthora capsici* Leo

En cajas petri con 20 mL⁻¹ de agua destilada esterilizada se colocaron 10 discos de medio de cultivo que contenían micelio de *P. capsici*. Las cuales fueron incubadas a 25° C en condiciones de oscuridad por tres días para inducir la formación de esporangios. Las cajas petri se transfirieron a 10° C durante 1 hora, para después regresarse a 25° C por 90 min, y así provocar la liberación de sus zoosporas (Ramírez y Romero, 1980). Posteriormente se determinó la concentración de la solución madre de zoosporas por triplicado con la ayuda de un hemacitómetro, y se ajustó a una concentración a 10,000 zoosporas $\cdot$ mL⁻¹ (Velásquez, 2003).

2.2. Preparación del material vegetal

Se estableció el semillero con *C. pubescens* en charolas plásticas con sustrato de peat moss en el invernadero del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo. Una vez germinadas y con 2 pares de hojas verdaderas se transplantaron en bolsas de polietileno color negro de dos kilogramos, con suelo esterilizado de una mezcla de tierra negra con tierra de hojarasca en proporción de 1:1.

2.3. Inoculación de los hongos fitopatógenos

Las inoculaciones (15 plantas por tratamiento) se realizaron al suelo, cuando las plantas de chile manzano tuvieron el segundo o el tercer par de hojas verdaderas, se aplicó una suspensión de 30 mL⁻¹ de *Phytophthora capsici* a una concentración 10,000 zoosporas $\cdot$ mL⁻¹, 30 mL⁻¹ de una suspensión de *F. oxysporum* a una concentración 300,000 conidios $\cdot$ mL⁻¹ y 2% del grano de cebada colonizado por *R. solani* (v:v;grano:suelo). La aplicación se efectuó al suelo en cada maceta. Las plantas (una planta por maceta) se transplantaron en bolsas de polietileno color negro de dos kilogramos, las cuales contenían una mezcla (1:1) de suelo de monte y tierra negra que se esterilizó con bromuro de metilo. Las macetas se colocaron bajo condiciones de invernadero con temperatura 25°C $\pm$ 1 y una humedad relativa de 80 $\pm$ 5%. El riego se mantuvo constante (cada 3 días) para todos los tratamientos.

2.4. Aplicación de los biocontroladores

Para la aplicación de los biocontroladores se efectuó conforme las dosis recomendadas para cada producto. **Endo-Rhyza** viene formulada como vermiculita (inoculada con esporas) para aplicarse al semillero antes de colocar la semilla, se recomiendan para charolas de 200 cavidades como mínimo dosis de 1.5 g que contienen 5 esporas por cavidad (de semillero) y la más alta 6.3 g que contienen 20 esporas por cavidad, por lo que se pesaron ambas dosis y se revolvieron con el sustrato para después colocar una semilla de *C. pubescens* por cavidad. El **T22** (*Trichoderma harzianum*) viene formulado como polvo soluble se pesaron en balanza analítica 67.5 g que se diluyeron en 4.5 litros de agua aplicándose 50 mL por maceta al suelo después del transplante y un día después de la inoculación, se realizaron 2 aplicaciones adicionales a los 45 días y 80 días después de la primera aplicación.

El **3-4-3** Es un biofertilizante el cual contiene bacterias del genero bacillus, viene formulado como pellets solubles al agua, se pesaron 112.5 g que se diluyeron en 4.5 litros de agua para aplicar 50 mL a cada maceta al suelo un día después del transplante, posteriormente se realizó 1 aplicación antes de la floración. **Bio-raíz** esta formulado como polvo soluble se pesaron 45 g que se diluyeron en 4.5 litros de agua, para aplicar 50 mL por maceta en una sola aplicación. Algunos de estos biocontroladores se recomiendan aplicaciones adicionales para mayor efecto. Se obtuvieron 7 tratamientos por patógeno de la aplicación individual de los biocontroladores y de la aplicación individual + la combinada de los fitopatógenos (Cuadro 1).

Cuadro I. Diferentes tratamientos para el manejo biológico de los patógenos de la raíz del chile manzano (*C. pubescens*).

<i>Patógeno</i>	<i>Nº Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	1	Endo-Rhyza Dosis 1(D1) + <i>R. solani</i>
	2	Endo-Rhyza Dosis 2 (D2) + <i>R. solani</i>
	3	T22 + <i>R. solani</i>
	4	3-4-3 + <i>R. solani</i>
	5	Bio-Raíz + <i>R. solani</i>
	6	Testigo + <i>R. solani</i>
	7	Testigo absoluto (Sin productos biológicos, ni patógenos)
<i>Phytophthora capsici</i>	1	Endo-Rhyza Dosis 1(D1) + <i>P. capsici</i>
	2	Endo-Rhyza Dosis 2 (D2) + <i>P. capsici</i>
	3	T22 + <i>P. capsici</i>
	4	3-4-3 + <i>P. capsici</i>
	5	Bio-Raíz + <i>P. capsici</i>
	6	Testigo + <i>P. capsici</i>
	7	Testigo absoluto (Sin productos biológicos, ni patógenos)
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	Endo-Rhyza Dosis 1(D1) + <i>F. oxysporum</i>
	2	Endo-Rhyza Dosis 2 (D2) + <i>F. oxysporum</i>
	3	T22 + <i>F. oxysporum</i>
	4	3-4-3 + <i>F. oxysporum</i>
	5	Bio-Raíz + <i>F. oxysporum</i>
	6	Testigo + <i>F. oxysporum</i>
	7	Testigo absoluto (Sin productos biológicos, ni patógenos)

(D1)= Dosis mínima recomendada por el fabricante, (D2) =Dosis máxima recomendada por el fabricante

2.5. Variables evaluadas

Se evaluaron en cada tratamiento las variables siguientes:

Incidencia de la enfermedad. Se considero como en numero de plantas que mostraron síntomas de la enfermedad con respecto al numero de plantas totales muestreadas. Dicha variable se midió semanalmente, hasta la aparición de las primeras flores y se reporto en porcentaje.

Altura de planta. Se llevo acabo con una cinta métrica durante las primeras 4 semanas se tomaron datos cada dos días posteriormente cada 4 días hasta que se observaron flores. La variable se expresó en cm.

Rendimiento. Se midió a través de la cantidad de flores que produjo cada planta.

Peso seco. Se cortaron y se colocaron las plantas en una estufa a 72° C durante 3 días. Posteriormente las plantas secas se pesaron en una báscula analítica. La variable se expreso en gramos (g).

2.6. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, la unidad experimental estuvo constituida por cinco plantas (una planta por maceta), con tres repeticiones.

2.7. Análisis estadístico

Los resultados de incidencia de la enfermedad, altura de planta, rendimiento y peso seco se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) for Windows v8.12.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez (*R. solani*) en plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *R. solani*.

