

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



Microorganismos antagonistas, cómo agentes de control biológico del “damping off”, en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.), en condiciones *in vitro* e invernadero.

TESIS

Que presenta OMAR JIMÉNEZ PÉREZ

como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Septiembre 2020

Microorganismos antagonistas como agentes de control biológico del "damping off", en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.), en condiciones *in vitro* e invernadero

TESIS

Elaborado por OMAR JIMÉNEZ PÉREZ como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



---

Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Asesor Principal



---

Dr. Melchor Cepeda Siller  
asesor



---

Dr. César Alejandro Espinoza Ahumada  
asesor



---

Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

## **AGRADECIMIENTOS**

A **DIOS**, por darme salud, fortaleza y sabiduría para poder culminar los estudios.

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO** y a sus **PROFESORES** por el apoyo brindado en estos estudios.

Al **DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES**, por haberme dado la oportunidad de trabajar en esta investigación, apoyarme y orientarme en las diferentes actividades realizadas y mejorar día con día.

Al **DR. Melchor Cepeda Siller**, por su colaboración y aportaciones en el desarrollo de la investigación, y sus conocimientos impartidos en clases.

Al **Dr. César Alejandro Espinoza Ahumada**, por su colaboración, aportaciones y apoyo en esta investigación, así como a su valiosa amistad.

Al **CONACyT** por la beca otorgada para hacer estudios de Maestría en **Ciencias en Paracitología Agrícola**

## DEDICATORIA

A mis padres por darme siempre apoyo y sus consejos.

A mis abuelitos por darme siempre su amor, apoyo y consejos.

A mi tía Liduvina Jiménez Hernández, por darme siempre su apoyo, sus consejos y ser un ejemplo a seguir.

A mis hermanos, ya que hemos vivido muchos momentos que quedan para ser recordados en nuestras reuniones y estar siempre unidos.

A mis amigos y compañeros Carolina Delgado Luna, Ama maría González Merino, Jonathan Guadarrama Velázquez, José Ángel Gutiérrez Ramírez, César Alejandro Espinoza Ahumada y Mónica Limón Corona.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA .....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
RESUMEN .....	1
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
Justificación .....	5
Objetivos específicos .....	5
Hipótesis.....	5
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
El cultivo del chile.....	6
Importancia en México .....	7
Clasificación taxonómica.....	8
Producción de plántula .....	8
Plagas y enfermedades .....	12
Mosquita blanca ( <i>Bemisia tabaci</i> ) .....	12
Mosca negra o fungus gnat ( <i>Bradysia</i> spp.).....	13
Damping off .....	13
Descripción de los principales fitopatógenos causantes del “damping off” . .....	15
<i>Pythium</i> spp. ....	15
<i>Fusarium</i> spp. ....	19
Métodos de control del “damping off” .....	23
<i>Trichoderma</i> spp.....	24
<i>Bacillus</i> spp.....	26
<i>Pseudomonas</i> spp. ....	27
Solubilizadores de fosfatos .....	29
Interacción entre mezclas de microorganismos de biocontrol .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>

Ubicación del experimento .....	32
Material biológico .....	32
Aislamiento e identificación de fitopatógenos causantes del “damping off” .....	32
Identificación de <i>Pythium</i> sp., y <i>Fusarium</i> sp. ....	33
Pruebas de patogenicidad .....	34
Incremento de microorganismos .....	35
Antagonismo <i>in vitro</i> entre bacterias antagonicas y los fitopatógenos .....	36
Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> “THZ” contra fitopatógenos .....	37
Efectividad biológica de <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Trichoderma</i> en el control del “damping off” en plántulas de chile .....	38
Manejo agronómico de plántulas de chile .....	39
Evaluación de la actividad de microorganismos benéficos para el control del “damping off” en plántulas de chile producidas en charolas bajo condiciones de invernadero .....	40
Evaluación de la mortalidad de las plántulas 25 días después del trasplante .....	40
Análisis estadístico .....	41
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	42
Agentes causantes del “damping off” en plántulas de chile .....	42
Antagonismo <i>in vitro</i> de bacterias contra agentes causales del “damping off” .....	49
Evaluación del antagonismo entre <i>T. harzianum</i> y los fitopatógenos .....	53
Compatibilidad entre especies antagonistas .....	55
Efectividad biológica de <i>B. subtilis</i> , <i>P. donghuensis</i> y <i>T. harzianum</i> al “damping off” en premergencia y postmergencia en plántulas de chile ..	56
Evaluación de la incidencia y severidad de las plántulas de chile infestadas con los fitopatógenos a 25 días después del trasplante. ....	58
<b>CONCLUSIONES</b> .....	62
Literatura Citada .....	63
<b>ANEXOS</b> .....	83

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1:</b> Tratamientos utilizados para estudiar la capacidad antagonista de los fitopatógenos causantes del “damping off” de plantulas de chile.....	37
<b>Tabla 2:</b> Tratamientos antagonicos para fitopatogenos causantes de “damping off” para plantas cultivadas e inoculadas en charolas de unicel en invernadero. ....	39
<b>Tabla 3:</b> Inhibición de <i>Bacillus</i> spp y <i>Pseudomonas donghuensis</i> a <i>Fusarium oxysporum</i> en placas de cultivo.....	51
<b>Tabla 4:</b> Inhibición de <i>Bacillus</i> spp y <i>Pseudomonas donghuensis</i> a <i>P. aphanidermatum</i> en placas de cultivo.....	53
<b>Tabla 5:</b> Porcentaje de incidencia de “damping off” en preemergencia y postemergencia de plántulas de chiles infestadas con <i>P. aphanidermatum</i> en invernadero.....	83
<b>Tabla 6:</b> Porcentaje de incidencia de “damping off” en preemergencia y postemergencia de plántulas en charolas infestadas con <i>F. oxysporum</i> en invernadero.....	83
<b>Tabla 7:</b> Porcentaje de incidencia de “damping off” en preemergencia y postemergencia de plántulas en charolas infestadas con la mezcla de los fitopatógenos en invernadero.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Procedimiento para el aislamiento de los fitopatógenos causantes del “damping off” en plántulas de chiles.....	33
<b>Figura 2:</b> Aislamiento de fitopatógenos causantes de “damping off” . ....	42
<b>Figura 3:</b> Observación microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	43
<b>Figura 4:</b> Observación microscópica de <i>Pythium aphanidermatum</i> .....	44
<b>Figura 5:</b> Prueba de patogenicidad en preemergencia.....	46
<b>Figura 6:</b> Prueba de patogenicidad en postemergencia.....	48
<b>Figura 7:</b> Confrontación <i>in vitro</i> de las diferentes cepas de bacterianas contra <i>F. oxysporum</i> a los seis días.....	50
<b>Figura 8:</b> Confrontación <i>in vitro</i> de las diferentes cepas bacterianas contra <i>P. aphanidermatum</i> a las 48 horas.....	52
<b>Figura 9:</b> Confrontación <i>in vitro</i> entre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Pythium aphanidermatum</i> .....	54
<b>Figura 10:</b> Confrontación <i>in vitro</i> entre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	54
<b>Figura 11:</b> Confrontación entre microorganismos benéficos.....	56
<b>Figura 12:</b> Incidencia del “damping off” en pree y postemergencia de las plántulas de chile infestadas con dos fitopatógenos en invernadero.....	58
<b>Figura 13:</b> Evaluación de la incidencia del “dampin off” causado por <i>Pythium aphanidermatum</i> , a los 42 días despues de la germinación.....	84
<b>Figura 14:</b> Evaluación de la incidencia del “dampin off” causado por <i>Fusarium oxysporum</i> , a los 42 días despues de la germinación.....	85



<b>Figura 15:</b> Evaluación de la incidencia del “dampin off” causado por la mezcla de <i>Pythium aphanidermatum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> , a los 42 días después de la germinación.....	85
<b>Figura 16:</b> Incidencia, severidad aérea y de la raíz a los 25 días después del trasplante de las plántulas de chile.....	59
<b>Figura 17:</b> Evaluación de la incidencia y severidad de plantas infestadas con <i>P. aphanidermatum</i> a los 25 días después del trasplante.....	60
<b>Figura 18:</b> Evaluación de la incidencia y severidad de plántulas infestadas con <i>F. oxysporum</i> y tratadas con <i>Bacillus subtilis</i> (BITV) y <i>T. harzianum</i> (THZ) a los 25 días después del trasplante.....	86
<b>Figura 19:</b> Evaluación de la incidencia y severidad de plántulas infestadas con <i>F. oxysporum</i> y <i>P. aphanidermatum</i> y tratadas con <i>T. harzianum</i> (THZ) y <i>P. donghuensis</i> (B?) a los 25 días después del trasplante.....	87
<b>Figura 20:</b> Tratamientos Testigos de “damping off” a los 25 días después del trasplante.....	61
<b>Figura 21.</b> Tratamiento de <i>T. harzianum</i> mas <i>P. donghuensis</i> (THZ+B?) de plantas infestadas con <i>P. aphanidermatum</i> - <i>F. oxysporum</i> del experimento a 25 días después del trasplante.....	61

## RESUMEN

Una de las principales limitantes en la producción de plántulas es la enfermedad llamada “damping off”, la cual se asocia a los fitopatógenos *Pythium* y *Fusarium*, entre otros, ocasiona pérdidas del 10 hasta el 100%. Para su control en los últimos años se han empleado microorganismos antagonistas, como bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y hongos del tipo *Trichoderma*. Se planteó identificar a los principales agentes causantes del “damping off” en plántulas de Chile, evaluar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma*, *Pseudomonas* y *Bacillus* a estos fitopatógenos y determinar su eficiencia de control en plántulas de Chile bajo condiciones de invernadero. Se identificó a *Pythium aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum* como agentes causales de la enfermedad. Las pruebas *in vitro* demostraron que las cepas de *Bacillus* spp inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* destacando *Bacillus subtilis* (BITV) con una inhibición del 56.24%, sin embargo, estas no tuvieron efecto contra *P. aphanidermatum*, solo la cepa de *Pseudomonas donghuensis* (B?) fue capaz de inhibir en un 56.00% el crecimiento micelial del oomiceto, pero no el de *F. oxysporum*, por su parte, la cepa de *Trichoderma harzianum* (THZ) inhibió el crecimiento de ambos fitopatógenos, ubicándose en el nivel 1 y 2 de la escala propuesta por Bell *et al.*, (1982).

Se demostró que la aplicación de microorganismos antagonistas en la producción de plántulas de Chile en invernadero, obtuvieron las menores incidencias con respecto a los tratamientos Testigo, siendo el tratamiento THZ+B? del experimento de la mezcla de fitopatógenos el que presentó la menor incidencia (19.17% y 14.44%) en preemergencia y postemergencia, además de que estas presentan la menor mortalidad después del trasplante (0%), por lo que son una alternativa viable para el control del “damping off”.

**Palabras clave:** damping off, microorganismos antagonistas, *in vitro*, preemergencia y postemergencia.

## ABSTRACT

One of the main limitations in seedling production is the disease caused by “damping off”, which is associated with the phytopathogens *Pythium* and *Fusarium*, among others, which causes losses of 10 to 100%. For its control in recent years, antagonistic microorganisms have been used, in which some bacteria of the genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* and fungi of the genus *Trichoderma* are mentioned. It was proposed to identify the main agents that cause “damping off” in chili seedlings, to evaluate the *in vitro* antagonism of *Trichoderma*, *Pseudomonas* and *Bacillus* to phytopathogen species and to determine their efficacy in chili seedlings under controlled greenhouse conditions. *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* were identified as causative agents of the disease. *In vitro* tests showed that the *Bacillus* strains inhibited the growth of *F. oxysporum* highlighting *Bacillus subtilis* (BITV) with an inhibition of 56.24%, however, these did not had an effect against *P. aphanidermatum*, only the strain of *Pseudomonas donghuensis* (B?) was able to influence 56.00% the mycelial growth of the oomycete, but not that of *F. oxysporum*, for its part, the strain of *Trichoderma harzianum* (THZ) inhibited the growth of both phytopathogens, being at level 1 and 2 of the proposed by Bell *et al.*, (1982).

It was shown that the application of antagonistic microorganisms in the production of chili seedlings in the greenhouse, obtained the lowest incidences with respect to the control treatments, being, the one that presented the lowest incidence (19.17% and 14.44%) in pre-emergency and post-emergency, in addition to the fact that these present the lowest mortality after transplantation (0%), so they are a viable alternative for the control of “damping off”.

**Key words:** damping off, antagonistic , microorganisms, *in vitro*, pre-emergency and post-emergency.

## INTRODUCCIÓN

México es considerado como uno de los principales centros de origen del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) (Montes *et al.*, 2006). Este cultivo es de gran importancia para el país, ya que se siembran actualmente una densidad de 157 931.37 ha, con una producción de 3 379 289.15 toneladas, generando ingresos de \$30 063 163 000. 92 (SIAP, 2018), con un crecimiento anual del 4.8% (SAGARPA, 2017). Las exportaciones de este fruto generan un total de 789 millones de dólares anuales, ubicándose como el tercer producto agrícola de mayor exportación del país (SAGARPA, 2018).

En la producción de plántula una de las principales limitantes es la ocasionada por el complejo de fitopatógenos causantes del “damping off” en los que se encuentra, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, entre otros. Se considera que esta enfermedad ocasiona daños en etapa de preemergencia y postemergencia desde un 10% hasta el 100%, en ocasiones esta puede ocasionar pérdidas después del trasplante (López *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2018).

En años recientes el control biológico de fitopatógenos mediante la aplicación de algunos microorganismos antagonistas como, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp., ha tomado particular relevancia (Asaka *et al.*, 1996; Gravel *et al.*, 2005; Figueroa, 2017). Los microbios son capaces de producir antibióticos como los son iturina y surfactina (Asaka *et al.*, 1996), pioluteorina, pirrolnitrina, ácido fenazina-1-carboxílico y 2,4- diacetilfloroglucinol, y algunos metabolitos secundarios como cianuro de hidrógeno y proteasas, capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos (Sharma *et al.*, 2014; Chávez *et al.*, 2018). Kipngeno *et al.*, (2015) reportan disminuir en un 40% la incidencia de la enfermedad mediante aplicaciones de *Trichoderma asperellum* y *Bacillus subtilis*. Por su parte, Villanueva (2018) redujo la enfermedad causada por *Pythium* mediante aplicaciones de *T. asperellum* al mismo nivel que la aplicación de

fungicida químico (Propanocarb + Fosetil), mientras Hernández *et al.*, (2018) en plántulas de chile muestra inhibir la enfermedad en un 80 y 100% mediante aplicaciones de dos cepas de *Pseudomonas*.

Se ha demostrado la capacidad de estos microorganismos de promover el crecimiento de las plantas, mediante la producción de algunos compuestos hormonales, entre ellas el ácido indolacético, solubilizar o fijar algunos nutrientes como lo son el fosforo y nitrógeno, producir sideroforos para quelatar el hierro (Harman *et al.*, 2004; Tejera *et al.*, 2011).

Se reporta también que existe un mayor beneficio al realizar aplicaciones conjuntas de diferentes antagonistas, que cuando son aplicados de manera individual (Bautista *et al.*, 2014), ya que la interacción de estos microorganismos entre sí puede producir efectos sinérgicos (Cano, 2011).

## **Justificación**

Microorganismos como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., y *Trichoderma* spp., tienen potencial antagonista, en particular, pueden ser capaces de controlar la enfermedad de plántulas de Chile conocida como “damping off”. El uso del control biológico es una alternativa amigable con el medio ambiente, sin efectos nocivos a la salud de las personas y puede ayudar al manejo de la resistencia a fungicidas en los fitopatógenos asociados a la enfermedad.

## **Objetivos específicos**

- 1- Aislar e identificar los principales fitopatógenos causantes del “damping off”, en plántulas de Chile (*Capsicum annuum* L.).
- 2- Evaluar el antagonismo *in vitro* con diferentes especies de antagonistas, para fitopatógenos causantes del “damping off”.
- 3- Determinar en condiciones de invernadero la efectividad biológica de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* al “damping off”, en etapa de plántula y su comportamiento al momento del trasplante.

## **Hipótesis**

Algún microorganismo antagonista o mezcla de ellos, mostrará la capacidad de inhibir la enfermedad conocida como “damping off” en plántulas de Chile en invernadero.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### El cultivo del chile

El chile (*Capsicum* sp.) es originario del continente americano siendo los principales centros de origen México, la cuenca del amazonas, Bolivia y Perú. Se cree que su domesticación ocurrió hace unos 8000 años, cuando nuestros antepasados lo utilizaban principalmente como condimento, medicamento, en castigos, moneda, ofrendas en tributos, entre otros (Montes *et al.*, 2006). Este Género incluye 33 especies y 10 variedades silvestres, cultivables y semicultivadas. Entre las principales especies se encuentran *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens*, las cuales varían en sus características fenotípicas, como la morfología de sus flores ó frutos, las cuales ayudan para la diferenciación entre especies (Montes *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2015).