La aplicación del producto T22 ® (*T. harzianum*) redujo significativamente la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez ocasionada por *R. solani*, la cual fue diferente estadísticamente al testigo inoculado (Cuadro 2), ya que mostró un 89% de protección de las plantas contra la infección de *R. solani*. Sin embargo dicho producto biológico (T22) fue similar significativamente a los demás tratamientos, por lo que el hecho de que el T22 haya permitido la incidencia menor de *R. solani*, se puede deber a la actividad antifúngica que posee sobre un amplio espectro de fitopatógenos (Castillejo *et al.*, 2000). Además de ser un organismo que se caracteriza por su rápido crecimiento, involucra competencia y antibiosis, así mismo ejerce interacciones hiperparásitas sobre los hongos fitopatógenos (Kucuk y Kivanc, 2004). Dicha actividad antifúngica que tiene esta especie (*T. harzianum*) se debe a la producción de enzimas como, β -1,6 glucanasas, β -1,4 glucanasas, β -1,3 glucanasas, quitinasas y proteasas que degradan la pared celular de los hongos patógenos (Montero *et al.*, 2000). Por otro lado Jones y Stewart (1997), evaluaron a *T. harzianum* en plantas de lechuga contra el hongo *Sclerotinia minor*, disminuyó la incidencia de la enfermedad en un 50% en comparación con las plantas del tratamiento testigo, lo cual fue estadísticamente igual al tratamiento químico con carbendazim, que mostró una reducción de la enfermedad de un 57% en relación al tratamiento testigo.

Cuadro 2. Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (numero de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *R. solani*.

Tratamiento	Variables			
	Incidencia final (%)	Altura final (cm)	Rendimiento (Nº de flores)	Peso seco (g)
1 Endo-Rhyza (D1)	44ab ^z	29bc	10bc	64a
2 Endo-Rhyza (D2)	41ab	35ab	11b	53ab
3 T22	11b	44a	23a	46ab
4 3-4-3	42ab	33bc	3bc	40b
5 Bio-Raíz	36ab	37ab	11b	41ab
6 Testigo inoculado (planta+ <i>R. solani</i>)	75a	24c	2c	32 b
7 Testigo absoluto (sin hongo)	0.0c*	38ab*	0.0*c	48ab*
DMS	40	10	8	23
r ²	0.15	0.92	0.90	0.74
CV	45	24	28	17

^z valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente de acuerdo a Tukey (P≤0.05).

* El testigo absoluto no se incluyó al hacer el análisis de los demás tratamientos (1, 2, 3, 4,5 y 6) sin embargo, se incluyeron los datos para tener un análisis comparativo mejor.

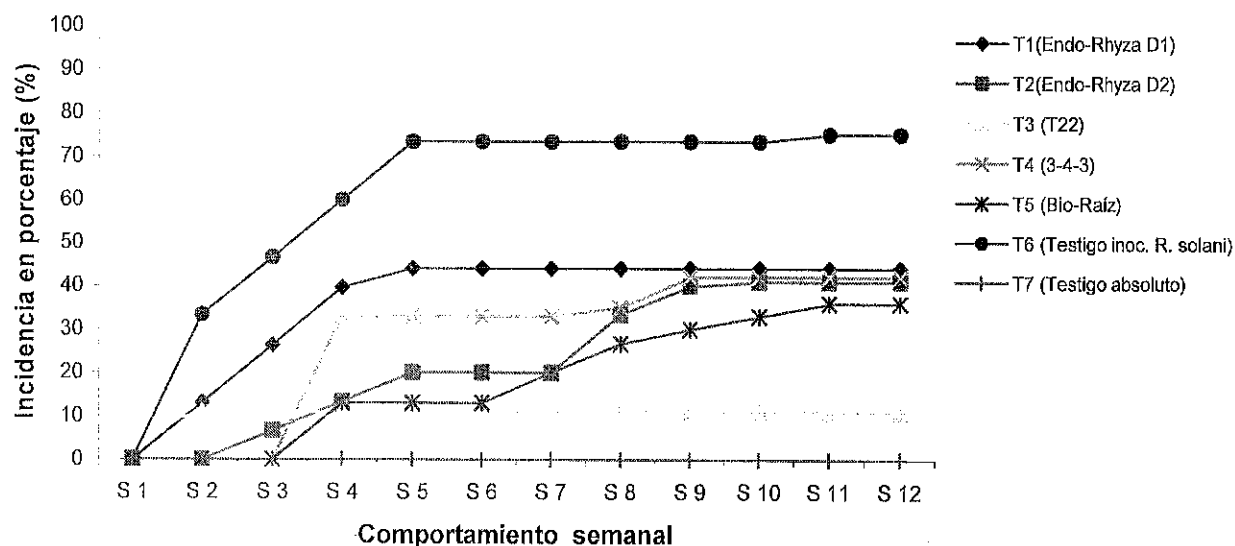


Fig. 1 Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *R. solani*. La aplicación de los demás productos biológicos como Bio-Raíz®, Endo-Rhyza® (D2), 3-

4-3®, y Endo-Rhyza®(D1), mostraron reducciones en la incidencia de 64, 59, 58 y 56% respectivamente 12 semanas después del tratamiento, estos tratamientos fueron estadísticamente iguales entre ellos y con respecto al testigo inoculado (Cuadro 2). La incidencia en las plantas de chile manzano se presentó a partir de la segunda semana (Fig 1), presentando síntomas de estrangulamiento y pudrición rojiza a nivel de cuello y finalmente colapso y muerte de la planta (Fig. 6). La incidencia mayor observada de los productos a base de bacterias *B. subtilis* (Bio-Raíz®, y 3-4-3®), quizás se pudo deber a que el grupo al cual pertenece este patógeno es muy agresivo, por lo que a pesar de que existen reportes de control de *B. subtilis* vs *R. solani* no se tuvo un control eficaz. Al respecto Olsen y Baker, (1986), mencionaron que *B. subtilis* tiene efecto antagónico contra *R. solani* por lisis de micelio, sin embargo, el grado de protección varía con el suelo y el grupo de anastomosis al que pertenezca. La mayor incidencia y escaso control del hongo formador de micorrizas (Endo-Rhyza® D1 y D2) (Fig. 2), quizás se puede deber a que no existe antagonismo entre este y el patógeno *R. solani*, sin embargo la literatura no reporta el uso de los hongos formadores de micorrizas para el manejo de *R. solani*.

3.2. Comportamiento de la altura de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *R. solani*

El análisis de varianza para la variable altura de las plantas tratadas con los diferentes productos biológicos, mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Cuadro 2), lo cual se corroboró en la prueba de tukey en donde se observó que la altura mayor de las plantas se logró con el tratamiento T-22® (*T. harzianum*), con respecto al testigo inoculado con *R. solani*, después le siguieron en orden descendente el Bio-raíz®, Endo-Rhyza® (D2), 3-4-3® y Endo-Rhyza® (D1). La altura mayor lograda con el producto a bases de *T. harzianum* se puede deber a que el producto T-22® (*T. harzianum*), fue el que redujo mayormente la pudrición de raíz, cuello y marchitez ocasionada por *R. solani* y una vez controlada la enfermedad producida por *R. solani*, la planta pudo llevar a cabo sus procesos normales de crecimiento y desarrollo, lo cual se vio reflejado en una altura mayor. Lo antes mencionado coincide con lo reportado por Sánchez *et al.*, (2000), quienes realizaron un estudio para el control del ahogamiento de plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) causadas por *P. phanidermatum* y *R. solani*, en donde observaron que al emplear la dosis máxima del producto biológico TRISAN® (*Trichoderma harzianum*) para el control del ahogamiento, se observó un ligero aumento (11%) en la altura. En contraste, en este mismo estudio los productos Bio-raíz® y 3-4-3® utilizados para el control de la pudrición de cuello, raíz y marchitez ocasionada por *R. solani*, que además de ser agentes de biocontrol se utilizan como biofertilizantes no tuvieron un control bueno de la enfermedad, lo cual se vio reflejado en el poco desarrollo y crecimiento de las plantas de *C. pubescens*. (Fig.2). Sin embargo, en plantas de chile sin inocular mostraron la altura mayor (datos no mostrados) dicho comportamiento fue similar al reportado por Fernández (2006) en plantas de jitomate tratadas con el mismo producto.

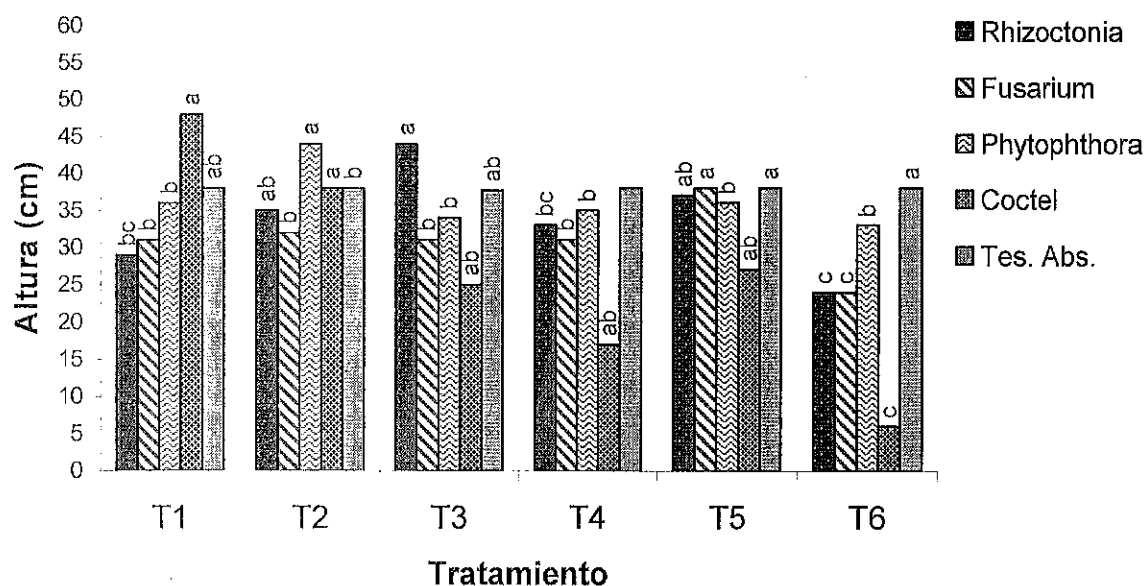


Fig. 2 Altura final (cm) de las plantas de chile manzano tratadas con diferentes productos biocontroladores e inoculadas con diferentes hongos patógenos (*R. solani*, *P. capsici*, *F. oxysporum* y mezcla de hongos o cóctel).

3.3. Comportamiento del rendimiento (número de flores) de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *R. solani*.

El tratamiento T-22 ® a base de *Trichoderma harzianum* fue el que tuvo el rendimiento (número de flores) mayor, ya que presento diferencias estadísticas con ambos testigos y con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 2), este rendimiento mayor obtenido con el T22 se puede deber a que en las variables altura de planta e incidencia fue el mejor tratamiento, lo cual contribuyo a que se expresara en un rendimiento (cantidad de flores) mayor, al desarrollar plantas de vigor mayor que resistieron mejor la infección causada por *R. solani*.

3.4. Comportamiento del peso seco de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *R. solani*.

El uso del producto biológico Endo-Rhyza (D1) fue el que mejor peso seco registro, siendo estadísticamente diferente al testigo inoculado (planta + hongo), y numéricamente mayor a los demás tratamientos (Cuadro 2). Este mantenimiento del peso seco con respecto a las plantas sanas (testigo absoluto) y a los demás biocontroladores (cuadro2), se pudo deber a que la planta al entrar en competencia con el hongo patógeno *R. solani* no llevó acabo totalmente

sus funciones de crecimiento y desarrollo, lo cual se vio reflejado en la disminución del peso seco en un 15% en el testigo inoculado con respecto al testigo sin inocular, por lo que los biocontroladores pudieron actuar como biofertilizantes que es otra de sus propiedades, lo cual pudo contribuir al mantenimiento del peso seco. Además el ligero aumento o mantenimiento del peso seco de la Endo-Rhyza (D1) se pudo deber a que los hongos formadores de micorrizas no sólo son antagonistas de patógenos, si no también aportan nutrientes a las raíces de las plantas que colonizan, por lo que se vio reflejado en un aumento de peso seco en plantas tratadas con estos hongos formadores de micorrizas.

Lo anterior se puede relacionar con Kloepper, *et al* (1981) quienes señalaron que al inocular plantas de chile con MVA (Micorrizas Vesículo Arbusculares), observaron que se puede ahorrar de 50 a 70% del fertilizante fosfatado, lo que induce una proporción mayor de recursos hacia la fructificación y un peso seco mayor. Así mismo Bending y Read (1995), mencionaron que el incremento de la POX (Enzima polifenol –oxidasa) presente en los hongos formadores de micorriza en asociación con las plantas tiene una amplia relación con la movilización de nutrientes del suelo a la planta, induciendo tolerancia mayor a los patógenos y rendimientos mayores.

3.5. Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *Fusarium oxysporum*.

Los tratamientos con Bio-Raíz y Endo-Rhyza (D1) protegieron en un 100% y 98% respectivamente a las plantas de chile manzano inoculadas con *F. oxysporum*, siendo estadísticamente iguales al testigo absoluto (plantas sanas) y diferentes significativamente al testigo inoculado (Cuadro 3). Esto se puede deber a que el genero *Bacillus* ha sido seleccionado en muchas ocasiones como antagonico de *Phytophthora capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* y *Aspergillus niger* (Fucikovsky *et al.*, 1989). Resultados similares han sido reportados por Fillipi *et al* (1987), quienes en un estudio a nivel de laboratorio "In Vitro" para controlar a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* causante de la enfermedad conocida como "Fusariosis" en el cultivo de clavel lo reportaron como susceptible en un 90% a la acción de *B.subtilis*.