La especie *Capsicum annuum* Var. *annuum*, es la especie más conocida y de mayor importancia económica debido a que es la más cultivada y la cual presenta una distribución mundial y la de mayor variabilidad genética y morfológica (Montes *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2015). Esta es una planta herbácea de coloración verde, con tallos erectos ramificados, de una altura promedio de 60 cm, con hojas ovoides simples, posee flores hermafroditas de una coloración blanca o purpura las cuales se forman en las axilas de las ramas y posee un sistema radicular el cual puede alcanzar una longitud de 1.20 m (SAGARPA, 2017), sus frutos varían de color verde, amarillo, anaranjados, cafés y rojos, de tamaño muy pequeños o grandes y pueden ser de forma cónica, redonda o alargada (Montes *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2015). Requiere climas cálidos para su producción, siendo afectadas por las bajas temperaturas, teniendo un rango de temperatura optima de 12- 32 °C, la cual dependerá de la especie a cultivar. Requieren de suelos de textura media con buen drenaje, rico en materia orgánica con una conductividad eléctrica que no sobrepase los 3.5 Ds/cm<sup>-1</sup>. Se han

encontrado especies de chile creciendo y desarrollándose hasta los 2500 msnm (SAGARPA, 2017).

México alberga la mayor diversidad de chiles, siendo los más conocidos el chile Jalapeño, Ancho, Guajillo, Pasilla, Serrano, Manzano, Habanero, de Árbol y Piquín, el resto solo son conocidos a nivel regional (Aguilar *et al.*, 2010).

### **Importancia en México**

El cultivo de chile en México, es de suma importancia tanto de manera económica, nutricional y cultural (esto por ser el centro de origen de algunas especies) (INIFAP, 2008). Además, México es el país que cuenta con mayor variabilidad genética de este Género, la cual es utilizada para el mejoramiento de la resistencia de variedades para el manejo de plagas y enfermedades (Latournerie *et al.*, 2001).

México se ha caracterizado por ser uno de los principales productores y consumidores de chiles, el consumo de este fruto se ha conservado desde tiempos prehispánicos (INIFAP, 2008), con un consumo per capital 16 kg de chiles verdes al año (SAGARPA, 2016).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en la producción de chiles (SAGARPA, 2016), con un total de 157 931.37 ha, de las cuales solo 8 634.84 son de temporal, y una producción de 3 379 289.15 millones de toneladas al año, generando ingresos de 30 063 163 000.92 (SIAP, 2018), de las cuales se exportan el 30.7%, y este a su vez es el 8° cultivo que genera mayores ganancias a la agricultura aporta el 3.50% del PIB agrícola, con un crecimiento del 4.8% anual. México en el 2016 exporto 986.5 millones de toneladas principalmente a EUA con 982 Mt., seguido de Canadá, Guatemala y España, así la demanda de esta hortaliza se ha incrementado hasta en 20 países (SAGARPA, 2016; SAGARPA, 2017). La exportación de chiles se ubica en el quinto puesto de los principales productos exportados del país y el tercer puesto en el sector agrícola solo por detrás del tomate y el aguacate, generando en el periodo de enero-



agosto del 2016, los 789 millones de dólares, lo que representó un aumento en términos anuales de 31.6%, uno de los crecimientos más destacados de este grupo (SAGARPA, 2018).

Los estados con mayor superficie y producción de chiles son Zacatecas con 38 229.50 ha y 423 757.02 ton., Chihuahua 28 308.42 ha y 676 462.51 ton., San Luis Potosí 23 876.20 ha y 327 422.72 ton., y Sinaloa 17 814.81 ha y 858 543.89 ton (SIAP., 2018). Siendo las principales variedades cultivadas Jalapeño, Serrano, Poblano, Pimiento morrón y Habanero (SAGARPA, 2015).

### **Clasificación taxonómica**

Según Pérez *et al.*, (2015), la clasificación aceptada por el GRIN en 2014 es la siguiente:

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Asteridae

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanácea

**Género:** *Capsicum*.

**Especie:** *C. annuum*,  
*chinense*, *baccatum*,  
*frutescens*, etc.

### **Producción de plántula**

Para la producción de plántula se emplean principalmente los métodos de producción de plántula en almácigos y producción de plántula en charolas en invernadero.

**Producción de plántula en almacigos:** estos son pequeñas superficies de unos 10 m de largo por 1 m de ancho, empleadas para la producción de plántula, al ser una superficie pequeña es más fácil proporcionar las condiciones necesarias para la germinación y desarrollo de las plántulas para posteriormente ser trasplantadas. Al ser una superficie pequeña es más fácil mantener un control de la humedad del suelo y de la temperatura, además de facilitar el control de plagas y enfermedades. Proporciona plántulas de una calidad y tamaño más uniforme, reduce el tiempo a cosecha al minimizar el tiempo de desarrollo vegetativo del cultivo en el terreno definitivo (Ramiro, 2003; <sup>a</sup>Reveles *et al.*, 2010).

El lugar para establecer el almacigo deberá contar con buena disposición de luz del sol y un suelo con una buena pendiente para evitar los encharcamientos. El suelo debe ser de una textura porosa para evitar que este se endurezca con facilidad, con la finalidad de favorecer el desarrollo de las raíces y evitar las pérdidas de plántulas al momento de ser arrancadas para ser trasplantadas al campo definitivo (Ramiro, 2003; <sup>a</sup>Reveles, *et al.*, 2010).

Una de las practicas realizadas antes de la siembra de la semilla es la desinfección del suelo para el control de plagas y enfermedades mediante la aplicación de algunos productos químicos o mediante la técnica de solarización. La siembra de la semilla se realiza en pequeños surcos a una distancia de 10 cm de separación, por lo general se utilizan de 600 a 800 g para producir plántula para una hectárea, posteriormente se cubre la semilla con tierra y se le da un riego, posteriormente este se cubre con alguna manta para evitar la desecación. Es aconsejable que los almacigos se cubran con mantas durante los periodos críticos de temperaturas que puedan afectar el desarrollo de la plántula (Ramiro, 2003; <sup>a</sup>Reveles, *et al.*, 2010).

Para un buen desarrollo de la plántula es recomendable la aplicación de fertilizantes de manera balanceada, esto 2 veces por semana, la primera aplicación de fertilizantes se realiza cuando la plántula tenga las 2 primeras hojas verdaderas. Se recomienda que antes del trasplante la planta se someta a riegos

ligeros y se exponga a la luz del sol durante 10 días para que “endurezcan” y recientan menos el estrés al ser trasplantadas (<sup>a</sup>Reveles, *et al.*, 2010).

**Producción de plántulas en charolas en invernadero:** esta aumentado debido a que con este método se garantiza una mejor producción al contar con un ambiente controlado y con las condiciones para que la planta manifieste un mejor desarrollo, a de más de que se garantiza una planta con buen desarrollo radicular para ser trasplantada y esta rápidamente se adapte al terreno (Ramiro, 2003; Guerrero, 2010).

Se requiere contar con semilla de buena calidad para evitar pérdidas de germinación. Antes de la siembra se debe de desinfectar tanto las charolas de poliestireno, el lugar donde se mantendrán estas para su germinación y el lugar donde serán colocadas después de su germinación, esto se realiza utilizando algunos productos como sales cuaternarias de amonio, yodo, cloro metam sodio entre otros (<sup>b</sup>Reveles *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2015).

Posteriormente se debe de seleccionar el tipo de sustrato a utilizar el cual tiene la finalidad de brindarle a la planta las condiciones adecuadas para su desarrollo, los sustratos deben de tener las cualidades de una buena consistencia y porosidad, un buen drenaje, ser inocuo, alta capacidad de retención de agua (50 a 60%) y nutrientes, y un pH de 5 a 7.5, un sustrato con estas características garantiza que las raíces de las plantas queden envueltas en un cepellón lo cual facilita su supervivencia y adaptación al momento del trasplante (<sup>b</sup>Reveles *et al.*, 2010). Para la preparación del sustrato por lo general se realiza una mezcla de este con vermiculita, se debe humedecer con agua en una relación de 1:1 para evitar que este quede muy saturado lo cual puede afectar la germinación, adicionalmente se le puede adicionar algunos fungicidas, microorganismos benéficos como *Trichoderma* sp., enraizadores o fertilizantes. Enseguida se llenan las charolas con el sustrato, las cuales pueden ser de 200, 240, 338, etc. cavidades, se pasa el rodillo para formar las cavidades aproximadamente de 1 cm de profundidad y posteriormente se colocan las semillas, se recomienda utilizar semilla de buena calidad para colocar solamente una semilla por cavidad,

posteriormente tapadas con sustrato y llevadas al área de germinación donde se apilan en grupos máximo de 10 charolas y se cubren con plástico negro, el lugar de germinación debe tener una temperatura de 25 a 28°C, una humedad relativa del 60 al 80% y una oscuridad del 80 a 90% (Guerrero, 2010; <sup>b</sup>Reveles *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2015).

La germinación varía dependiendo de la especie y las condiciones ambientales, para el caso de los chiles serrano esta ocurre a partir del 5° día, en el caso del chile pasillo esta ocurre a los 7 días (Guerrero, 2010; <sup>b</sup>Reveles *et al.*, 2010). Las charolas son acomodadas en bancales en el invernadero, donde se deberán manejar las condiciones climáticas según la edad de la plántula (Guerrero, 2010).

Los riegos deberán de ser homogéneos y ligeros aplicados por micro aspersión de 800 ml por charola y 1.2 L cuando se apliquen fertilizantes, además de fertilizantes se pueden inyectar enraizadores y fungicidas. Se debe de mantener una nutrición balanceada a base principalmente de nitrógeno, potasio, fosforo, calcio y magnesio de una manera balanceada 2 veces por semana. La fertilización deberá realizarse cuando la planta presente sus primeras hojas verdaderas, la cual deberá tener en esta etapa como base fertilizantes ricos en fosforo para promover el desarrollo vegetal (Ramiro, 2003; Guerrero, 2010; <sup>b</sup>Reveles *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2015), después de ser aplicada la fertilización se requiere realizar un riego ligero con pura agua para lavar el follaje y así eliminar residuos de fertilizantes sobre las hojas que puedan causar toxicidad (Guerrero, 2010).

La temperatura óptima para el desarrollo de la plántula dependerá de su etapa de desarrollo, por lo general esta va de los 18 hasta los 28°C durante el día y por la noche de 15 a 20°C con una humedad relativa del 75%, las cuales se logran abriendo o cerrando cortinas o mediante el uso de calefacción y ventiladores (<sup>b</sup>Reveles *et al.*, 2010).

El tiempo de obtención de plántula es de 40 a 50 días, cuando esta alcanza una altura de 10 a 12 cm y de 3 a 4 pares de hojas (Ramiro, 2003; Reveles *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2015), 8 días antes del trasplante la planta debe de pasar

por un proceso de endurecimiento, esto se realiza sometiendo a la plántula a más luz, aportando más potasio, menos nitrógeno y agua (Castillo *et al.*, 2015). Antes del trasplante se deberá dar un riego pesado para que la plántula se desprenda de la charola fácilmente, además se sugiere aplicar fungicidas, bactericidas e insecticidas para que la plántula vaya protegida al campo (Guerrero, 2010).

La ventaja de este método es que se requiere de menor cantidad de semilla por hectárea, se obtienen plántulas de mayor vigor y calidad listas para el trasplante en 40 días en comparación a la producida en almácigos que se extiende hasta los 60 y 70 días (Ramiro, 2003).

### **Plagas y enfermedades**

La producción de plántula tanto en invernadero como en almácigos puede verse afectada severamente por algunos insectos plaga, principalmente chupadores transmisores de virus como lo son la mosquita blanca y pulgones, por mencionar algunos (Ramiro, 2003). Los principales fitopatógenos que atacan a las plántulas de Chile son los oomicetos (*Pythium* sp. y *Phytophthora capsici*) y los hongos *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp., los cuales son causantes de la enfermedad conocida como “damping off” (Velásquez *et al.*, 2007; Reveles *et al.*, 2010; Velásquez *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2015; Larios *et al.*, 2019), y otros causantes de tizones foliares como *Alternaria* sp. (Velásquez *et al.*, 2007).

### **Mosquita blanca (*Bemisia tabaci*)**

Es la principal plaga que puede afectar en la etapa de producción de plántula, debido a ser una transmisora de enfermedades virales, para su control se recomiendan la aplicación de productos químicos como Imidacloprid al momento de que la plántula presente sus primeras hojas verdaderas y complementarlo con la aplicación de algunos repelentes (Castillo *et al.*, 2015).

**Mosca negra o fungus gnat (*Bradysia* spp.).**

Esta es un díptero de la familia Sciaridae, las larvas se alimentan de materia orgánica en descomposición y de las raíces pequeñas de las plantas, lo que ocasiona que las plántulas manifiesten síntomas como, crecimiento lento, amarillamiento y marchitez. Al ocasionar daños en las raíces esta facilita la entrada de otros fitopatógenos como es el caso de *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., etc. Mientras que en la fase adulta estos facilitan la dispersión de sus esporas. Las condiciones adecuadas para el desarrollo de este insecto son espacios húmedos con poca luz y presencia de materia orgánica en descomposición, características que se presentan en los invernaderos. Entre las especies importantes de plantas afectadas por este díptero se encuentran el chile, jitomate, nochebuena y gerbera (Alvarado *et al.*, 2016).

**Damping off**

En etapa de plántula la enfermedad más importante es conocida como “damping off”, la cual ocasiona marchitez o estrangulamiento de plántulas, esta es ocasionada por un complejo de fitopatógenos en los que se encuentran *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium rolfsii* y los oomicetos *Phytophthora capsici* y *Pythium* sp., este último considerado como el principal causante de esta enfermedad. El “damping off” se encuentra distribuida en todo el mundo y es considerada como la principal enfermedad en estado de plántula pudiendo ocasionar pérdidas desde un 10% hasta el 100%. Esta enfermedad tiene la capacidad de ocasionar daños en un gran número de diferentes géneros de plantas. Esta se puede diferenciar causando infección en dos etapas de desarrollo, una en etapa temprana denominada Preemergencia y una etapa después de la germinación denominada Postemergencia. En ocasiones esta puede presentar una tercera etapa aún más tardía después de que las plántulas hayan sido trasplantadas. (Fry *et al.*, 2010; <sup>a</sup>Reveles *et al.*, 2010; Saúl *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2011; López *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 2014; D'Angelo, 2016; Hernández *et al.*, 2018).

**Preemergencia:** esta etapa se presenta antes de que emerja la plántula. La semilla alcanza a producir su hipocótilo el cual se torna de color café oscuro y muere pronto. Cuando la infección se da antes de que germine el hipocótilo, la semilla adquiere un color café, consistencia suave, se encoge y se descompone trayendo como consecuencia al momento de la germinación de las demás semillas, que se observen manchones sin germinar en los almácigos. Como en esta fase es difícil de observar, los agricultores le atribuyen el bajo porcentaje de germinación a una mala calidad de la semilla (Avelar *et al.*, 2010; Saúl *et al.*, 2010; Berrones *et al.*, 2013; Velásquez *et al.*, 2014).

**Postemergencia:** Los síntomas en esta etapa pueden ocurrir en cualquier parte de la planta iniciando como una mancha café oscura de consistencia húmeda, la infección se extiende con rapidez, afectando a las células, produciendo que estas colapsen, lo cual origina que la planta muera al poco tiempo de la infección (Agrios, 2005). El síntoma más típico se origina en la base de los tallos, como una estrangulación necrosado de coloración café rojizo a negro, se observa a simple vista que la parte afectada es más delgada que la parte que aún no ha sido invadida, ocasionando una flacidez del tallo y marchitez de las hojas, posteriormente la plántula cae al suelo, el hongo sigue infectando a la planta hasta que esta muere por completo. En las raíces ocasiona pudrición de color oscura que puede llegar a destruirlas, la cual se originó en la base del tallo (Agrios, 2005; Avelar *et al.*, 2010; Saúl *et al.*, 2010; Berrones *et al.*, 2013; Velásquez *et al.*, 2014; Peralta *et al.*, 2017).

**Etapa tardía:** en ocasiones las plantas después del trasplante pueden ser atacadas por el complejo “damping off”, aunque los síntomas casi siempre se limitan a pequeñas lesiones de coloración oscuras en las raíces y en ocasiones también en los tallos, algunas veces estas pequeñas lesiones pueden crecer y cubrir gran parte de la planta, lo que ocasiona atrofia y su muerte (Agrios, 2005; Grijalba *et al.*, 2015).