Cuadro 3. Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (número de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *F. oxysporum*.

Tratamiento	Variables			
	Incidencia final (%)	Altura final (cm)	Rendimiento (Nº de flores)	Peso seco (g)
1 Endo-Rhyza (D1)	2b ^z	31b	5a	59a
2 Endo-Rhyza (D2)	11ab	32b	7a	40a
3 T22	5ab	31b	3a	72a
4 3-4-3	11ab	31b	2a	54a
5 Bio-Raíz	0.0b	38a	0.0a	66a
6 Testigo inoculado (planta+ <i>R. solani</i>)	25a	24c	4a	43a
7 Testigo absoluto (sin hongo)	0.0b*	27b*	7a*	58a*
DMS	2	5.66	13	59
r ²	0.18	0.96	0.52	0.45
CV	31	14	23	37

^z valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente de acuerdo a Tukey ($P \leq 0.05$).

* El testigo absoluto no se incluyó al hacer el análisis de los demás tratamientos (1, 2, 3, 4, 5 y 6) sin embargo, se incluyeron los datos para tener un análisis comparativo mejor.

Todos los biocontroladores comerciales (Endo-Rhyza®(D2), T22, y 3-4-3®) fueron estadísticamente iguales al testigo inoculado pero diferentes numéricamente, con incidencias bajas de 2, 11, 5 y 11% respectivamente (Cuadro 3), esta incidencia fue mayor durante las primeras tres semanas del experimento (Fig. 3), las plantas muertas presentaron síntomas de clorosis en hojas y raíces con zonas necrosadas y pudriciones de las mismas (Fig. 6), sin embargo esta incidencia fue baja en comparación con otros hongos como *R. solani* o *P. capsici*, los cuales fueron más patogénicos causando incidencias mayores. Esto coincide con lo reportado por algunos autores que han evaluado la aplicación "In Vivo" de estos microorganismos benéficos (*B. subtilis* y hongos micorrizicos) para el control de *Fusarium oxysporum* en cultivos como papaya (Hernandez-Montiel y Escalona 2003), reduciendo así la

incidencia de la enfermedad hasta en un 50% con respecto al testigo (sin organismo benéfico). La incidencia baja de este patógeno se pudo deber a que la cantidad de inóculo utilizado ($300,000 \text{ conidios} \cdot \text{mL}^{-1}$) no fue la suficiente para inducir la enfermedad severamente o quizás pudo perder su patogenicidad, debido a que se realizó varias veces (6-8). Además Romero (1993) menciona que este patógeno es un habitante excelente del suelo, por lo que una vez establecido en él, permanece ahí indefinidamente a través de estructuras de resistencia y eso hace que la planta no presente una muerte súbita pero si pueda afectar a la planta en ciclos posteriores hasta causarle su muerte.

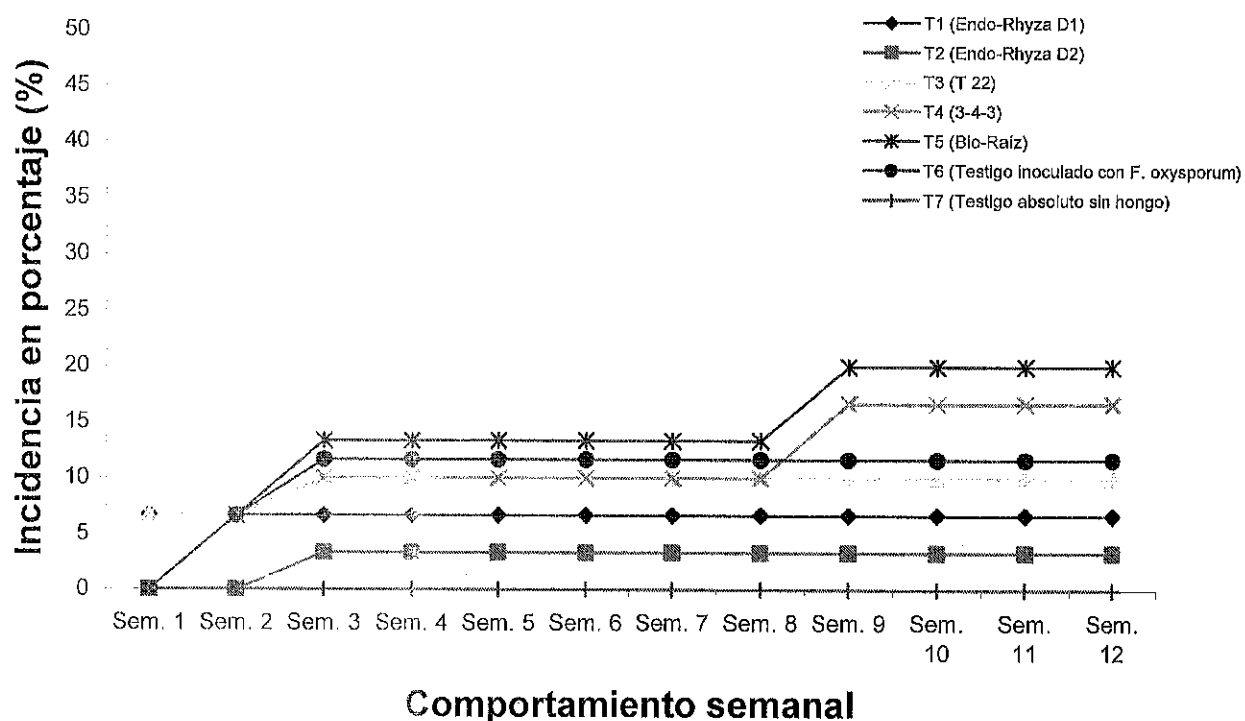


Fig. 3 Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *F. oxysporum*.

3.6. Comportamiento de la altura de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *F. oxysporum*

El tratamiento Bio-Raíz a base de *Bacillus subtilis* fue el que mostró la altura mayor de las plantas de chile manzano, siendo estadísticamente diferente a ambos testigos y a los demás tratamientos (Cuadro 3). La altura mayor se pudo deber a que además de las cualidades antagónicas de *B. subtilis* hacia fitopatógenos del suelo como *F. oxysporum*, también promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas debido a que contiene la fórmula N-P-K (10-4-8), promoviendo el mejor desarrollo y crecimiento de las plantas (Kloepper y Schroth, 1978). Esto coincide con lo reportado por Kommedahl, 1966; Chang, 1968), quienes aplicaron *B. subtilis* en semillas de maíz, logrando reducir la incidencia de *Fusarium roseum*, además de incrementar la altura de las plantas, el vigor y peso húmedo de raíces. La altura de las plantas tratadas con Endo-Rhyza en ambas dosis, T22 y 3-4-3 fueron estadísticamente iguales entre ellos, pero presentaron una altura mayor al testigo inoculado, sin embargo solo fueron mayores numéricamente al testigo absoluto (Cuadro 3). Esta diferencia numérica se pudo deber a la competencia que existió entre el hongo patógeno y los biocontroladores, donde estos últimos tuvieron una adaptación y colonización más o menos adecuada en las raíces de las plantas, lo que permitió el desplazamiento de los microorganismos benéficos, lo cual se reflejó en un aumento ligero de la altura.

3.7 Comportamiento del rendimiento (numero de flores) y peso seco de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *F. oxysporum*.

El análisis estadístico de las variables rendimiento (numero de flores por planta) y peso seco indicó que los tratamientos con Endo-Rhyza® en ambas dosis, T22®, 3-4-3® y Bio-raíz® no presentaron diferencias estadísticas entre ellos, ni con respecto a ambos testigos (Cuadro 3). Este comportamiento quizás se pudo deber a que las condiciones ambientales (luz, temperatura y riego) no fueron óptimas en el desarrollo del patógeno ni de las plantas Bashan *et al.* (1996), sin embargo el peso seco mayor numéricamente fue el obtenido por Bio-Raíz, lo cual se pudo deber a que además fue el que tuvo la incidencia menor así como la altura mayor lo cual se pudo ver reflejado en esta variable.

3.8. Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez del chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *P. capsici*

El tratamiento con Endo-Rhyza® en ambas dosis redujeron significativamente la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez ocasionada por *P. capsici*, la cual fue diferente estadísticamente al testigo inoculado (Cuadro 4), proporcionando una protección de 89% en las plantas de chile (*C. pubescens*). La protección lograda con este producto a base de hongos formadores de micorrizas se puede deber a la cualidad que tienen estas especies para estimular el crecimiento y sanidad de las plantas de chile, a través de la producción de sustancias promotoras del crecimiento y un mejoramiento en la nutrición de las plantas, obteniendo así plantas de vigor mayor que resistieron mejor la infección de *P. capsici*. Resultados similares han sido reportados por Azcón y Barea (1996), quienes observaron que estos hongos formadores de micorrizas protegen y reducen la extensión de las enfermedades producidas por los patógenos de la raíz, principalmente por *Phytophthora* spp. y las ocasionadas por nematodos. A diferencia de los demás biocontroladores (*T. harzianum* y *B. subtilis*), la micorriza tiene ventajas ya que al adicionarse a la raíz de la planta compite con los patógenos al no permitirles obtener alimento. Además en cada punto de unión con la raíz libera antibióticos y fungistáticos que recubren la superficie protegiéndola de hongos y bacterias (Reges, 2000).

Los tratamientos con T22®, 3-4-3®, y Bio-Raíz® fueron estadísticamente iguales entre ellos y con el testigo inoculado, por lo tanto no proporcionaron una protección buena permitiendo una incidencia de plantas muertas de 93, 86 y 60% respectivamente. Los síntomas en las plantas de chile inoculadas con este hongo fueron obscurecimiento y constricción a nivel de cuello (base del tallo) (Fig. 6), ocasionando marchitamiento y muerte de plantas. Durante las primeras tres semanas se observó un incremento en la incidencia de las plantas de chile, para después entre la cuarta y la octava semana registrar un detenimiento (ninguna planta muerta), sin embargo a partir de la novena semana (etapa de floración) se registró un aumento en esta (Fig. 4). Este comportamiento es propio de la enfermedad. Lo cual coincide con lo reportado por Mendoza (1990), quien mencionó que por lo general la muerte de plantas (estrangulamiento) se presenta e incrementa después de la floración con una

incidencia mayor que en preemergencia: la marchitez comienza en los puntos dañados en las hojas, estos se colorean rápidamente, se arrugan y sin que la planta cambie de coloración se marchita.

La protección ineficaz se pudo deber a 1) que los productos biológicos como T22® (*T. harzianum*), 3-4-3® (biofertilizante con bacterias benéficas) y Bio-Raíz® (*B. subtilis*), son productos que principalmente promueven el crecimiento y desarrollo de plantas, 2) que la actividad antagónica se haya visto afectada por una cantidad alta de inóculo ($10,000$ zoosporas $\cdot$ mL $^{-1}$), 3) que el aislamiento de *P. capsici* es muy patogénico, 4) T22® (*T. harzianum*) por ser una especie introducida, no colonizó eficientemente la rizosfera de las plantas de Chile, por lo que no existió parasitismo sobre el hongo fitopatógeno, o bien que la producción de sustancias antagónicas de *T. harzianum* no fueron suficientes para reducir el impacto de *P. capsici* en las plantas (Fernandez 2006). Resultados similares fueron reportados por Lagunas – Lagunas, *et al.* (2001), quienes evaluaron tres cepas de *B. subtilis* contra la marchitez del jitomate (*P. capsici*) y observaron que ninguna de las cepas nativas de *B. subtilis* redujeron la incidencia y severidad de la marchitez ocasionada por dicho hongo, atribuyendo estos resultados a que *B. subtilis* no presentó suficiente producción de sustancias antifúngicas o éstas se produjeron pero no fueron degradadas o quedaron adsorbidas en las partículas del suelo.

Cuadro 4. Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (numero de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *P. capsici*.

Tratamiento	Variables			
	Incidencia final (%)	Altura final (cm)	Rendimiento (Nº de flores)	Peso seco (g)
1 Endo-Rhyza (D1)	11c ^z	36b	9b	51ab
2 Endo-Rhyza (D2)	11c	44a	21 ^a	64a
3 T22	41abc	34b	0.0d	37b
4 3-4-3	66ab	35b	1bcd	47ab
5 Bio-Raíz	50abc	36b	8bc	52ab
6 Testigo inoculado (planta+ <i>R. solani</i>)	100a	33b	0.0d	37b
7 Testigo absoluto (sin hongo)	0.0 c*	38ab*	5bcd*	58ab*
DMS	52	6	8	24
r ²	0.14	0.96	0.91	0.73
CV	66	14	42	17

^z valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente de acuerdo a Tukey (P≤0.05)

* El testigo absoluto no se incluyó al hacer el análisis de los demás tratamientos (1, 2, 3, 4,5 y 6) sin embargo, se incluyeron los datos para tener un análisis comparativo mejor.