## **Descripción de los principales fitopatógenos causantes del “damping off”.**

### ***Pythium* spp.**

El Género *Pythium* fue descrito por Pringsheim en 1858 (Khalaf *et al.*, 2011). Es perteneciente al reino Chromista debido a las características de su pared celular que está compuesta por celulosa y beta glucanos, además de producir zoosporas con 2 flagelos, características que los diferencian de los hongos verdaderos (Van West *et al.*, 2003; Palmucci *et al.*, 2011; Heffer *et al.*, 2012). Este es considerado el principal patógeno causante del “damping off”, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, se ve favorecido por alta humedad y temperaturas desde los 15°C a las superiores de 30°C dependiendo de la especie, por ejemplo *P. aphanidermatum* es más agresivo de los 30 a los 35°C a comparación de *P. ultimum* que se ve favorecido por temperaturas por debajo de los 23°C. Cuenta con aproximadamente de 120 a 160 especies, pudiendo elevarse a muchas más utilizando pruebas de PCR, entre las especies más importantes se encuentran *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. myriotylum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. coloratum*, entre otros. Puede sobrevivir como saprofito o parasito, atacando a más de 60 especies de cultivos, en los que se encuentran Solanáceas, Cucurbitáceas y Fabáceas, causa daños en semillas, raíces, en la base de tallos de plántulas y en ocasiones llega a dañar los frutos que estén en contacto con el suelo húmedo o que estén constantemente con una película de humedad (Agrios, 2005; Gravel *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2011; Khalaf *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2011; Grijalba *et al.*, 2015; D’Angelo, 2016; Figueroa *et al.*, 2017; Grijalba *et al.*, 2017; Villanueva, 2018).

**Clasificación taxonómica:** Según Heffer *et al.*, (2012) la clasificación de *Pythium* es la siguiente:

**Reino:** Chromista

**Phylum:** Stramenopila

**Orden:** Oomycota

**Familia:** Pythiaceae

**Género:** *Pythium* spp.



**Características morfológicas:** El Género *Pythium* cuenta con características morfológicas como lo son micelio cenocítico, oogonios con oósporas, anteridios, esporangios y zoosporas flageladas, debido su gran variación en formas y tamaños o ausencia de estas estructuras entre las especies de este género, hace que resulte difícil la identificación de estas especies, por lo tanto, para una identificación más exacta se requiere recurrir a pruebas moleculares (Díaz *et al.*, 2011).

El micelio es cenocítico, está compuesto de pared celular de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos (Fry *et al.*, 2010; Palmucci *et al.*, 2011), este es de rápido crecimiento, de una coloración blanquecina, es filamentoso, muy ramificado. Los esporangios son terminales de forma esférica o filamentosa variada en su forma, los cuales pueden o no formar una vesícula donde se forman alrededor de 100 zoosporas. Las zoosporas son carentes de pared celular, son de forma ovalada con 2 flagelos uno tipo látigo dirigido hacia atrás y uno cepillo dirigido hacia adelante, los cuales les sirven para su locomoción. Estas tienen la capacidad de enquistarse y entrar en reposo hasta encontrar un hospedante (Agrios, 2005; Fry *et al.*, 2010).

Los oogonios son forma esférica y los anteridios son de forma de pino de boliche, estos pueden ser diclinos si se originan de una hifa diferente de donde se origina el oogonio o monoclinos si se origina de la misma hifa de donde se originó el oogonio. En el interior del oogonio se produce una espora de resistencia llamada oóspora, la cual tiene una pared gruesa, que le proporciona la capacidad de sobrevivir por varios años en el suelo aun en condiciones extremas (Agrios, 2005; Fry *et al.*, 2010; Velázquez *et al.*, 2014).

**Ciclo de reproducción:** Consta de 2 formas de reproducción, asexual y sexual.

**Reproducción asexual:** esta se da mediante la producción de esporangios, los cuales pueden germinar directamente produciendo un tubo germinativo, también pueden producir una vesícula, donde se formarán aproximadamente más de 100 zoosporas flageladas, estas son liberadas solo en condiciones de humedad. La pared de la vesícula desaparece y las zoosporas son liberadas, estas nadan

hasta encontrar un hospedante al cual infectar, al entrar en contacto con el hospedante estas se enquistan y después penetran produciendo un tubo germinativo, o en ocasiones estas pueden producir una vesícula en las que se formaran más zoosporas secundarias, este evento puede llegar a repetirse varias veces (Van der Plaats, 1981; Van West *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Fry *et al.*, 2010).

**Reproducción sexual:** esta ocurre con la unión de sus gametangios oogonio y anteridio, está por lo regular seda de una forma homotalica. El anteridio se une al oogonio produciendo un tubo de fecundación, posteriormente se desplazan los núcleos del anteridio hacia el oogonio y ambos se fusionan dando origen a una oóspora de pared gruesa la cual tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones extremas del ambiente. La oóspora puede germinar desarrollando un tubo germinativo originando nuevo micelio o produciendo una vesícula con zoosporas igual a la de los esporangios. La germinación está influenciada por temperatura del medio ambiente, por ejemplo, temperaturas superiores a los 18°C favorece la germinación de tubos germinales y temperaturas menores a 18°C induce la producción de la vesícula (Agrios, 2005; Fry *et al.*, 2010; Velásquez *et al.*, 2014).

**Condiciones favorables para su desarrollo:** Para su desarrollo *Pythium* requiere de suelos con alta humedad, un deficiente drenaje y una baja aireación. Para dispersar sus zoosporas necesita de agua para que estas se puedan desplazar. Los requerimientos de temperatura para su desarrollo dependerán de la especie de *Pythium*, debido a que los requerimientos óptimos de temperatura varían entre las especies, por ejemplo, *P. aphanidermatum* requiere de temperaturas altas que van de los 30 a los 35°C, mientras que *P. ultimum* requiere de temperaturas bajas inferiores a los 23°C (Velásquez *et al.*, 2014; Grijalba *et al.*, 2017).

**Como sobrevive de un ciclo a otro:** *Pythium* tiene la capacidad de sobrevivir tanto como saprofito en materia en descomposición y como paracito de plantas especialmente afectando en estado de plántula en invernadero, almácigos, parcelas agrícolas y bosques, afectando las raíces, tallos y semillas de las plantas

(Agrios, 2005; Díaz *et al.*, 2011). Este sobrevive por varios años en fase de oóspora hasta que se dan las condiciones favorables para su germinación y desarrollo (Agrios, 2005; Fry *et al.*, 2010; Velásquez *et al.*, 2014).

**Infección inicial:** Para que *Pythium* cause infección se requiere de una serie de factores favorables para su desarrollo y factores desfavorables para el desarrollo de la planta como lo son, la humedad, temperatura, luminosidad, pH, nutrición y presencia de otros microorganismos. La infección inicial se puede originar desde un fragmento de micelio, la germinación de una zoospora, una oóspora o la germinación directa de un esporangio, al entrar en contacto con una semilla o cualquier parte de la planta que este en contacto con humedad. Las zoosporas y el micelio son atraídas al hospedante mediante sus exudados radiculares, posteriormente germinan al hacer contacto con la planta, estos se adieren a ellas mediante la formación de apresorios y producen una clavija de infección para poder penetrar en ella. Los exudados radiculares producidos por las plantas sirven a *Pythium* como estimulantes quimiotropicos para las zoosporas y micelio ya que estos se mueven o crecen en su dirección (Van der Plaats, 1981; Agrios, 2005).

En las semillas *Pythium* penetra cuando estas están húmedas e hinchadas, o a través de heridas, también puede llegar a penetrar al embrión o a plántulas que están emergiendo mediante presión mecánica y degradación enzimática de los tejidos (Agrios, 2005).

En las raíces y tallos jóvenes la infección ocurre a nivel de suelo o muy poco por debajo de este. Este penetra igual que en la semilla en las partes más húmedas e hinchadas, el micelio penetra en las células de la epidermis y de la corteza donde se nutre y produce desintegración de las células y tejidos (Agrios, 2005).

En las raicillas *Pythium* penetra por las puntas propagándose en las células jóvenes, ocasionándoles una muerte rápida. En raíces y tallos adultos la infección se limita a la corteza de estos ocasionando pequeñas lesiones a nivel de la infección. *Pythium* también es capaz de atacar frutos que estén en contacto con

alta humedad en el campo o postcosecha, este penetra mediante la producción de enzimas que degradan las paredes celulares (Agrios, 2005).

**Síntomas y signos:** En semilla ocasiona pudrición, en esta se forma una masa putrefacta la cual está constituida por el hongo y las sustancias que este no pudo degradar (Agrios, 2005; Fry *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2011). En los tallos de las plántulas produce necrosis provocando el típico estrangulamiento lo que ocasionando que la plántula se doble, caiga y muera, también ocasiona necrosis y pudriciones de raíces, cuando la infección no es tan grave se puede provocar retraso en el crecimiento y amarillamiento (Gómez *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2018). En los frutos ocasiona pudrición y transcurrido un tiempo se empieza a observar como el micelio sale del fruto y hasta llegar a cubrirlo en gran parte (Agrios, 2005). En ocasiones puede provocar reducción del crecimiento, podredumbre en la base de los tallos y marchitez de plantas adultas (Gómez *et al.*, 2011; Grijalba *et al.*, 2015).

### ***Fusarium* spp.**

Este género fue descrito por vez primera en 1809 por Link (Leslie y Summerell, 2006). Tiene la capacidad de sobrevivir tanto como saprofito y paracito de plantas. Este género es cosmopolita y cuenta con una gran cantidad de especies, entre las más importantes se pueden mencionar a *F. oxysporum* (con más de 120 formas especiales) y *F. solani* (Torres, 2000; Agrios, 2005; Hernández *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2015; Retana *et al.*, 2018). Se considera como uno de los principales fitopatógenos que causan mayores pérdidas en la agricultura, es capaz de afectar a más de 100 especies de plantas de importancia económica (De Granada *et al.*, 2001) en las que se encuentran Solanáceas, Cucurbitáceas y Amarilidáceas, entre muchas otras. *Fusarium* spp., puede infectar tanto en estado de plántula ocasionando “damping off” y en estado avanzado del cultivo provocando la marchitez o secadera (Wolcan., *et al.*, 2001; Zapata *et al.*, 2001; Agrios, 2005; Velásquez *et al.*, 2007 y 2014; Sánchez *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018). Velásquez *et al.*, (2007) mencionan a *Fusarium*

sp., ocasionando un mayor porcentaje de incidencia de Damping off en almácigos de chiles en comparación con *Rhizoctonia solani*, en los estados de Aguascalientes y Zacatecas.

**Clasificación taxonómica:** Según Martínez *et al.*, (2015) la clasificación de *Fusarium* es la siguiente:

**Reino:** Fungi

**Fillum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Nectriaceae

**Género:** *Fusarium* spp.

**Características morfológicas:** Este género se caracteriza poseer un micelio de coloraciones variadas que van del blanco al rosado, color durazno o una coloración morada, además de ser de rápido crecimiento y por la producción de sus típicas esporas como lo son las macroconidias, microconidias y clamidosporas (Torres., 2000; De Granada *et al.*, 2001).

**Microconidias:** No todas las especies las producen, estos son esporas unicelulares de forma ovalada, ovoide, globosa, reniforme, periforme o de huso con 1, 2 o sin septos transversales. Estas se originan de una fialide (puede ser monofialide o polifialide) (Leslie y Summerell, 2006; Martínez *et al.*, 2015). Las microconidias de *F. oxysporum* por lo regular son unicelulares, hialinas, curvas, estas se forman sobre fialides laterales cortas, miden 12 µm de largo por 2.5- 3.5 µm de ancho (De Granada *et al.*, 2001).

**Macroconidias:** Son esporas rectas o curvadas en forma de canoa, multicelulares de 3 a más septos transversales, con una célula basal (célula pie), hialinas, alargadas de variados tamaños según la especie (*F. oxysporum* es de 27 a 46 µm de largo por 3.0 a 4.5 µm de ancho) (Torres 2000; De Granada *et al.*,

2001; Leslie y Summerell, 2006; Martínez *et al.*, 2015). Estas se pueden producir de forma simple en conidióforos pequeños o alargados simples o ramificados, algunas especies tienen la capacidad de formarlos en esporodoquios (Martínez *et al.*, 2015).

**Clamidosporas:** Estas se forman a partir de la condensación del contenido del micelio o de las macroconidias, se pueden formar de manera individual o en grupos formando cadenas, para su formación se requiere de mucho tiempo y son producidas en mucho menor cantidad que las macroconidias y microconidias, las características de estas es que son de pared gruesa, la cual es la estructura de resistencia del hongo (Torres 2000; Leslie y Summerell, 2006; De Granada *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2015).

**Ciclo de vida:** El Género *Fusarium* consta tanto de estado anamorfo como teleomorfo, un ejemplo del estado teleomorfo es el Género *Gibberella* spp., (Leslie y Summerell, 2006; Reynoso *et al.*, 2005). Sobrevive de un ciclo a otro en restos de cultivos ya sea como micelio o cualquiera de sus tipos de conidias, aunque es más frecuente que sobreviva como clamidosporas. Las conidias o el micelio al detectar los exudados radiculares de la planta desarrollan un tubo germinativo con el que penetran por las puntas de las raíces o a través de heridas hacia interior de la planta. El micelio se propaga intercelularmente hasta llegar a los vasos del xilema, de donde viaja hacia el tallo y la corona de la planta, en interior de la planta el micelio produce microconidios los cuales son distribuidos con la savia, posteriormente germinan y producen más micelio, penetrando a los vasos de la planta produciendo taponamiento de estos, ocasionando la marchitez y muerte de la planta. En los tejidos ya muertos de la planta es donde el hongo produce mayor cantidad de esporas, las cuales serán diseminadas hacia nuevas plantas para comenzar un nuevo ciclo. Uno de los principales medios de diseminación a larga distancia ocurre al trasplantar plántulas infectadas con el fitopatógeno a parcelas donde no se encontraba la presencia de este hongo (De Granada *et al.*, 2001; Agrios, 2005).

**Condiciones favorables para su desarrollo:** Esta dependerá según la especie como, por ejemplo, la temperatura óptima para el desarrollo de *F. oxysporum* oscila entre los 25 y 30°C, con un periodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Siendo las temperaturas mínima y máxima de 5°C y 37°C., su pH óptimo es de 7.7, aunque se puede desarrollar a pH de 2.2 y 9.0 (De Granada *et al.*, 2001).

**Como sobrevive de un ciclo a otro:** Este sobrevive como patógeno facultativo en plantas o en restos de cosechas, su forma de supervivencia en el suelo es a través de clamidosporas las cuales tienen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo en condiciones extremas del medio ambiente hasta que se presenten las condiciones favorables para su desarrollo (Retana *et al.*, 2018; Agrios, 2005).

**Infección inicial:** Inicia en el momento en que la clamidospora, macro y microconidia o micelio son estimulados por los exudados radiculares, lo que ocasiona que estos germinen y penetren en la epidermis de las raíces, posteriormente se dirige hacia los vasos del xilema. Otro método de penetración es a través de heridas (De Granada *et al.*, 2001).

**Sintomatología:** En plántulas provoca “damping off” ocasionando estrangulamiento y necrosamiento de la base del tallo, amarillamiento, marchitez, pudrición de raíces y la muerte de la plántula, en frijol causa lesiones de coloración rojizas oscuras en el epicótilo e hipocótilo. En plantas adultas ocasiona marchitez de las hojas, clorosis de las venas, achaparramiento, defoliación, necrosis marginal y la muerte de la planta, en algunas especies de plantas como es el caso del tomate ocasiona el desarrollo de raíces adventicias. Los haces vasculares del tallo se tornan de una coloración café, la cual se va extendiendo hacia la parte superior de la planta. Las raíces afectadas se observan pudriciones y estas se pueden desprender con facilidad (De Granada *et al.*, 2001; Garnica *et al.*, 2004; Agrios, 2005; Hernández, 2012).

### **Métodos de control del “damping off”**

Los agricultores para el control de esta enfermedad se basan principalmente en el control del riego, desinfección del suelo con productos químicos altamente tóxicos como lo son el bromuro de metilo y metan sodio, también el tratamiento de la semilla y la aplicación de algunos productos químicos como lo son; Thiram, Captan, Mancozeb, Carbendazim, Metalaxyl, Prochloraz, Azoxystrobin y mezclas entre ellos. Los productos químicos no siempre son efectivos para su control y su mal manejo han traído como consecuencia, resistencia de los patógenos hacia estos compuestos, contaminación del suelo y agua, daños a la salud de las personas entre otros (Velásquez *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2015; Figueroa, 2017; Hernández *et al.*, 2018; Larios *et al.*, 2019). Algunos otros métodos de control son, la esterilización del suelo con altas temperatura o biofumigación antes de la siembra en almácigos, uso de sustrato estéril, además del suelo también es importante la esterilización de las herramientas y equipos de trabajo, uso de semilla certificada, mantener una temperatura, humedad y nutrición óptimas, evitar riegos pesados y mantener un buen drenaje. Eliminación de plántulas con síntomas para evitar su dispersión en el vivero o en campo al ser trasplantadas (Agrios, 2005; Martin *et al.*, 2011).

Una opción por la que han venido optando los agricultores en los últimos años para el control de esta enfermedad, es el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas de estos patógenos (Hernández *et al.*, 2018; Larios *et al.*, 2019) como lo son, Bacterias del genero *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Actinoplanes* y *Micromonospora* y algunos hongos como *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., por mencionar algunos (Asaka *et al.*, 1996; Gravel *et al.*, 2005; Figueroa, 2017).

En un trabajo realizado por Kipngeno *et al.*, (2015) demostraron que la aplicación de *Trichoderma asperellum* y *Bacillus subtilis* en semillas de tomate se redujo el daño causado por “damping off” en más del 40%, donde el testigo obtuvo un daño del 65.89%, además estos agentes de biocontrol promovieron el crecimiento vegetal. Asaka *et al.*, (1996) menciona que una cepa de *Bacillus subtilis* obtuvo



efecto inhibitorio *in vitro* contra diferentes patógenos al producir antibioticos iturina A y surfactina, demostrando su efecto inhibitorio en contra de *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate. Hernández *et al.*, (2018) al trabajar con “damping off” en Chile, utilizaron bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* obteniendo inhibición *in vitro* del 44 a 50% del agente causal, posteriormente en plántulas con la aplicación de 2 cepas de *Pseudomonas* obtuvieron 80 y 100% de supervivencia de las plántulas contra 30% del testigo, además se demostró que estos agentes de biocontrol tuvieron la capacidad de producir AIA y solubilizar fosfato inorgánico. En producción de plántulas de *Capsicum chinense* en charolas en invernadero al utilizar una cepa de *Trichoderma* denominada clombta y una mezcla de *T. clombta* y *T. SP6* a una concentración de  $1 \times 10^{13}$  por ml, estos tratamientos no mostraron síntomas de damping off en comparación con el tratamiento testigo (Captan) que presentó un 5.4% de incidencia, además de que estas cepas promovieron el desarrollo vegetativo de las plántulas al incrementar la altura, la biomasa área y radicular, el diámetro del tallo y contenido de clorofila (Larios *et al.*, 2019). En un trabajo realizado por Villanueva, (2018) para el control del “damping off” producida por *Pythium aphanidermatum* en plántulas de pepino utilizó *T. asperellum*, el cual mostró ser efectivo para su control al mismo nivel que el fungicida de la mezcla de Propanocarb y Fosetil, en comparación con la aplicación de *B. subtilis*, el biofungicida *B. subtilis* cepa QST713 y el fungicida Etridiazol, los cuales no tuvieron un efecto reductor sobre esta enfermedad.

### ***Trichoderma* spp.**

Es un hongo saprofito cosmopolita, el cual se puede encontrar principalmente en lugares que contienen materia orgánica en descomposición. Este género tiene gran facilidad de adaptación debido a que posee una amplia gama de modos de acción como lo son, una alta capacidad para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistente a inhibidores microbianos. Fue descrito por primera vez en 1794 por Persoon, el cual describió 4 especies, en la actualidad este número ha aumentado a más de 100 con ayuda de pruebas moleculares, entre las que se

pueden mencionar *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum* (Martínez *et al.*, 2015).

*Trichoderma* pertenece al Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae (Argumedo *et al.*, 2009).

Este género es muy conocido por ser un excelente agente de biocontrol, debido a sus diferentes modos de acción, en los que se encuentran la producción de sustancias antibióticas (antibiosis), su capacidad de parasitar a otros hongos (micoparasitismo), competencia por espacio y nutrientes (Harman *et al.*, 2004; Argumedo *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2015; Chirino *et al.*, 2016; Larios *et al.*, 2019). Además, se conoce que *Trichoderma* tiene la capacidad de inducir resistencia sistémica o localizada en plantas al penetrar en la epidermis de las raíces y en algunas células más por debajo, y producir compuestos que activan las defensas de las plantas como son, péptidos, proteínas y compuestos de bajo peso molecular. La colonización de las raíces por *Trichoderma* aumenta la producción de enzimas (peroxidasas, quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y la hidroperóxido-liasa de la ruta de la lipoxigenasa) relacionadas con la defensa de las plantas. Al inducir cambios en el metabolismo de las plantas induce a la acumulación de compuestos antimicrobianos como lo son la producción de fitoalexina y glucosidos fenólicos (Harman *et al.*, 2004). Como ya se mencionó *Trichoderma* tiene la capacidad de parasitar a otros géneros de hongos, al detectar a otros hongos este crece rápidamente en dirección hacia ellos, posteriormente este se enrolla alrededor de ellos y forma apresorios, una vez que entran en contacto produce enzimas fungitoxicas que degradan la pared celular del hongo provocando su muerte. Otro modo de acción es mediante la competencia, por ejemplo, se menciona que compite por los exudados producidos por semillas, los cuales estimulan la germinación de hongos fitopatógenos, compiten también por nutrientes y espacio al colonizar la rizosfera de la planta, además de que tiene la capacidad de degradar o inhibir pectinadas y otras enzimas que son esenciales para los fitopatógenos. Otro beneficio que se

menciona es que algunas especies tienen la capacidad promover el crecimiento vegetal al solubilizar algunos nutrientes como lo son fosfato de roca,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ , Zn, eficientisar el uso de nitrógeno y producir sideroforos que quelatan el hierro lo que favorece el desarrollo y la producción de las plantas, la producción de algunos metabolitos secundarios como el ácido indol acético (AIA) y análogos de auxina, 6-pentil-alfa-pirona (6PP) y harzianolida (Harman *et al.*, 2004; Chirino *et al.*, 2016).

### ***Bacillus* spp.**

Pertenece a la clase 1 del filum *Firmicutes* (Abriouel *et al.*, 2011; Villareal *et al.*, 2018), Clase *Bacilli*, Orden *Bacillales*, Familia *Bacillaceae*, siendo una de las familias con mayor actividad bioquímica (Layton *et al.*, 2011; Villareal *et al.*, 2018). Estas son en forma de bacilos de un tamaño de 0.5 a 10  $\mu\text{m}$ , con flagelos laterales los cuales le proporcionan movimiento, Gram+, aerobias y anaerobias, productoras de endosporas las cuales resisten condiciones extremas, producen catalasa, presentan un rango de crecimiento en pH de 5.5 a 8.5 lo cual permite encontrarla en diferentes ambientes (Abriouel *et al.*, 2011; Layton *et al.*, 2011; Tejera *et al.*, 2011; Villareal *et al.*, 2018). Existen aproximadamente más de 336 especies (Villareal *et al.*, 2018), entre las especies más destacadas por su acción de antagonismo en contra de fitopatógenos y promoción del crecimiento vegetal se mencionan a *Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. cerus*, *B. sensu*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* (Abriouel *et al.*, 2011; Layton *et al.*, 2011; Tejera *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2018).

La actividad antagónica de *Bacillus* se debe a la producción de una gran variedad de antibióticos como son los lipopeptidos (iturinas, fengicinas y surfactinas), los cuales actúan sobre la membrana citoplasmática de los hongos o bacterias provocándoles poros, desbalance osmótico y algunos desbalances celulares como la homeostasis celular del calcio ocasionándoles la muerte (Villareal *et al.*, 2018). En varios estudios se ha demostrado la capacidad antagonista del género *Bacillus* en contra de diversos fitopatógenos en los que se mencionan *Pyricularia*,

*Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium* entre otros, al producir algunas enzimas como lo son quitinasas, hidrolasas, proteasas y glucanasas. En este género destaca la especie *B. subtilis* por su capacidad de antagonismo en contra de *Fusarium oxysporum*, para cual esta bacteria produce lipasas, proteasa y glucanasas (Tejera *et al.*, 2011). Otro mecanismo de acción es por competencia de nutrientes, por ejemplo, compiten con algunos microorganismos por algunos minerales como el hierro mediante la producción de sideróforos los cuales tienen la capacidad de quelatar a este elemento, lo cual limita el crecimiento y la colonización de los microorganismos (Villareal *et al.*, 2018).

*Bacillus* tiene la capacidad de inducir la resistencia sistémica inducida (ISR) la cual depende de moléculas elicitoras en las que se encuentran lipopeptidos, fitohormonas (ácido jasmonico y etileno) y compuestos volátiles. Villareal *et al.*, (2018) menciona a un género de *Bacillus* el cual confiere resistencia a plantas de tabaco mediante la producción de una  $\beta$ -1,3 glucanasa y una quitinasa en contra de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotiane*. Otros mecanismos que se mencionan incluyen cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina, producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas, auxinas y glucosinolatos. Además, este género es considerado como PGPR (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal) (Moreno *et al.*, 2018), por tener la capacidad de promover el crecimiento de las plantas de forma directa mediante la solubilización de fosfatos (*B. megaterium* y *B. subtilis*), la fijación del nitrógeno (*B. fusiformis*) y la producción de hormonas y de forma indirecta al proteger a la planta del ataque de patógenos (Tejera *et al.*, 2011).

### ***Pseudomonas* spp.**

Este género es perteneciente al Filo Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Pseudomonadales, Familia Pseudomonadaceae, Género *Pseudomonas* (Pérez *et al.*, 2015), son en forma de bacilos Gram negativos rectos o un poco curvados, de un diámetro de 0.5- 1.0 por 1.5- 5.0  $\mu\text{m}$

de largo, aerobias, con presencia de flagelos polares que le proporcionan movimiento (Valverde *et al.*, 2009). En la agricultura existen tanto especies benéficas como patógenas (Pérez *et al.*, 2015). Entre las especies benéficas se encuentran *Pseudomonas chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. putida* entre otras, estas dos últimas son las típicas representativas de las llamadas *Pseudomonas* florecientes, esto por la característica típica de producir pigmentos hidrosolubles de color azul verdoso al verse con luz UV (Valverde *et al.*, 2009).

Algunas especies de *Pseudomonas* son de gran importancia en la agricultura debido a poseer diferentes propiedades benéficas como son, promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), ser agentes de biocontrol de fitopatógenos, inducción de la resistencia sistémica, solubilizadoras de algunos minerales como el fosforo, etc., (Valverde *et al.*, 2009; Gakegne *et al.*, 2017).

Entre los mecanismos de inhibición que presenta algunas especies de *Pseudomonas* se encuentra la producción de antibióticos, competencia por espacios y nutrientes, quelatación del hierro y producción de enzimas hidrolíticas (Gakegne *et al.*, 2017). Los principales antibióticos producidos son, pioluteorina, pirrolnitrina, ácido fenazina-1-carboxílico y 2,4- diacetilfloroglucinol, y algunos metabolitos secundarios como cianuro de hidrogeno y proteasas, los cuales están involucrados en el antagonismo de algunos hongos patógenos (Sharma *et al.*, 2014; Chávez *et al.*, 2018). Otro ejemplo de compuestos producidos por estas bacterias es el caso de compuestos extracelulares (biosurfactantes) los cuales tienen efecto lítico en las zoosporas producidas por *Pythium* y *Phytophthora* (Pérez *et al.*, 2015).

Algunas especies de *Pseudomonas* como es el caso de *P. fluorescens* son catalogadas como PGPR debido a su capacidad de promover el crecimiento vegetal, de manera directa mediante la producción de algunos compuestos como lo son, auxinas, giberelinas y citoquininas, producir aminoácidos y fijar nitrógeno atmosférico como en el caso de *P. putida*. De manera indirecta al producir sustancias antibióticas que tienen efecto antagonista de patógenos de plantas,

además de sintetizar sideróforos para secuestrar hierro y limitando el desarrollo de estos patógenos, por medio de competencia al colonizar la rizosfera de la planta (Sivasakthi *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015). Entre las especies con mayor capacidad de producir sideroforos destaca la especie *P. donghuensis*, siendo una especie con un alto potencial para el control biológico (Gao, *et al.*, 2015).

Un mecanismo de defensa inducido por algunas especies de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* y *P. veronii*) es conocido como la Resistencia Sistémica Inducida (RSI), la cual le proporciona a la planta mejor capacidad de respuesta contra el ataque de patógenos, esto al colonizar las raíces de las plantas e inducir la producción en la planta de algunos compuestos. La RSI es dependiente de algunos compuestos como el jasmonato y etileno (Martínez *et al.*, 2015; Jaramillo *et al.*, 2016). Algunos genes que participan en los mecanismos de defensa son; Eir1 (transportador de flujo de auxinas específico para raíces), Lox2 (lipoxigenasa que lleva a la biosíntesis de ácido jasmonico) y Tlp1 (pertenece a la familia de PR-5 de proteínas relacionadas a patógenos, con actividad antifúngica). Se menciona a *P. veronii* con actividad antagónica en contra de *Xiphinema index*, esta bacteria fue capaz de estimular la expresión de los genes Eir1, Lox2, Tlp1 (Jaramillo *et al.*, 2016).

### **Solubilizadores de fosfatos**

En los últimos años las personas han buscado algunas alternativas para minimizar el uso de fertilizantes químicos mediante la utilización de biofertilizantes como lo son microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) orgánicos y minerales (Becerra *et al.*, 2011). Algunos de los microorganismos con la capacidad de solubilizar fosfatos se mencionan a las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* (Higuera, 2008; Patiño *et al.*, 2013) *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Erwinia* (Patiño *et al.*, 2013) y algunos actinomicetos como *Streptomyces*, y algunos géneros de hongos como, *Rhizopus* (Higuera, 2008),

*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y algunas levaduras (Higuera, 2008; Patiño *et al.*, 2013) entre los géneros de levadura se encuentran *Saccharomyces*, *Rhodotorula* (Higuera, 2008) y *Candida famata*. Estos microorganismos tienen la capacidad de solubilizar fosfatos mediante acidificación, quelación y reacciones de óxido reducción (Becerra *et al.*, 2011). Los MSF tienen la capacidad de segregar la enzima fosfatasa para hidrolizar el fosfato orgánico para que la planta lo pueda asimilar (Higuera, 2008). Vargas *et al.*, 2019, menciona tres estrategias usadas por los MSF para la movilidad de fosfatos en el suelo como lo son, la acidificación de la rizosfera formando complejos estables con el aluminio y el hierro mediante el uso de ácidos orgánicos, la liberación de aniones orgánicos ácidos (citrato, oxalato, gluconato) y la liberación de fosfatasas y fitasas.

*Bacillus megaterium*, *B. mesentericus* y *Pseudomonas putida* se encargan de solubilizar fósforo orgánico (ortofósforo) y lo transforman en fosfatos asimilables para las plantas, en el caso de *Streptomyces* estos destruyen las moléculas orgánicas fósforadas para liberar fósforo. Los hongos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula* degradan los ácidos nucleicos y glicerofósforados a fosfatos simples (Higuera, 2008).

### **Interacción entre mezclas de microorganismos de biocontrol**

Existe un beneficio mayor cuando se aplican de manera conjunta diferentes tipos de hongos y bacterias antagonistas, que cuando se aplica cada uno de ellos de manera individual (Bautista *et al.*, 2014), ya que la interacción de estos microorganismos entre sí puede producir efectos sinérgicos que potencialicen sus beneficios (Cano, 2011), por ejemplo, Espinoza *et al.*, (2019) reportan la mezcla de diferentes cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. yunnanense*) y un fermento a base de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., disminuyeron la incidencia y severidad de la secadera del chile, además de haber incrementado su rendimiento, mientras que Laríos *et al.*, (2019) menciona que obtuvo mayor efecto al aplicar en plántula de chile una mezcla de dos cepas de *Trichoderma* (*T. clombta* + la cepa *T. sp6*) obteniendo incidencia del “damping

off" del 0% mientras que al aplicar solamente la sepa *T. sp6* obtuvo una incidencia mayor.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología e Invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, ubicada en las coordenadas geográficas de 25° 21' 13" latitud N y 101° 1' 56" longitud oeste, con una altura de 1,742 msnm.

### Material biológico

Los microorganismos antagonistas (*Bacillus spp.*, *Pseudomonas donghuensis*, *Trichoderma harzianum*) fueron proporcionados por el Cepario del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología de la UAAAN, las cuales fueron reactivadas en medio de cultivo Agar nutritivo (AN) para las bacterias y Papa Dextrosa Agar (PDA) para *Trichoderma*.

### Aislamiento e identificación de fitopatógenos causantes del “damping off”

Estos fueron aislados de plántulas de chile serrano de 30 días, producidos en charolas de 200 cavidades en el invernadero del Departamento de Parasitología, que mostraron los síntomas típicos del complejo “damping off”. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico, se etiquetaron y trasladaron en hieleras al laboratorio, donde se lavaron con agua corriente y se diseccionaron las raíces y tallos. Posteriormente, con ayuda de un bisturí estéril se cortaron en pequeños trozos, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, se lavaron por tres ocasiones con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel estroza estéril bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar. Las porciones de raíz y tallo se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo V8- Agar (V8A) y PDA (Fig. 1), las cuales se incubaron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  por 3 días.



**Figura 1:** Procedimiento para el aislamiento de los fitopatógenos causantes del “damping off” en plántulas de chiles.

Los crecimientos miceliales, se transfirieron a cajas petri con medio de cultivo agar agua (AA), 24 h después estos aislamientos se purificaron transfiriendo punta de hifa en cajas Petri con medios V8A y PDA, y se mantuvieron incubadas para su identificación.