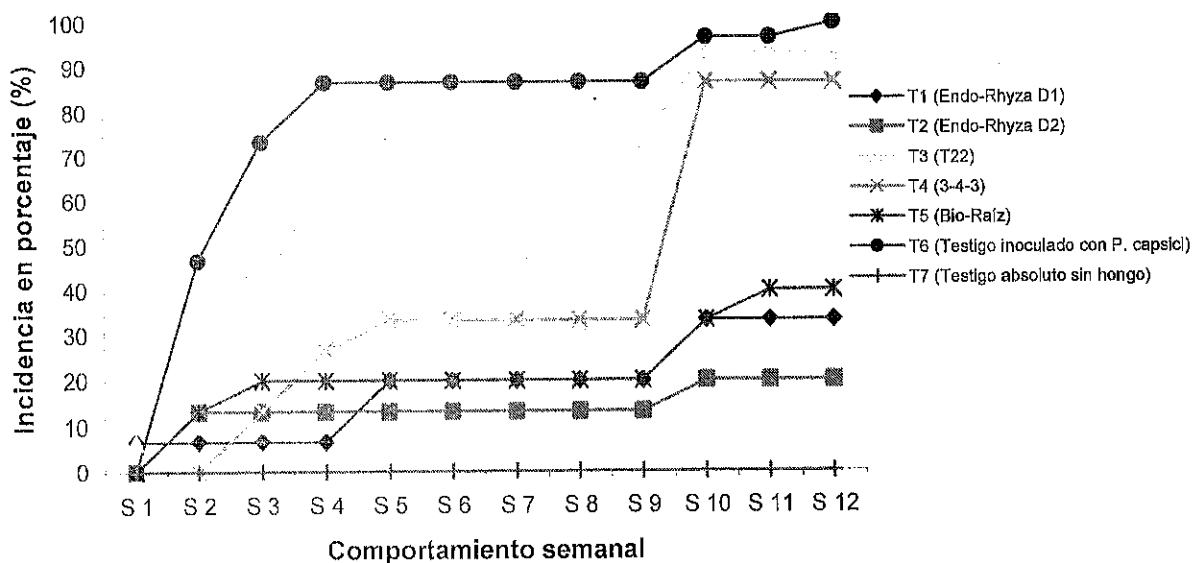


Fig. 4 Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con *P. capsici*.

3.9. Comportamiento de la altura de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *P. capsici*

El tratamiento Endo-Rhyza® (D2) a base de hongos formadores de micorriza presento la altura mayor (44.5%), lo cual fue estadísticamente mayor y diferente a todos los tratamientos (Cuadro 4). Lo anterior se pudo deber a que los hongos formadores de micorrizas tuvieron buena colonización, proporcionando una mayor protección la cual influyo en un desarrollo y altura de planta mayor. Lo anterior fue similar a lo señalado por Reges (2000), quien mencionó que los hongos formadores de micorrizas liberan hormonas de crecimiento, las cuales favorecen el enraizamiento de las plantas e incrementan la superficie de acción de las raíces, favoreciendo una superficie foliar y altura de planta mayor.

Los tratamientos Endo-Rhyza® (D1), T22®, 3-4-3®, y Bio-Raíz® fueron estadísticamente iguales entre ellos y con respecto a ambos testigos. Esta poca eficiencia de estos productos se puede deber a que a pesar de que son productos que principalmente promueven el crecimiento y desarrollo de plantas, no tuvieron una protección buena contra *P. capsici*, lo cual repercutió en la variable altura.

3.10. Comportamiento del rendimiento (número de flores) y peso seco de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con *P. capsici*

El tratamiento Endo-Rhyza® (D2) fue el que proporciono el rendimiento mayor (numero de flores) y peso seco mayor, siendo estadísticamente mayor al testigo inoculado (Cuadro 4). Los resultados de rendimiento y peso seco mayores pueden deber a que los hongos formadores de micorrizas no solo compiten y protegen contra la acción de los patógenos al colonizar las raíces de la planta, si no también aporta nutrimentos que incrementan el rendimiento (cantidad de flores) y peso seco. Esto coincide con lo constatado por Bagyaraj y Sreeramulu (1982) quienes inocularon plantas de chile con hongos formadores de micorrizas (MVA) en almacigo, sin tratar el suelo, seis semanas después lo transplantaron, observando que la inoculación puede sustituir el 50% de la fertilización fosfatada midiendo como respuesta el peso seco de frutos y contenido de ácido ascórbico entre otras variables. A si mismo Bashan *et al.*, (1996), mencionaron que estos organismos incrementan la

disponibilidad de nutrientes para la planta, así como la producción de compuestos como vitaminas, reguladores de crecimiento y antibióticos que contribuyen en el buen desarrollo y obtención de rendimientos altos en los cultivos agrícolas.

3.11. Comportamiento de la incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*)

Los productos biológicos comerciales Endo-Rhyza® (D2) y (D1) fueron los que mayor protección proporcionaron contra la inoculación del coctel (mezcla de hongos), los cuales mostraron reducciones en la incidencia de 73 y 53 % respectivamente, con respecto al tratamiento testigo (inoculado) (Cuadro 5). La incidencia de las plantas con síntomas de la enfermedad e inoculadas con la mezcla de hongos se incremento exponencialmente durante las primeras 3 semanas, presentando síntomas de detención en el crecimiento, ennegrecimiento y constricción de la base del tallo y posteriormente la muerte de plantas (Fig. 6). Los síntomas antes mencionados y la frecuencia alta de reisolamiento de *P. capsici*, indicaron que probablemente el hongo que mayor influencia presento en la muerte de las plantas fue este mismo, y también por que los síntomas observados en la mezcla de hongos fueron iguales, lo cual explica por que el tratamiento más eficaz fuera la Endo-Rhyza® ya que en la inoculación individual de *P. capsici* fue este mismo tratamiento el que mayor protección brindo contra el desarrollo de la enfermedad.

Otra explicación posible sobre la baja eficacia de los otros productos biológicos 3-4-3, T22 y Bio-Raíz® se pudo deber a una alta y agresiva cantidad de inóculo de *P. capsici*, o a una suma de patogenicidad entre los hongos dando como resultado un daño mayor, ya que el tiempo de incubación del hongo fue corto (3 semanas), con respecto a las inoculaciones individuales de cada hongo, durante estas primeras tres semanas se presento la mortandad de plantas (Fig.5). Además de que pudo existir una adaptación mejor a las condiciones ambientales y al hospedante vegetal por parte de los hongos patógenos desplazando así a los organismos benéficos o biocontroladores que no pudieron mantener sus poblaciones activas. Esto coincide con lo mencionado por Bashan *et al.*, (1996) el cual señala que uno de los problemas mas grandes en el control biológico es mantener una población alta y activa de

un agente de biocontrol por todo el periodo de actividad de una enfermedad y deduce que por ello es necesario realizar aplicaciones repetidas del antagonista como estrategia para un control bueno de los patógenos.

Cuadro 5. Comportamiento de la incidencia, altura, rendimiento (número de flores) y peso seco en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*).

Tratamiento	Variables			
	Incidencia final (%)	Altura final (cm)	Rendimiento (Nº de flores)	Peso seco (g)
1 Endo-Rhyza (D1)	47b ^z	48 a	7.66 ab	59.33 a
2 Endo-Rhyza (D2)	27 b	38 a	13.66 a	40.33 ab
3 T22	93ab	25 ab	5.33 ab	17.66 b
4 3-4-3	97ab	17 ab	0.66 b	15.33 b
5 Bio-Raíz	73ab	27 ab	6.66 ab	39.66 ab
6 Testigo(planta+hongo)	100 a	6 c	0.00 b	13.66 b
7 Testigo absoluto	0.00 b*	38 a*	5.66 ab*	58.00 a*
DMS	11.9	12	8.65	26.67
r ²	0.81	0.91	0.78	0.87
CV	36.45	38	53.47	26.77

^z valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente de acuerdo a Tukey (P≤0.05).