### **Identificación de *Pythium* sp., y *Fusarium* sp.**

Para identificar a *Pythium* se realizaron observaciones directas del crecimiento micelial y sus estructuras desarrolladas sobre una semilla que fue esterilizada e inoculada con una concentración  $1 \times 10^6$  cel/mL (oogonios, oósporas y zoosporas), transferida a una caja Petri con medio AA e incubada por siete días, tiempo en el que se formaron las estructuras mencionadas de este oomiceto. La observación directa se realizó con ayuda de un microscopio digital Keyence VHX-7000 y un microscopio compuesto Motic BA210E en este último se observaron

preparaciones semipermanentes. La identificación se realizó de acuerdo a las descripciones realizadas por Van der Plaats, (1981) y Tsuneo, (2010).

La confirmación de la identidad del aislado se realizó mediante un estudio de secuenciación molecular, en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental ubicado en San Luis Potosí, México (IPICYT). Las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), la región ITS del rADN nuclear se amplificó usando los primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Al-Sheikh, 2010; Díaz *et al.*, 2011).

Por su parte, la identificación de *Fusarium sp.*, se realizó mediante preparaciones en portaobjeto con azul de lactofenol para su observación al microscopio compuesto, donde se observaron sus características miceliales y estructuras reproductivas, de acuerdo a las descripciones de Leslie y Summerell, (2006).

### **Pruebas de patogenicidad**

Estas se realizaron *in vitro* en cajas Petri con medio de cultivo AA, utilizando dos metodologías en preemergencia y postemergencia.

**Preemergencia:** Esta prueba se realizó mediante la metodología descrita por Apodaca *et al.*, (2002), para lo cual se utilizaron 90 semillas de chile serrano híbrido platino, las que fueron desinfectadas por 3 min en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, posteriormente se enjuagaron en tres ocasiones en agua destilada estéril, para luego ser inoculadas con una solución de  $1 \times 10^6$  cel/mL (oogonios, oósporas y zoosporas de *Pythium* o clamidiosporas, macro y microconidias de *Fusarium*). Con esta suspensión se inocularon 30 semillas con cada fitopatógeno, sumergiéndolas en un frasco de plástico con 15 ml de dicha solución por 1.5 min, en el caso de las 30 semillas utilizadas para los tratamientos testigo se evitó este último paso, posteriormente se colocaron en papel estraza estéril para retirar el exceso de humedad y ser transferidas en grupos de 10

semillas en cajas Petri con medio de cultivo AA, e incubadas  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12: 12 (luz: oscuridad). Para determinar la patogenicidad, se evaluó la mortalidad de las semillas por 12 días.

**Postemergencia:** Para este bioensayo se utilizó la técnica empleada por Sánchez *et al.*, (1975) modificado, para lo que se germinaron en medio AA 50 semillas de chile del mismo híbrido anteriormente mencionado, las cuales habían sido lavadas y desinfectadas como se describió en la prueba anterior, transcurridos cinco días, una vez que desarrollaron el hipocótilo, se transfirieron en grupos de tres semillas, libres de crecimiento de microorganismos, a nuevas cajas Petri conteniendo AA, dos días después, cuando se observó el desarrollo de su raíz y cotiledones, se transfirió en el centro de las cajas Petri una porción de micelio del fitopatógeno purificado (*Pythium* o *Fusarium*) con medio de cultivo de 3 mm de diámetro. Las cajas Petri se incubaron a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12: 12 (luz: oscuridad). Para determinar la patogenicidad se evaluó la mortalidad de las plantas, por nueve días.

Para la evaluación de la patogenicidad en ambas metodologías, se utilizó la escala visual de severidad descrita por Apodaca *et al.* (2002), modificada, donde; 0= sin síntomas planta sana, 1= puntos pequeños necróticos en el hipocótilo o en cotiledones, 2= necrosamiento en la base del hipocótilo, 3= hipocótilo necrosado hasta en un 50%, 4= semilla, hipocótilo o planta completamente necrosada. Los datos obtenidos en ambos ensayos se analizaron bajo un diseño completamente al azar con dos tratamientos (1= *Pythium*, 2= *Fusarium*), un testigo absoluto y tres repeticiones.

### **Incremento de microorganismos**

Se utilizaron cajas Petri que contenían medios de cultivo específico para cada microorganismo; para el caso de los hongos se realizó la resiembra de una porción de micelio con medio de cultivo de 5 mm de diámetro, en cajas petri con medio de cultivo PDA. Para el organismo que presento micelio cenocítico se utilizó la metodología mencionada anteriormente, con la diferencia que la porción

de micelio fue transferida a medio de cultivo V8A. En el caso de las bacterias estas fueron resembradas mediante la técnica de estrías de placa en medio de cultivo AN. Estos microorganismos fueron incubados a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C, para su posterior utilización.

El conteo de estructuras de reproducción de *Pythium* sp y *Fusarium* sp, se realizó una vez que los microorganismos habían formado sus estructuras de reproducción, esto a los siete días. Se les adiciono agua destilada estéril a las cajas Petri donde se desarrollaron los microorganismos, posteriormente se realizó un raspado del micelio con ayuda de un bisturí estéril, el contenido de las cajas petri fue recuperado en frascos de plásticos. El conteo y cálculo de las estructuras de reproducción de los microorganismos, se realizó utilizando la cámara Neubauer mediante observación al microscopio compuesto, para esto se utilizó la formula descrita por Carrión *et al.*, (2016).

Las soluciones se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml de agua, utilizando la siguiente formula:  $V1 C1 = V2 C2$  (Carrión *et al.*, 2016).

Donde V1= volumen inicial del inóculo que se desea preparar, C1= concentración inicial del inóculo, V2= volumen final del inoculo que se desea preparar, C2= concentración final que se desea preparar, en este caso  $1 \times 10^6$ .

### **Antagonismo *in vitro* entre bacterias antagónicas y los fitopatógenos**

Se determinó el porcentaje de inivición mediante la técnica de confrontación dual entre antagonista y fitopatógeno. Cajas Petri con medio de cultivo Caldo de Papa Agar Nutritivo (CPAN), fueron marcadas en los cuatro puntos cardinales, en cada punto se colocó una asada de la cepa antagonista, 24 h después se colocó una porción de micelio del fitopatógeno con crecimiento en medio de cultivo de 3 mm de diámetro y se incubaron a  $26 \pm 2$ °C. Para el ensayo de *Pythium* este se sembró 72 h después que el antagonista, debido al rápido crecimiento micelial que presenta esta alga fitopatógena. Los tratamientos empleados para la confrontación fueron similares para cada fitopatógeno; se realizaron ocho

tratamientos y un testigo (Tab. 1), con cuatro repeticiones por tratamiento. Se midió en mm el crecimiento radial del fitopatógeno en confrontación con cada cepa bacteriana, cada 24 h con ayuda de un Vernier digital (Truper) hasta que el testigo lleno la caja Petri. El crecimiento micelial se transformó a porcentaje de inhibición (%I), usando la formula descrita por Castillo *et al.*, (2015), ( $\%I = C - T/C \times 100$ ) donde C es el diámetro del testigo y T es el tratamiento. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), mediante el programa estadístico InfoStat versión 2019.1.2.0.

**Tabla 1:** Tratamientos utilizados para estudiar la capacidad antagonista de los fitopatógenos causantes del “damping off” de plantulas de Chile.

Tratamientos	Género	Acrónimo
1	<i>Bacillus</i> sp	BM2
2	<i>Bacillus</i> sp	BITB
3	<i>Bacillus subtilis</i>	B15
4	<i>Bacillus</i> sp	T13
5	<i>Bacillus subtilis</i>	BITV
6	<i>Bacillus</i> sp	BM1
7	<i>Bacillus</i> sp	*3
8	<i>P. donghuensis</i>	B?
9	Testigo	Tst

### **Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* “THZ” contra fitopatógenos**

Se determinó el nivel de inhibición mediante la técnica de confrontación dual en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas Petri fueron marcadas en dos de sus extremos a una distancia entre puntos de 5 cm, en un punto se colocó una porción de micelio de THZ con medio de cultivo de 3 mm de diámetro y 24 h después se colocó un disco con micelio del fitopatógeno en el otro extremo y se

incubaron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , por seis días, se consideraron cuatro repeticiones por tratamiento. El antagonismo del crecimiento micelial se determinó de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982), donde; 1= THZ cubre completamente al fitopatógeno y la superficie de la caja Petri, 2= THZ cubre al menos dos tercios de la superficie de la caja Petri, 3= THZ y el fitopatógeno colonizaron aproximadamente la mitad de la superficie de la caja Petri y ningún microorganismo parece dominar al otro, 4= el fitopatógeno cubre al menos dos tercios de la superficie de la caja Petri y parece resistir la invasión de THZ, y 5= el patógeno cubre completamente a THZ y la superficie de la caja Petri. Se considera que THZ es antagonista del fitopatógeno cuando este no sobrepasa el nivel 3 siendo este el de menor nivel de antagonismo y se considera que no tiene capacidad de antagonismo cuando el fitopatógeno alcanza los niveles 4 y 5. Se realizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos, siendo cada fitopatógeno igual a un tratamiento.

### **Efectividad biológica de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* en el control del “damping off” en plántulas de Chile**

Se realizó un experimento en charolas en invernadero, ubicado en el Departamento de Parasitología; las condiciones de temperatura durante el ensayo oscilaron alrededor de  $22-35^\circ\text{C}$ , con una media de  $28^\circ\text{C}$ , para esta prueba se utilizaron charolas estériles de unicel de 60 cavidades, las cuales se llenaron con una mezcla estéril de peat moss y perlita a razón de 2:1. Cada charola se llenó con 1.5 Kg de dicha mezcla, la cual fue previamente uniformizada y humedecida con 1.7 l de agua que contenía una solución de células de *Pythium* o *Fusarium* según correspondiera a una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml. Posteriormente, se sembraron dos semillas de Chile serrano por cada cavidad de la charola, las que fueron cubiertas por más sustrato de la mezcla. Después de 24 h se inocularon con los tratamientos que se indican en la tabla 2. Para esto se aplicó una solución de 1000 ml de agua a una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml, utilizando regaderas manuales. Posteriormente las charolas se extendieron en mesas germinativas y se cubrieron con plástico oscuro hasta su germinación, lo

cual sucedió al quinto día después de la siembra, posteriormente se continuo con la aplicación de los tratamientos antagonistas a los 15, 30 y 42 días que fue el termino de este experimento.

Los tratamientos evaluados fueron cada cepa antagonista por separado y las combinaciones de microorganismos compatibles, resultando la mezcla de dos cepas y un testigo inoculado con el fitopatógeno. Los fitopatógenos sometidos a esta evaluación fueron los agentes causales de la enfermedad encontrados en los aislamientos de plántulas con síntomas de la enfermedad (Tab. 2). Se obtuvieron un total de siete tratamientos y tres testigos, para un total de 10 tratamientos, con un diseño de bloques al azar, considerándose cada charola como 2 repeticiones, para un total de 20 repeticiones.

**Tabla 2:** Tratamientos antagonicos para fitopatogenos causantes de “damping off” para plantas cultivadas e inoculadas en charolas de unicel en invernadero.

	<i>Pythium</i>	<i>Fusarium</i>	Mezcla ( <i>P + F</i> )
Tratamientos	B?	BITV	THZ
	THZ	THZ	THZ+ B?
	B?+ THZ	Testigo	Testigo
	Testigo		

### Manejo agronómico de plántulas de chile

Los riegos se aplicaron diariamente por la mañana, utilizando una regadera manual y se fertilizo dos veces por semana al diluir en 1.7 l de agua 5 gr de fertilizante NPK (18-18-18+ M.E) de la marca SQM y se asperjo este volumen por charola. Para el control de insectos chupadores (*Bemisia tabaci* y *Bactericera cockerelli*), se realizaron dos aplicaciones de Imidacloprid, la primera a los 15 días de la emergencia de las plántulas y la segunda 25 días después.



### **Evaluación de la actividad de microorganismos beneficios para el control del “damping off” en plántulas de chile producidas en charolas bajo condiciones de invernadero**

En la etapa de preemergencia, se evaluó la variable de incidencia de la enfermedad expresada como porcentaje de semillas sin germinar, posteriormente se evaluó la incidencia en postemergencia tomando en cuenta la mortalidad de las plántulas cada cinco días desde que germinaron hasta los 42 días y se expresó como porcentaje de plantas muertas. La conversión de los datos a porcentaje de la incidencia se determinó con la fórmula:  $\text{Inc.} = (\text{núm. de plantas enfermas} / \text{núm., total de plantas}) * 100$  (Larios *et al.*, 2019).

### **Evaluación de la mortalidad de las plántulas 25 días después del trasplante**

A los 42 días después de la germinación (ddg) se realizó el trasplante de las plántulas a macetas y bolsas, estas fueron llenadas con una mezcla estéril de peat moss y perlita a una proporción de 75:25, respectivamente. Se eligieron seis plántulas aparentemente sanas de cada tratamiento, se trasplantaron en grupo de cuatro plántulas por maceta y en grupo de dos plántulas por bolsa, siendo cada plántula una repetición.

La incidencia de la enfermedad se determinó a los 25 días después del trasplante (ddt) y se consideró como porcentaje de plantas con la enfermedad con la fórmula  $\text{Inc.} = (\text{núm. de plantas enfermas} / \text{núm. Total de plantas}) * 100$ . Además, se evaluó la severidad de la parte aérea y de la raíz con las siguientes escalas descriptivas de cinco niveles; parte aérea: 0= planta sana, 1= Clorosis inicial de las primeras hojas, 2= clorosis intensa de aproximadamente del 50% del follaje y defoliación moderada, 3= clorosis total del follaje y defoliación severa, 4= plantas completamente defoliadas y necrosis del tallo (planta muerta). Parte de la raíz: 0= raíces y sistema vascular sano sin lesiones, 1= lesiones en la corteza de la raíz y/o raicillas. 2= colonización vascular significativa de la raíz que progresa hasta el cuello. 3= colonización vascular de raíz, cuello y parte del tallo, 4= raíces completamente necrosadas (planta muerta).

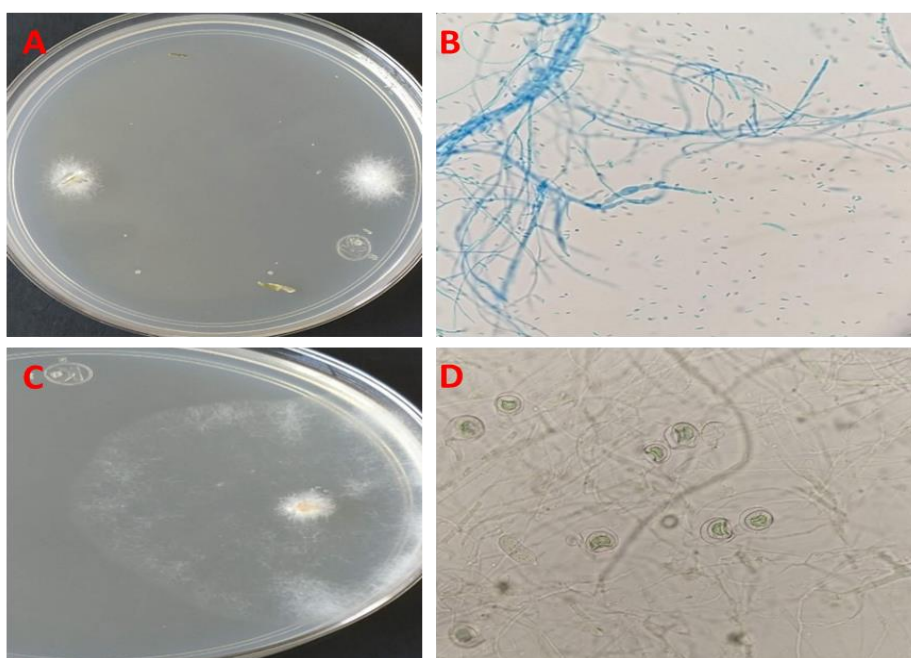
**Análisis estadístico**

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de comparación de medias de Duncan ( $P \leq 0.05$ ), con el programa estadístico InfoStat versión 2019.1.2.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Agentes causantes del “damping off” en plántulas de Chile

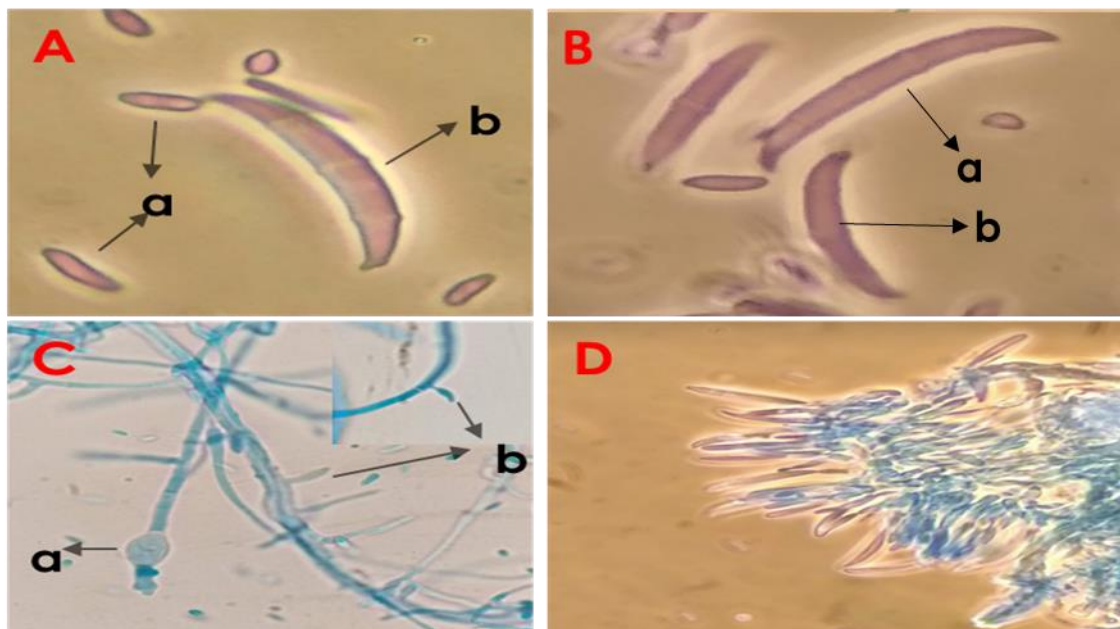
Se obtuvieron dos aislamientos que presentaron características macroscópicas diferentes. En uno de ellos se observó un crecimiento micelial blanco algodonoso, con hifas septadas, macroconidias y microconidias (Fig. 2- A- B), características típicas del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). El otro fitopatógeno presentó micelio blanco de rápido crecimiento, hifas hialinas y cenocíticas, oogonios con una oóspora en su interior y anteridios (Fig. 2- C- D), características similares a las del género *Pythium* (Van der Plaats, 1981).