* El testigo absoluto no se incluyó al hacer el análisis de los demás tratamientos (1, 2, 3, 4,5 y 6) sin embargo, se incluyeron los datos para tener un análisis comparativo mejor.

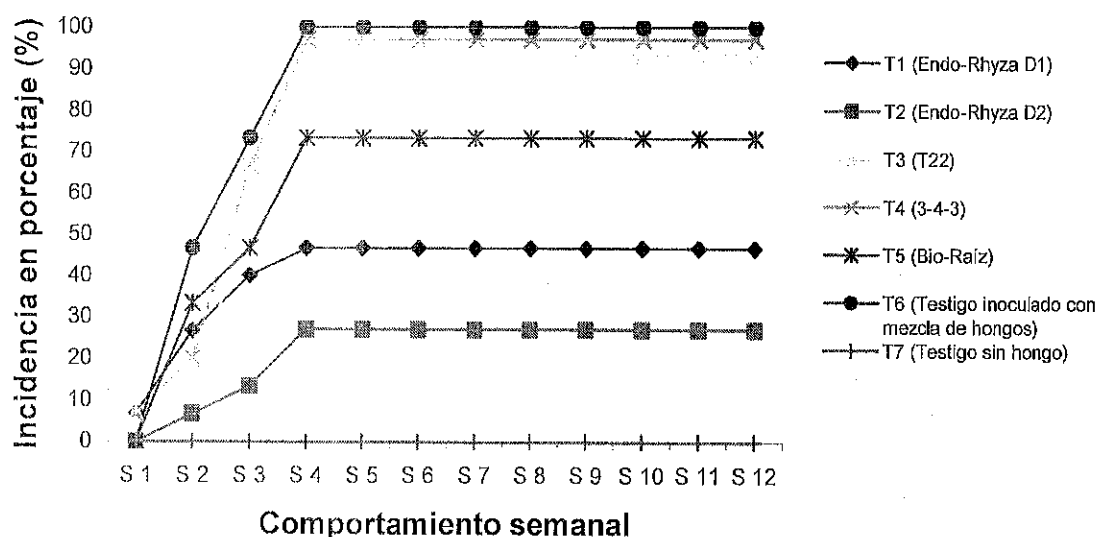


Fig. 5 Incidencia de la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano tratadas con diferentes biocontroladores e inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*).

3.12 Comportamiento de altura de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*).

La altura mayor de plantas se obtuvo con el producto biológico Endo-Rhyza® (en ambas dosis), siendo estadísticamente diferentes al testigo inoculado (Cuadro 5). Esto posiblemente se debió a la colonización eficaz del hongo formador de micorriza el cual provee de una nutrición mayor, y se reflejó en un aumento en la altura. Esto coincide con lo reportado por Bashan *et al.* (1996), quienes mencionaron que al realizar un estudio con hongos formadores de micorrizas y bacterias, atribuyeron a estas una absorción mayor de nutrientes por parte de la planta, a través de un crecimiento mayor de raíces, ya sea mediante la producción de algunas fitohormonas en el caso de bacterias o una exploración mayor en el caso de las hifas de los hongos formadores de micorrizas que modificaron parámetros como son follaje y raíz. Por otra parte, Carreon *et al.* (2000), evaluaron la aplicación de hongos formadores de micorrizas en plantas de zarzamora y encontraron un aumento en la altura de las plantas del 100% con respecto a las plantas sin inocular.

3.13 Comportamiento del rendimiento (número de flores) y peso seco de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con diferentes productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*).

El rendimiento mayor (numero de flores) se aprecio en el tratamiento con Endo-Rhyza® (D2) presentando diferencia estadística con respecto al testigo inoculado y siendo más alto que el testigo absoluto (Cuadro 5). Los incrementos del rendimiento observados en las plantas tratadas con Endo-Rhyza® (D2) quizás se pueden atribuir a la colonización en las raíces de la planta de chile por parte del hongo formador de micorriza, el cual aumentó la absorción de nutrientes minerales por parte de la planta pudiendo ser reflejado en un incremento en el rendimiento. El efecto benéfico proporcionado por estos microorganismos en el aumento de los rendimientos, ha sido ampliamente reportado por Azcon (2000); Bagyaraj y Sreeramulu (1982); Bashan *et al.*, (1996); Escalona *et al.* (2002) y Reges, (2000).

3.14 Comportamiento del peso seco de las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con productos biológicos e inoculadas con la mezcla de hongos (*R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*)

El peso seco mayor lo mostró el tratamiento con Endo-Rhyza® (D1) presentando diferencias estadísticas con respecto al testigo inoculado (Cuadro 5). Este resultado se pudo deber a que una vez que el hongo formador de micorrizas colonizo la raíz y pudo modificar diversos parámetros del follaje y raíz, como se pudo observar al sacar las plantas para llevar a cabo estas mediciones, las raíces mostraron mayor longitud en comparación con las raíces de los demás tratamientos. Esto coincide con lo reportado por Bashan *et al.* (1996), quien mencionó que dichos cambios son atribuidos directamente a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta, dentro de los cuales se ha propuesto la absorción de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ y Fe^{+2} es el factor responsable en incrementar la materia seca total.



Figura 6. Síntomas de los patógenos involucrados en la pudrición de raíz, cuello y marchitez en plantas de chile manzano (*C. pubescens*) tratadas con diferentes biocontroladores y crecimiento de las colonias de partes aisladas: **a)** Efecto de los diferentes biocontroladores (Endo-Rhiza D1, Endo-Rhiza D2, T22, Bio-Raíz, y 3-4-3) en el tratamiento vs. *R. solani*; **b)** pudrición de raíz de donde se aisló *R. solani*; **c)** aislamiento y crecimiento de la colonia de *R. solani* después de 7 días de su siembra; **d)** Efecto de los diferentes biocontroladores (Endo-Rhiza D1, Endo-Rhiza D2, T22, Bio-Raíz, y 3-4-3) en el tratamiento vs. *F. oxysporum*; **e)** estrangulamiento de cuello de donde se aisló a *F. oxysporum*; **f)** aislamiento y crecimiento de la colonia de *F. oxysporum* después de siete días de su siembra; **g)** Efecto de los diferentes biocontroladores (Endo-Rhiza D1, Endo-Rhiza D2, T22, Bio-Raíz, y 3-4-3) en el tratamiento vs. *P. capsici*; **h)** Pudrición, oscurecimiento y desprendimiento de la raíz de donde se aisló *P. capsici* y **i)** aislamiento y crecimiento de la colonia de *P. capsici* después de 10 días de su siembra.

4. CONCLUSIONES

El producto biológico T-22® (*Trichoderma harzianum*) en la dosis de 50 mL (15g de T22 diluidos en 1 litro de agua) por maceta aplicada al suelo después del transplante, protegió en un 89% a las plantas de chile manzano (*C. pubescens*), contra la infección ocasionada por *Rhizoctonia solani* (pudrición de cuello y raíz), mientras que el Bio-Raíz® redujo a dicho patógeno en un 64%.