**Figura 2:** Aislamiento de fitopatógenos causantes de “damping off”. A) Crecimiento blanco algodonoso. B) Preparación del crecimiento visto al microscopio compuesto. C) Crecimiento micelial de rápido desarrollo. D) Preparación del crecimiento vista al microscopio compuesto.

El aislamiento que presentó hifas septadas, se encontraron macroconidias curvas en forma de canoa de tres a cuatro septos, con célula pie en la parte basal (Fig. 3- Ab y B), microconidias bicelulares o unicelulares (Fig. 3- Aa), clamidosporas

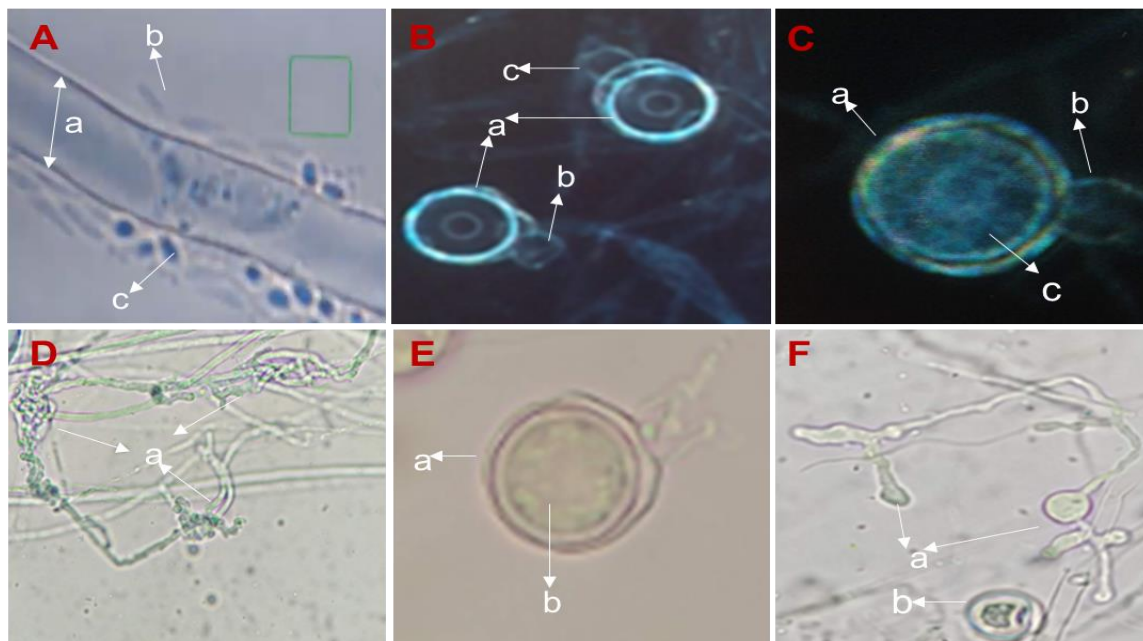
ovoides (Fig. 3- Ca), fialides cortas de donde se originan las conidias (Fig. 3- Cb) y esporodoquios (Fig. 3- D). Con las características descritas anteriormente se identificó a *Fusarium oxysporum*, concordando con las claves taxonómicas especializadas de Leslie y Summerell, (2006). Estas características concuerdan por las reportadas por diversos autores, los cuales mencionan la presencia de micelio algodonoso de coloraciones variadas desde blanquecino, rosado, hasta de una coloración morada, microconidias unicelulares y algunas bicelulares, macroconidias curvas de 3 a 4 septos en ocasiones hasta 5 septos con la célula apical atenuada y la basal en forma de pie, las cuales se originan de fialides cortas simples o ramificadas y clamidosporas de pared gruesa, terminales solitarias o en pares (Bruna *et al.*, 1991; Torres, 2000; Fraire *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Observación microscópica de *Fusarium oxysporum*. A) a- Microconidias y b- Macroconidia de 3 septos. B) a- Macroconidias de 4 septos y b- de 3 septos. C) a- Clamidospora esférica y b- Fialides. D) Esporodoquio.

El microorganismo del género *Pythium* presento hifas toruloides cenocíticas hialinas con diámetros de 5- 7  $\mu\text{m}$  (Fig. 4- Aa y Da), oogonios terminales esféricos lisos y de un diámetro de 25-28  $\mu\text{m}$  (Fig. 4- Ba, Ca, Ea, y Fb), con una oóspora aplerótica de 24- 26  $\mu\text{m}$  en el interior del oogonio (Fig. 4- Cc y Eb), anteridios diclinos o monoclinos uno por oogonio (Fig. 4- Bbc y Cb), esporangios

filamentosos e irregulares (Fig. 4- Fa), zoosporas en movimiento de 3  $\mu\text{m}$  de longitud y zoosporas enquistadas (Fig. 4- Abc). De acuerdo a las observaciones mencionadas anteriormente y concordando con las características descritas en las claves taxonómicas de Van der Plaats, (1981) y Tsuneo, (2010), se identificó como *Pythium aphanidermatum*. Sin embargo, existen diferencias con el tamaño de algunas estructuras, donde Van der Plaats describe a la hifa con un diámetro de 10  $\mu\text{m}$ , oogonios con un diámetro de 20 - 25  $\mu\text{m}$  con oóspora aplerótica de 18-22  $\mu\text{m}$  y de uno a dos anteridios por oogonio, mientras que en esta investigación se encontraron hifas de un diámetro de 5- 7  $\mu\text{m}$ , oogonios con diámetro de 25-28  $\mu\text{m}$  con oóspora aplerótica de 24- 26 de  $\mu\text{m}$  y con un solo anteridio por oogonio. Las características observadas en este estudio fueron similares a las observadas en el trabajo realizado por Díaz *et al.*, (2011) donde observo oogonios de 27.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y solo un anteridio por oogonio.



**Figura 4:** Observación microscópica de *Pythium aphanidermatum*. A) a- Hifa cenocítica, b- Zoosporas alargadas y c- Zoosporas enquistadas vistas al microscopio digital. B) a- Oogonios terminales esféricos lisos, b y c- Anteridios diclinos. C) a - Oogonio liso, b- Anteridio monoclinos y c - Oóspora aplerótica. D) a-Hifas toruloides vistas al microscopio compuesto. E) a - Oogonio terminal y b - Oóspora aplerótica. F) a- Esporangios irregulares y b- Oogonio esférico liso.

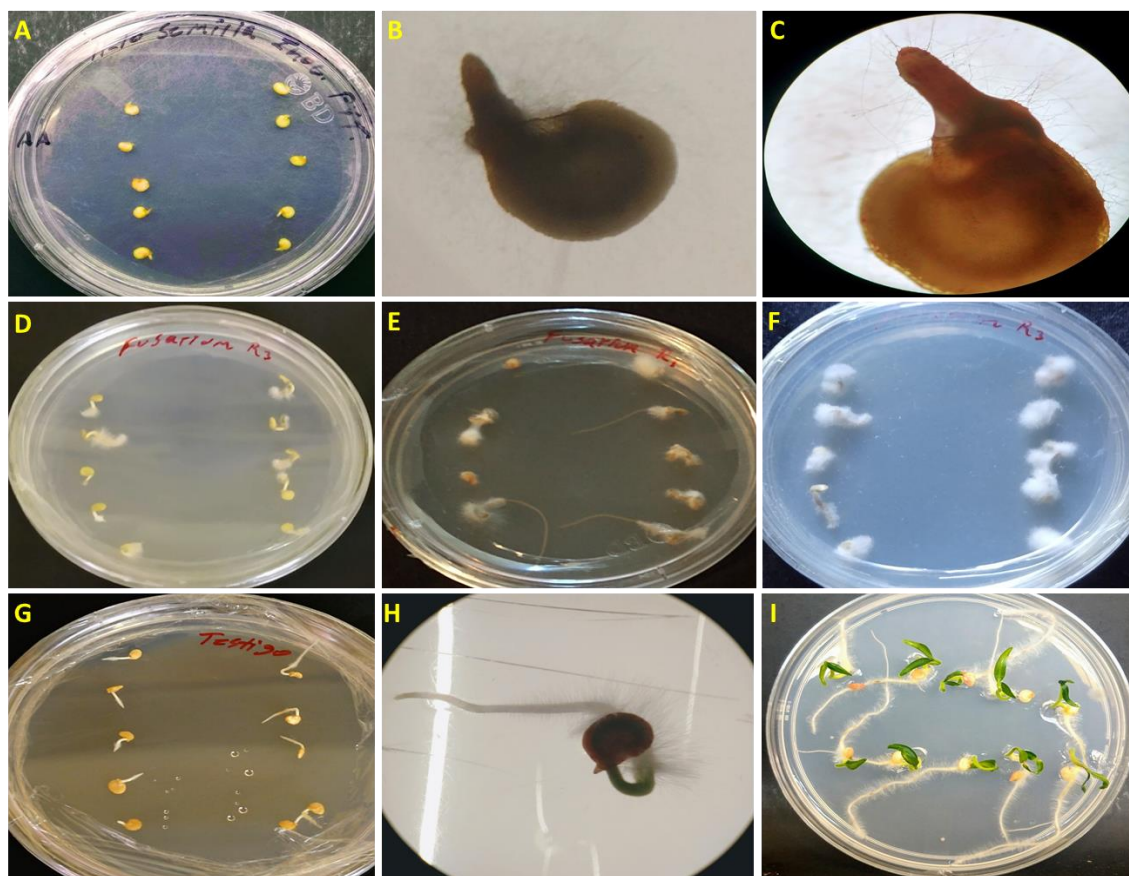
La identidad de esta especie se corroboró por secuenciación molecular, concordando con la especie *P. aphanidermatum* con un porcentaje de 99.15% en similitud, con clave de acceso JN695786.1, del Gen Bank, utilizando los primers de secuenciación ITS1 e ITS4. Otros investigadores para caracterizar esta especie han empleado primers diferentes como ITS4 e ITS5, ITS1 e ITS2 (Al-Sheikh, 2010; Días *et al.*, 2011), por su parte, Grijalba *et al.*, (2015) utilizaron los primers ITS4 e ITS5, confirmando la identidad de la especie *P. aphanidermatum* como causante del ahogamiento de plantas de trigo, tomate y ornamentales. En esta investigación se reporta a *P. aphanidermatum* como fitopatógeno de plántulas de chile producidas en invernadero.

### **Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad en preemergencia en semillas inoculadas con *P. aphanidermatum*, mostraron crecimiento de micelio ralo y blanquecino 24 h después de la inoculación (hdi), cinco días después de la inoculación (ddi) se observó el crecimiento del hipocótilo (Fig. 5- A), el cual estaba menos desarrollado que en los tratamientos inoculados con *F. oxysporum* y el testigo (Fig. 5- B). Transcurridos 12 ddi se observó que los tratamientos inoculados con *P. aphanidermatum* no mostraron el desarrollo de cotiledones, ni de raíz y su hipocótilo se encontró necrosado y con presencia de micelio (Fig. 5- C), por lo que se consideramos que *P. aphanidermatum* es un agente causal de “damping off” preemergente en plántulas de chile.

En los tratamientos inoculados con *F. oxysporum*, las semillas mostraron desarrollo de micelio hasta los tres ddi, posteriormente, cinco ddi, las semillas tenían más desarrollado el hipocótilo que las semillas inoculadas con *P. aphanidermatum*, pero con mayor presencia de micelio (Fig. 5- D). Las semillas a los 12 ddi se encontraron completamente cubiertas por un micelio blanco algodonoso (Fig. 5- E y F) y solo algunas habían logrado desarrollar la raíz, pero esta se encontraba completamente necrosada y con presencia de micelio (Fig.

5- E), por lo anterior consideramos que *F. oxysporum* es un agente causal del “damping off” preemergente en plántulas de Chile.



**Figura 5:** Prueba de patogenicidad en preemergencia. A) Semillas inoculadas con *P. aphanidermatum*. B) Semilla con el hipocótilo poco desarrollado, necrosado y con presencia de micelio. C) Semilla 12 ddi con su hipocótilo necrosado y con presencia de micelio. D) Semillas inoculadas con *F. oxysporum* cinco ddi. E) Semillas 6 ddi con presencia de micelio y algunas con desarrollo de raíz ya necrosadas. F) Semillas 12 ddi con completamente cubiertas con micelio. G) Tratamiento testigo. H) Semilla a los seis días con desarrollo de su raíz. I) Tratamiento testigo a los 12 días, semillas desarrolladas con presencia de raíz, tallo y cotiledones.

En los tratamientos testigos, las semillas en cinco días presentaron desarrollo de su raíz (Fig. 5- G), la cual estaba más desarrollada que en los tratamientos inoculados con los fitopatógenos, al ser de un mayor tamaño y contar con pelillos absorbentes (Fig. 5- H). Transcurridos 12 días, estas ya presentaban un desarrollo normal de sus raíces, un pequeño tallo y cotiledones, estructuras no observadas en las cajas Petri inoculadas con los aislamientos sometidos a este estudio (Fig. 5- I).

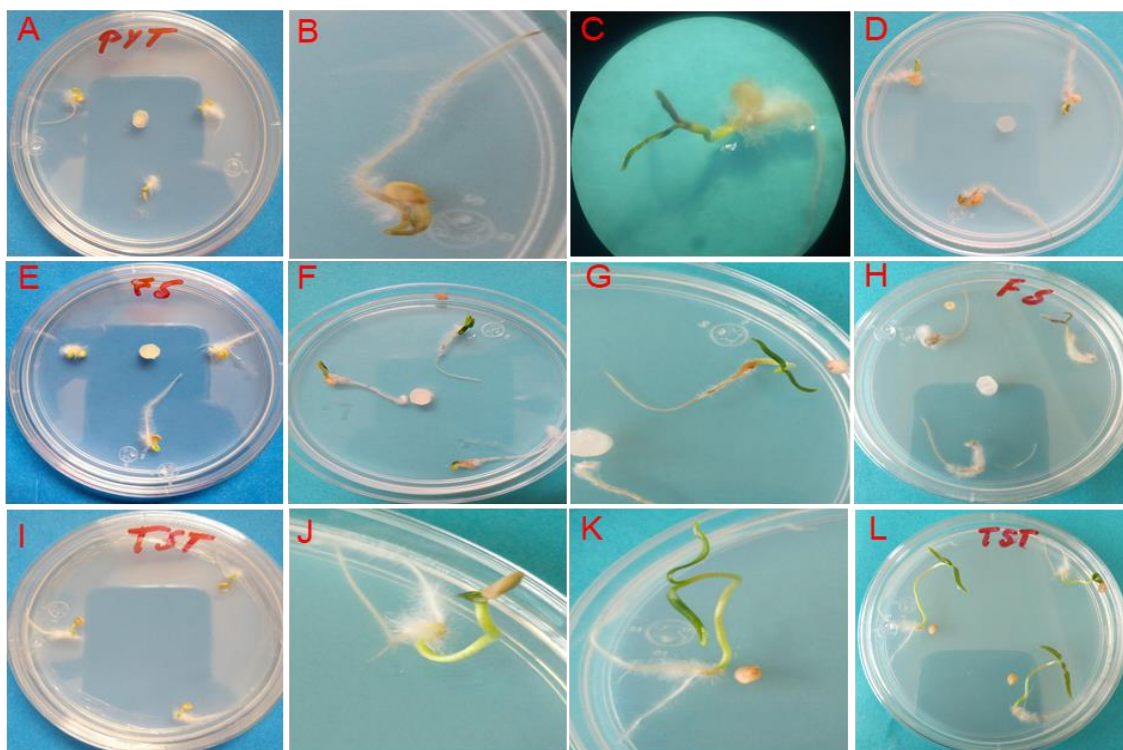
Las pruebas de patogenicidad en postemergencia, en plantas inoculadas con porción de micelio de *P. aphanidermatum* (Fig. 6- A- D), mostraron síntomas de necrosis en raíces y abundante micelio a los tres ddi (Fig. 6- B), los cotiledones presentaron manchas necróticas (Fig. 6- C). A los cinco ddi las plántulas de los tratamientos con inoculo mostraron una necrosis total y abundante crecimiento micelial (Fig. 6- D).