La Endo-Rhyza® (D2) (hongos micorrizicos arbusculares) en su dosis mas alta (6.3 g que contienen 20 esporas) aplicado al momento de la siembra en el semillero, protegió en un (80%) a las plantas de chile manzano (*C. pubescens*) de la infección de *Phytophthora capsici* y en un 73% de la infección causada por la mezcla de hongos (coctel), además indujo la altura, rendimiento (numero de flores) y peso seco mayores en las plantas de chile inoculadas con *P. capsici*. Esto se debió a que las plantas sobrevivieron a la enfermedad, pero en realidad no incrementaron la altura, quien si lo hizo sustancialmente fue el Bio-Raíz® en plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum*.

El producto biológico Bio-Raíz® a una dosis de 50 mL (2.5 g diluido en un litro de agua) aplicada en cada maceta al suelo un día después del transplante, protegió en un 100% a las plantas de chile manzano (*Capsicum pubescens*) de la infección ocasionada por *Fusarium oxysporum*.

5. LITERATURA CITADA

- Alabouvette, C. 1998. Joint action of microbials for disease control. In: Hall, R.F and Meen, J.J. (Eds). Biopesticides, use and delivery. Human press. New Jersey. USA. pp. 117-135. 625.
- Alarcón, A., y Ferrera- Cerrato, R. (eds.). Mundi Prensa. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. pp 1-15.
- Azcon A., C. y M. Barea J. 1996. Interacciones de las micorizas arbusculares con microorganismos de la rizosfera en micorrizas; recurso biológico del suelo. Guerrero F., E. (Ed) Bogota; Colombia pp. 46-69.
- Azcon, R. 2000. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. *In: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular.*
- Bagyaraj D.,J. y K.R. Sreeramulu 1982. Preinoculation with *Va* micorriza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizar. *Plant and soil* 69:375-381.
- Bashan, Y., Holguin G., y Ferrera-Cerrato R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra* 14(2): 195-210.
- Castillejo M., A., P. Santorum, E. Monte y M. García R. 2000. Influencia de los nutrientes en la expresión de enzimas líticas por cepas de *Trichoderma* utilizadas como Agentes de biocontrol. INC: X Congreso Sociedad Española de Fitopatología, España. 3-6 de Octubre.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-Applications, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, Pages 137-160 in: *Innovative Approaches to Plant Diseases*. I. Chet, ed. John Wiley & Sons, New York.
- Elad Y., I. Chet, P. Boyle, and V. Henis 1983. Parasitismo f *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy *Phytopathology* 73:85-88.
- Escalona, M., Hernandez-montiel, L.G., López M. G., y Fernandez-Herrera, E. 2002. Influencia de la inoculación con *Pseudomonas* sp. y hongos micorrizicos en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Memorias del IV Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Chapingo, México. S-P.
- Fernández-Herrera, E. 2006. Patogenicidad y manejo de la pudrición de raíz y cuello en *Lycopersicon esculentum* Mill. en invernadero. Tesis de Maestría en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 87-93

- Filippi, C; G. Bagnoli; M. Volterrani and G. Picci. 1987. Antagonist effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* Schlench f. sp. *Dianthi* (Prill and Del.) Synd and Hans. Plant and soil 98:161-167.
- Fucikovsky, Z. L.; I. Luna; C. Lopéz. 1989. Bacterial antagonist to *Pseudomonas solanacearum* in potatoes and some ethers Plant pathogenes. Proc. 7th Int. Conf. Plant Pathogens Bacteria. Budapest, Hungry. Z. Klement (Ed.). pp 201-206
- Hernandez -Montiel, L.G, Escalona, M., Zulueta, R., y Muños, a. 2002. Rhyzobacterias supresoras de fitopatógenos y su capacidad de promoción del crecimiento en plantas de *Carica papaya* L. En memorias de IV Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Chapingo, México. S-P.
- Heungens, K., and Parke, J.L. 2001. Post infection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. Phytopathology 91:383-391. Jones, E.E., y Sewart, A. 1997. Biological control of *Sclerotinia minor* in lettuce using *Trichoderma* species. 50th Conference Proceedings of New Zealand Plant Protection Conference. pp 154-158.
- Jones., E. E., y Stewart, A. 1997. Biological control of *Sclerotinia minor* in lettuce using trichoderma species. 50th Coference Proceedings of New Zeland Plant Protection Conference. pp154-158.
- Kloepper, J. W; M.N. Schroth and T.D. Millar. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70:1087-1082.
- Kloepper, J.W., and Schroth, M.N. 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growthand the displacement of root microflora. Phytopatology 71, 1020-1024.
- Kommedahl, T.and Chang, -pin. 1996. Coating corn kernels with microorganism to control seedlings bligt caused by *Fusarium roseum*. Phytopatology 56:885 (Abst.).
- Mendoza, Z. C. 1990. Diagnostico de enfermedades fungosas. UACH. Depto. De Parasitología agrícola Chapingo, México. 47p.
- Montero, M., L. Sanz, I. Grondiona, F. Gonzáles, A. Llobell. Y E. Monte, 2000. Caracterización de izoenzimas y actividades líticas totales em agentes de control biológico del género *Trichoderma*. Departamento de Micriobiología y Genética. Universidad de Salamanca Islã de la Cartuja Sevilla. In: X Congreso Sociedad Española de Fitopatologia. Valencia, España 3-6 de Octubre. 227 p.
- Morales, H.L. 2000. Rango de hospedantes de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, aislado de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ram). 52 p.
- Olsen, C. M: and K.F. Baker. 1968. Selective heat treatment of soil, and its effect on the inihibition on *R. solani* by *Bacillus subtilis*. Phytopathology 58: 79-87.

- Priyatmojo, A., Yotani, Y., Hattori, K., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2001. Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. *Plant Dis.* 85: 1200-1205
- Ramirez, V.J., y Romero, C.S. 1980. Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia* 39:9-18.
- Rangel-Jiménez, V., y Acosta-Ramos, M. 2005. Memorias de XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Chihuahua Chih., México S-P.
- Regés, A. 2000. Micorrizas. Altavista. <http://www.micorriza.laboratorios.net.ar/>
- Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. 347 p
- Sanchez, J.,P. Castillo y E. Gallegos 2000. Control Biológico del ahogamiento de plántulas (*Phythium aphanidermatum*) mediante TRISAN® y LAMINAR®. Departamento de Biología Vegetal y Ecología Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almeida In: X Congreso Sociedad Española de Fitopatología. Valencia España 3-6 Octubre. 225 p.
- Stanghellini, M.E, and R. M. Miller. 1997. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease* 81:4-12.
- Velásquez – Valle r: y Medina – Aguilar, M. 2003. Pudrición de la raíz del chile (*C. annuum* en el norte y centro de México.