Los tratamientos inoculados con una porción de *F. oxysporum* (Fig. 6- E- H), presentaron puntos necróticos en la raíz a los cuatro ddi (Fig. 6- F y G), estos puntos fueron creciendo hasta necrosar por completo la plántula, esto a los nueve ddi, además, las plántulas mostraron un crecimiento abundante de micelio blanco (Fig. 6- H).

En los tratamientos testigos las plántulas tuvieron un desarrollo normal de raíz, tallo y cotiledones, sin presentar signos de los fitopatógenos (Fig. 6- I- L).

De acuerdo a la escala de severidad propuesta, el nivel de daño observado en los cotiledones, hipocótilo y raíz de los tratamientos inoculados de ambas metodologías se ubicó en el nivel 4, que es el nivel más alto de la escala; ocasionando necrosis, pudrición de semillas y muerte de la plántula, mientras que los tratamientos testigos se ubicaron en la escala 0 que es el nivel más bajo al no presentar daños. Dado lo anterior se considera que las especies *P. aphanidermatum* y *F. oxysporum* son agentes causales del “damping off” y muerte de plántulas de Chile.





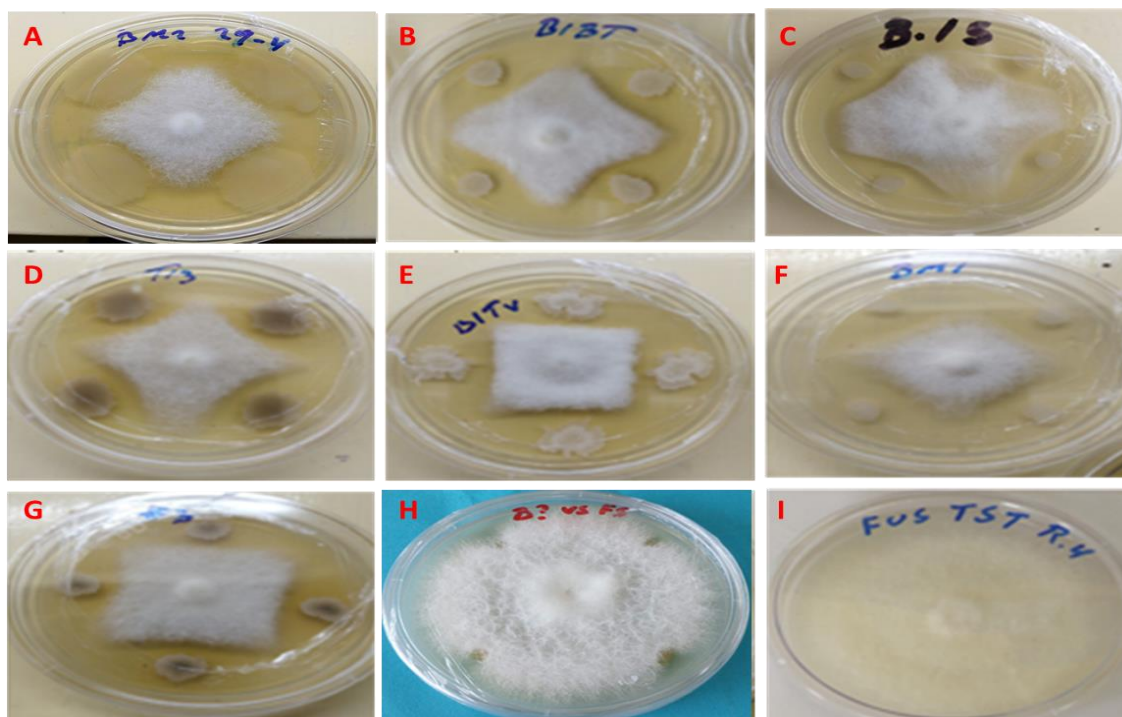
**Figura 6:** Prueba de patogenicidad en postemergencia. A) Inoculación de tratamientos con *P. aphanidermatum*. B y C) Tratamientos inoculados con *P. aphanidermatum* a los tres ddi. D) Tratamientos inoculados con *P. aphanidermatum* a los cinco ddi. E) Inoculación de tratamientos con *F. oxysporum*. F y G) Tratamientos inoculados con *Fusarium* cuatro ddi. H) Tratamientos inoculados con *F. oxysporum* nueve ddi. I) Tratamientos testigos, J) a los tres días, K) a los cuatro días y L) al noveno día.

Estos resultados coinciden, en cierta manera, con los reportados por otros autores, donde afirman la capacidad de estos fitopatógenos de causar “damping off”. Sánchez *et al.*, (2015) mencionan al género *F. oxysporum* como agente causal del “damping off” en almácigos, donde este hongo causa pudrición en almácigos de cebolla en preemergencia y postemergencia. Jiménez, *et al.*, (2018) reportan a las especies *F. oxysporum* y *F. solani* como agentes causales de esta enfermedad en plántulas de chile poblano con una mortalidad del 49.54 y 56%, respectivamente, hasta los 30 días que duró la prueba, el tiempo y los porcentajes de mortalidad son diferentes a los resultados de este trabajo debido a la

metodología empleada en los ensayos, los cuales realizaron su trabajo experimental en maceta con sustrato y en condiciones de invernadero, a diferencia de nuestra investigación que se realizó en condiciones *in vitro*. De igual manera, Gravel *et al.*, (2005) reportan a *P. aphanidermatum* y *P. ultimum* como agentes causales de la pudrición de semillas y plántulas de tomate. Existe concordancia de nuestro trabajo con el de Apodaca *et al.*, (2004), quienes mencionan que las especies de *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum* causan pudriciones en semilleros de chile y jitomate en condiciones de invernadero, reportando incidencia y severidad de un 10 hasta el 100%. Al igual Dar, *et al.*, (2015) reportan a *F. oxysporum* y *Pythium* sp., como los principales agentes causales del “damping off” en plántulas las cuales murieron a los pocos días después de la inoculación.

### **Antagonismo *in vitro* de bacterias contra agentes causales del “damping off”**

En las pruebas *in vitro* contra *F. oxysporum* todas las cepas del género *Bacillus* mostraron la capacidad de inhibir en diferentes porcentajes el crecimiento micelial del hongo (Fig.7- A- G), en la Tabla 3 se aprecia que la cepa BITV (Fig. 7- E) fue la que mostro la mayor capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* con 56.24%, seguida de la cepa T13 (Fig. 7- D) con 52.09% (Tab. 3), mientras B15 (Fig. 7- C) fue la cepa de *Bacillus* que mostró la menor capacidad de inhibir a este fitopatógeno con un 39.35% (Tab. 3), en cambio la cepa de *P. donghuensis* “B?” (Fig. 7- H) no mostró tener capacidad inhibitoria en contra de *F. oxysporum* (Tab. 3), lo anterior, este efecto se observo durante seis días de evaluación del experimento, tiempo que duro el testigo en llenar la caja Petri (Fig. 7- I) (Tab. 3). Ninguna de estas cepas mostro la capacidad de inhibir la esporulación del hongo.



**Figura 7:** Confrontación *in vitro* de las diferentes cepas de bacterianas contra *F. oxysporum* a los seis días. Cepas de *Bacillus* A) BM2, B) BIBT, C) B15, D) T13, E) BITV, F) BM1 y G) \*3. H) *Pseudomonas donhuensis* "B?". I) Testigo.

Existen diversos estudios sobre la capacidad antagónica de diferentes géneros de bacterias entre los que se encuentran los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Los rangos de antagonismo de estas bacterias son variados, por ejemplo, Mejía *et al.*, (2016) probaron 10 cepas de *Bacillus* en confrontación contra dos especies de *Fusarium*, de las cuales todas mostraron capacidad antagónica con rangos de inhibición del 21 al 71%. Por su parte, Velasco *et al.*, (2016) reportan rangos de inhibición de 42 a 51% por especies de *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* respectivamente, ambos autores mencionan rangos diferentes de inhibición, los cuales son similares a los encontrados en esta investigación. Se menciona que la capacidad antagónica de este género de bacteria se debe a la capacidad de producir compuestos volátiles y antibióticos, como los lipopeptidos Iturina, Fengicina y Surfactina, los cuales actúan en la pared celular del hongo, además, quitinasas involucradas en la inhibición de la elongación de las hifas. De igual forma Asaka *et al.*, (1996) mencionan que la inhibición

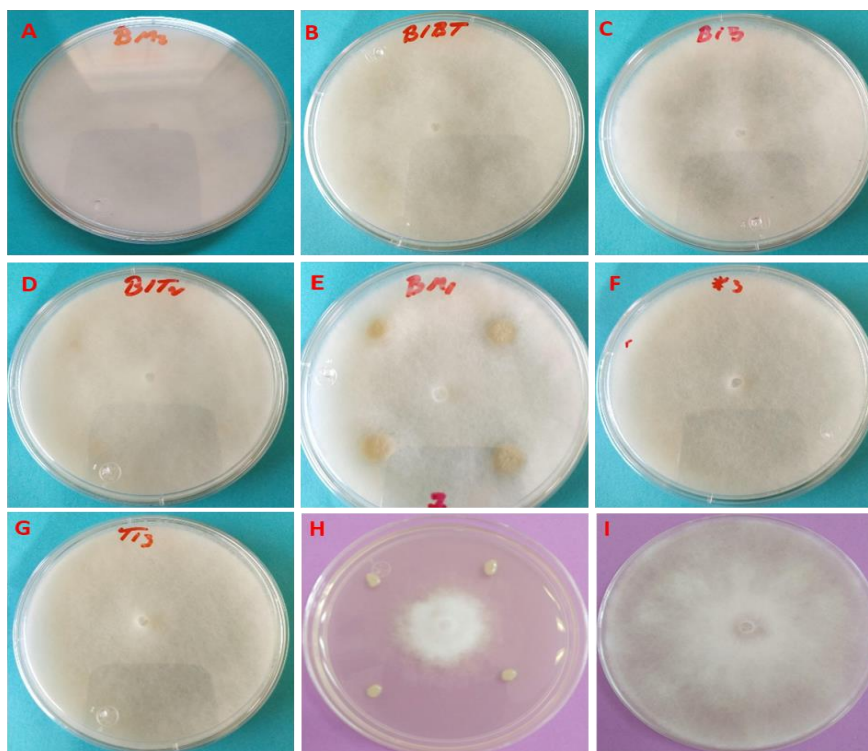
producida por *B. subtilis* en contra de *Rhizoctonia solani* se debe a la capacidad de esta bacteria en producir Iturina A y surfactina. A diferencia de este estudio Guerra *et al.*, (2011) reportan una cepa de *P. fluorescens* con la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

**Tabla 3:** Inhibición de *Bacillus* spp y *Pseudomonas donghuensis* a *Fusarium oxysporum* en placas de cultivo.

Tratamientos	Media del crecimiento (mm $\pm$ DS)
<b><i>Bacillus subtilis</i>. BITV</b>	56.24 $\pm$ 1.27 a
<b><i>Bacillus</i> sp. T13</b>	52.09 $\pm$ 0.95 b
<b><i>Bacillus</i> sp. BIBT</b>	49.62 $\pm$ 1.26 b
<b><i>Bacillus</i> sp. BM1</b>	49.43 $\pm$ 1.26 bc
<b><i>Bacillus</i> sp. BM2</b>	48.82 $\pm$ 1.39 bc
<b><i>Bacillus</i> sp. *3</b>	46.10 $\pm$ 1.79 c
<b><i>Bacillus subtilis</i>. B15</b>	39.35 $\pm$ 2.65 d
<b><i>Pseudomonas donghuensis</i>. B?</b>	0.00 $\pm$ 0 e
<b>Testigo</b>	0.00 $\pm$ 0 e

\*Medias estadísticas con letras distintas son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Promedios de cuatro repeticiones.

En las confrontaciones *in vitro* contra *P. aphanidermatum* se utilizaron los mismos tratamientos y repetición que en *Fusarium*, las inoculaciones de los tratamientos se realizaron 72 h antes que el fitopatógeno, esto debido a que el fitopatógeno mostró una gran velocidad de crecimiento micelial al llenar la caja Petri en dos días (Fig. 7- I). A diferencia del ensayo de *F. oxysporum* ninguna de las cepas de *Bacillus* spp., mostró capacidad de inhibición hacia esta alga fitopatógena (Fig. 7- A- G) (Tab. 4), ya que *P. aphanidermatum* en un periodo de 32 h invadió completamente las cajas Petri con un crecimiento micelial sobre los antagonistas, solo la cepa de *Pseudomonas* mostró la capacidad de inhibir en un 56% el crecimiento micelial de *P. aphanidermatum* (Fig. 7- H) (Tab. 4).



**Figura 8:** Confrontación *in vitro* de las diferentes cepas bacterianas contra *P. aphanidermatum* a las 48 horas. Cepas de *Bacillus*, A) BM, B) BITB, C) B15, D) BITV, E) BM1, F) \*3, G) T13, H) *Pseudomonas donhuensis* "B?". I) Testigo.

Estos resultados coinciden con los reportados por Gravel *et al.*, (2005) donde mencionan la capacidad antagonista del género *Pseudomonas* para inhibir a *Pythium*, reportándose que los aislamientos de los géneros de bacterias Gram+ no muestran capacidad de inhibir el crecimiento micelial de esta alga, lo que concuerda con los datos obtenidos en nuestro estudio al observarse que las bacterias Gram+ (*Bacillus*) no tuvieron ningún efecto antagónico hacia este fitopatógeno. Por su parte, Villa *et al.*, (2005), encontraron que la capacidad antagonica del género *Pseudomonas* se debe a la capacidad de producir compuestos antibioticos y sideroforos, como resultado obtuvo un 60 y 90% de inhibición en contra de *Sclerotium rolfsii*, además, mencionan que estos compuestos tienen efecto inhibitorio en contra de otros fitopatógenos como es el caso de *Pythium*, como se demostró en este estudio donde *Pseudomonas* logro inhibir al alga fitopatógena en un 56%. Los resultados obtenidos en este trabajo

con la cepa de *P. donghuensis* afirma lo propuesto por Gao, *et al.*, (2015) los cuales reportan a la especie *P. donghuensis* como una gran candidata en control biológico debido a su alta capacidad de producir sideroforos.

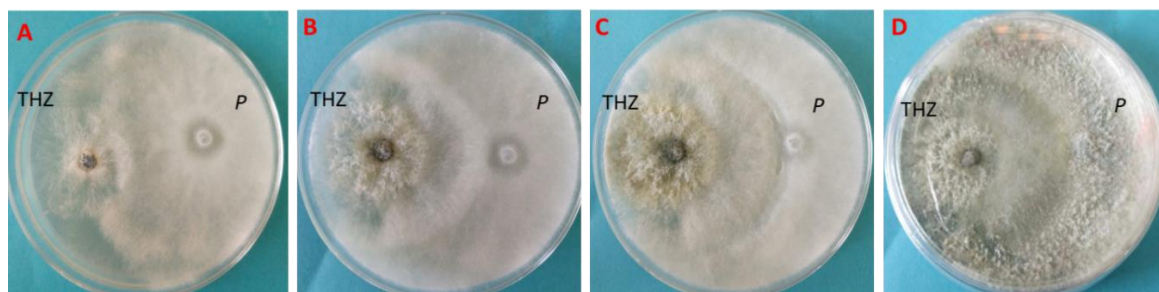
**Tabla 4:** Inhibición de *Bacillus* spp y *Pseudomonas donghuensis* a *P. aphanidermatum* en placas de cultivo.

<b>Tratamientos</b>	<b>Media del crecimiento (mm ± DS)</b>
<b><i>Pseudomonas donghuensis</i> B?</b>	56.00± 1.70 a
<b><i>Bacillus</i> sp. BM2</b>	0.00± 0 b
<b><i>Bacillus</i> sp. BM1</b>	0.00± 0 b
<b><i>Bacillus</i> sp. T13</b>	0.00± 0 b
<b><i>Bacillus</i> sp. *3</b>	0.00± 0 b
<b><i>Bacillus subtilis</i> BITV</b>	0.00± 0 b
<b><i>Bacillus</i> sp. BIBT</b>	0.00± 0 b
<b><i>Bacillus subtilis</i> B15</b>	0.00± 0 b
<b>Testigo</b>	0.00± 0 b

\*Medias estadísticas con letras distintas son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Promedios de cuatro repeticiones.

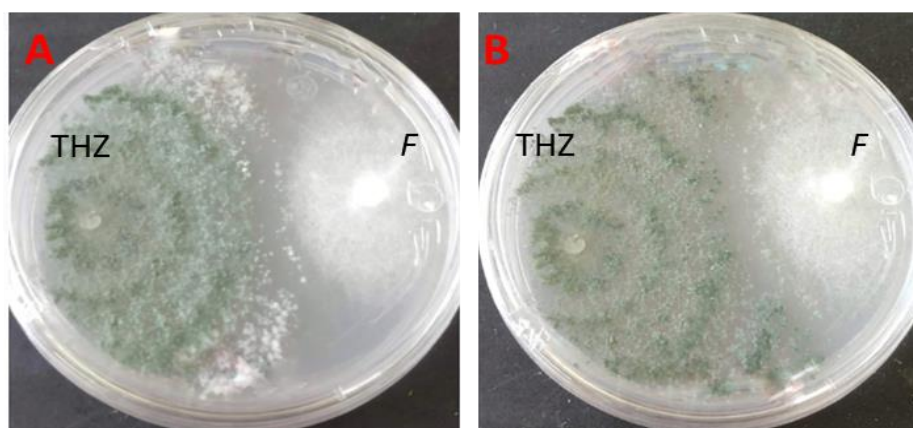
### **Evaluación del antagonismo entre *T. harzianum* y los fitopatógenos**

En la confrontación de THZ contra *P. aphanidermatum* el contacto entre ambos microorganismos se dio a las 48 h con un ligero crecimiento micelial de *P. aphanidermatum* sobre el crecimiento de THZ, en este caso el oomycete presento un mayor crecimiento micelial cubriendo la tercera parte de la caja Petri (Fig. 9- A), ubicándose en el nivel 4 de la escala de Bell *et al.*, (1982). A las 72 horas THZ creció sobre el micelio de *P. aphanidermatum* (Fig. 9- B), a las 96 horas THZ invadió dos tercios de la caja Petri (Fig. 9- C), para los seis días THZ cubrió por completo el crecimiento micelial de *P. aphanidermatum* y esporuló sobre él, además de presentar parasitismo y haber llenado completamente la caja Petri (Fig. 9- D), ubicándose en el nivel 1 de la escala de Bell *et al.*, (1982).



**Figura 9:** Confrontación *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y *Pythium aphanidermatum*. A) a las 48 h. B) a las 72 h. C) a las 96 horas. D) a las 144 h. *T. harzianum*= THZ y *P. aphanidermatum*= P.

En los tratamientos confrontados contra *F. oxysporum*, el contacto entre microorganismo se dio hasta los 4 días, THZ cubrió dos tercios de la caja Petri (Fig. 10- A) y permaneció de esta manera hasta los seis días, sin mostrar capacidad de parasitismo como en el caso con *Pythium*, sin embargo, en este caso *Trichoderma* (THZ) sólo mostró la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium* mediante antibiosis por lo cual no permitió que el hongo se desarrollara (Fig. 10- B). Según la escala de Bell *et al.*, (1982) THZ se ubica en el nivel 2 de antagonismo en contra de *F. oxysporum*.



**Figura 10:** Confrontación *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum*. A) momento en que los microorganismos entraron en contacto. B) crecimiento de los microorganismos a los 6 ddi. *T. harzianum*=THZ y *F. oxysporum*= F.

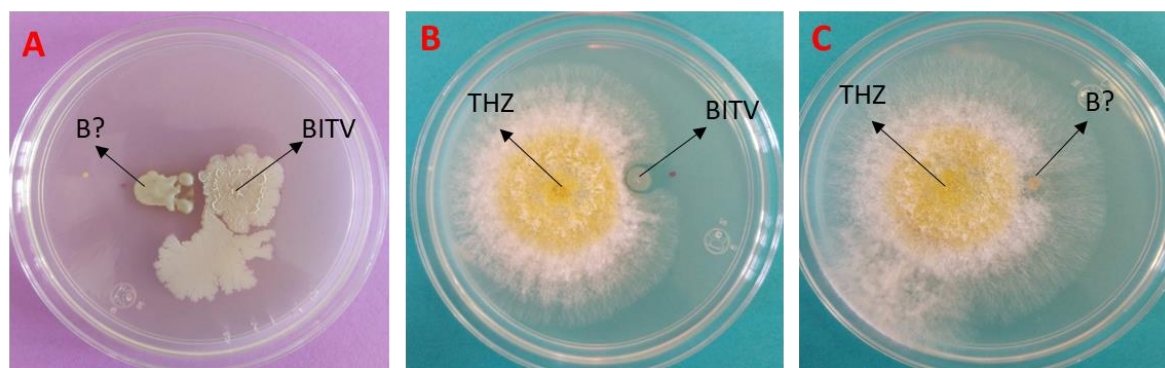
Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Sánchez *et al.*, (2015); dichos autores reportan la capacidad de algunas especies de *Trichoderma* de inhibir a patógenos, como es el caso de *F. oxysporum*, donde se obtuvo diferentes grados de inhibición desde un 20 hasta 58%, además mencionan que una de las características más importantes de *Trichoderma* para el biocontrol es su rápido crecimiento y competencia por nutrientes y espacio; también reportan la producción de compuestos volátiles, los cuales tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. Por su parte, Gajera *et al.*, (2010) mencionan que *Trichoderma* produce algunos compuestos como glucanasa B-1,3, proteasas y quitinasas, que inhiben el crecimiento de *Aspergillus*. Por su parte Sandoval *et al.*, (2001) reportan a *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* con propiedades de hiperparasitismo, especialmente contra oomycetos, donde causa deformación o destrucción de las paredes celulares, vaculación citoplasmáticas. Mientras que Leiva *et al.*, (2009) reportan que *T. viridae* inhibe en un 80% a *P. debaryanum*, mostrando la capacidad de crecer, al cubrir totalmente el micelio del fitopatógeno, y esporular sobre él. Estos resultados son similares a los de este estudio donde se encontró a *Trichoderma* empleando el parasitismo al crecer y cubrir totalmente el crecimiento micelial de *P. aphanidermatum* y esporular sobre él, además presento efecto de antibiosis al inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

### **Compatibilidad entre especies antagonistas**

Como resultado de las confrontaciones de los microorganismos benéficos se obtuvo solamente una prueba positiva y dos negativas. La cepa *P. donhuensis* (B?) fue compatible con *T. harzianum*, esto al no mostrar halo de inhibición (THZ) (Fig. 11- C). Por su parte, la cepa *B. subtilis* (BITV) presento incompatibilidad con *P. donhuensis* (B?), esto al rodear el crecimiento de (B?) (Fig. 11- A), mientras que la confrontación de THZ contra BITV, es el hongo quien rodea el crecimiento bacteriano (Fig. 11- B). Estos resultados son similares a los obtenidos por Latha *et al.*, (2011) donde describe la compatibilidad *in vitro* de *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *T. viride*, ya que en las confrontaciones de estos agentes de biocontrol ninguno mostro zonas de inhibición y estos crecían entre sí, a



diferencia en este estudio donde las únicas cepas que mostraron ser compactibles fueron *Trichoderma* (THZ) y *P. donghuensis* (B?), mientras que la cepa de *B. subtilis* (BITV) mostro ser incompatible con *T. harzianum* (THZ) y *P. donhuensis* (B?).



**Figura 11:** Confrontación entre microorganismos benéficos. A) Antagonismos entre *Pseudomonas donhuensis* “B?” y *Bacillus subtilis* “BITV”. B) Antagonismo entre *B. subtilis* “BITV” y *T. harzianum* “THZ”. C) Compatibilidad entre *P. donhuensis* “B?” y *T. harzianum* “THZ”.

### **Efectividad biológica de *B. subtilis*, *P. donghuensis* y *T. harzianum* al “damping off” en preemergencia y postemergencia en plántulas de chile**

En los tres experimentos se observo que el fitopatógeno que presentó la mayor incidencia en ambas etapas fue *P. aphanidermatum* (28.33 y 39.53%) con un incremento del 21.43% y 13.66% en preemergencia y postemergencia con respecto a *F. oxysporum* que presento la menor incidencia en ambas etapas (23.33 y 34.78%) (Fig. 12), una respuesta similar fue obtenida por Perdomo, et al., (2007) quienes obtuvieron una incidencia en *Pythium* de casi el 50%, mientras que en *Fusarium* fue menor al 10%.

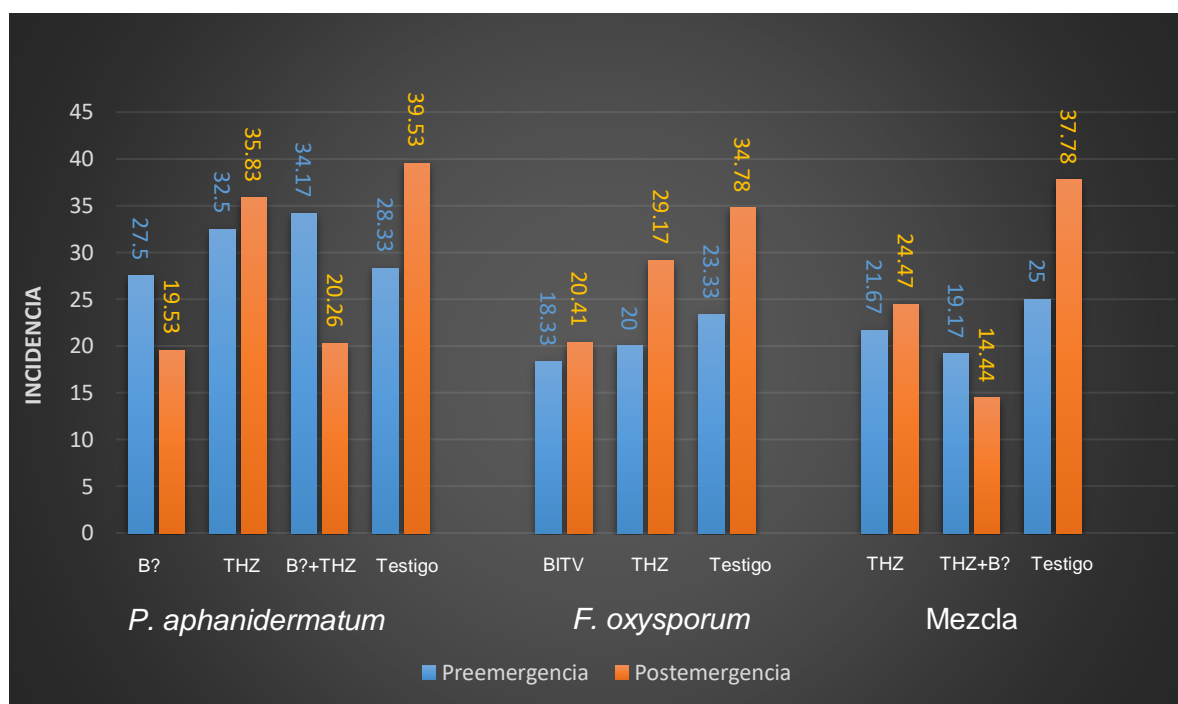
El análisis de varianza del experimento con plantas infestadas con *P. aphanidermatum* tratadas con *P. donghuensis* (B?) y la mezcla de *P. donghuensis* mas *T. harzianum* (B?+THZ) presentaron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) lo que indica que la aplicación de estos tratamientos disminuyeron la incidencia de la

enfermedad en la etapa postemergencia, mientras en la etapa de preemergencia solamente las plántulas tratadas con *P. donghuensis* mostraron una disminución de la enfermedad del 2.92% con respecto al Testigo (Tab. 5). Estos resultados son similares en parte a los reportados por Gravel *et al.*, (2005), donde mencionan que al utilizar dos cepas de *Pseudomonas* redujo en un 62.5 y 87.5% la incidencia del “damping off”, causado por *P. ultimum* y *P. aphanidermatum*, mientras que en este trabajo la aplicación de *P. donghuensis* redujo la enfermedad en un 50.59%, también mencionan que al utilizar dos cepas de *Trichoderma* la incidencia de la enfermedad fue mayor, resultado similar al presentado en este trabajo donde las plántulas tratadas con *T. harzianum* presentaron una incidencia mayor de la enfermedad, que en las plántulas tratadas con la cepa de *P. donghuensis* (Fig. 12). De igual manera Villanueva (2018) reporta en plántula de pepino incidencias mayores a las obtenidas en este trabajo, mediante la aplicación de *Trichoderma asperellum* obtuvieron incidencias de 40%, mientras que las plántulas tratadas con los tratamientos de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma fetile* las incidencias fueron superiores al 50%.

Para el caso de las plantas infestadas con *F. oxysporum* el análisis de varianza en la etapa de preemergencia no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo, en la etapa de postemergencia las plántulas tratadas con *B. subtilis* mostraron una incidencia de la enfermedad del 20.41% (Fig. 12) siendo esta menor y significativamente diferente a la presentada en las plántulas tratadas con *T. harzianum* (29.17%) y el Testigo (34.78%) (Fig. 12 y Tab. 6). Por su parte Hernández *et al.*, (2018) reportan incidencias de “damping off” del 70% y 90% en plántulas de chile tratadas con *Bacillus sp.* y del 60 y 70% en plántulas tratadas con *Pseudomonas chlororaphis*, al igual que Catro *et al.*, (2019) quienes reportan una incidencia de la enfermedad del 90% utilizando mezclas de *Bacillus spp.*, siendo estas incidencias mayores a la obtenida en este trabajo.

En las plantas infestadas con la mezcla de los fitopatógenos se puede apreciar en la Tabla 7 que los tratamientos presentaron diferencia significativa con respecto al Testigo en ambas etapas, siendo el tratamiento de la mezcla de *T.*

*harzianum* y *P. donghuensis* el que presentó la menor incidencia de la enfermedad la cual fue de 19.17 y 14.44% en las etapas de pree y postemergencia (Fig. 12). Perdomo, et al., (2007) reportan que mediante aplicaciones de *T. harzianum* redujeron la incidencia del “damping off” provocado por *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* en un 127.5% con respecto al Testigo esto en plántulas de tomate, mientras que en este trabajo la aplicación de *T. harzianum* solo redujo la enfermedad en un 13.32 y 35.23% y en combinación con *P. donghuensis* esta se redujo en un 23.3 y 61.77% (Tab. 7).

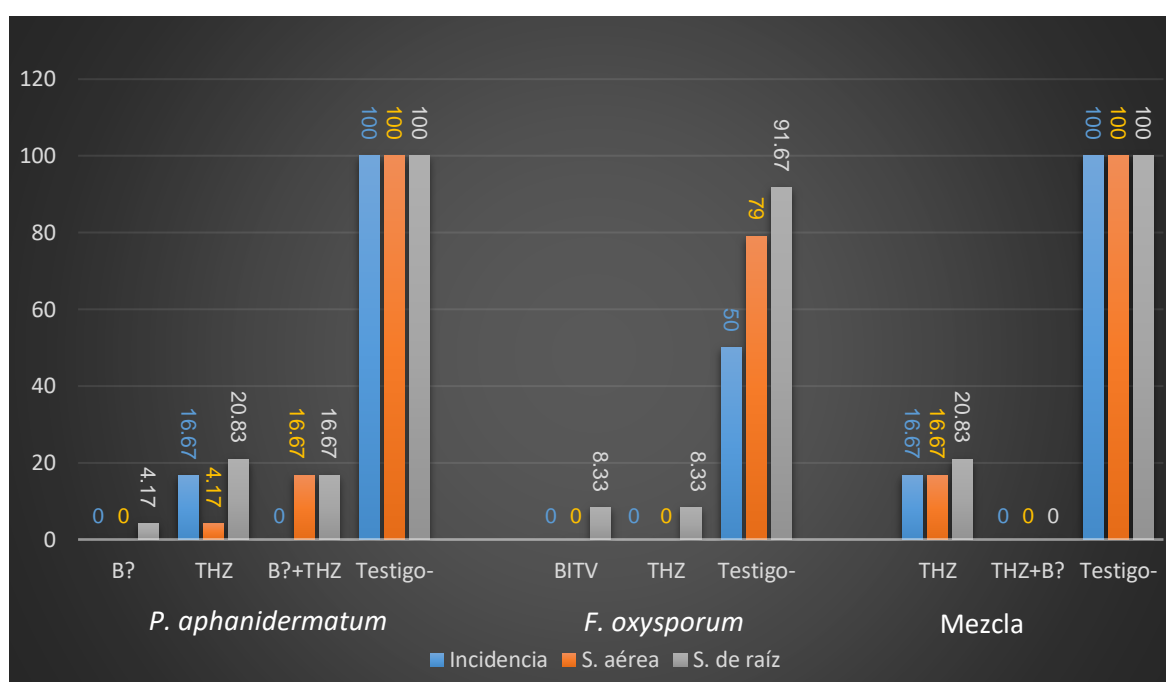


**Figura 12:** Incidencia del “damping off” en pree y postemergencia de las plántulas de chile infestadas con los fitopatógenos en invernadero.

### **Evaluación de la incidencia y severidad de las plántulas de chile infestadas con los fitopatógenos a 25 días después del trasplante.**

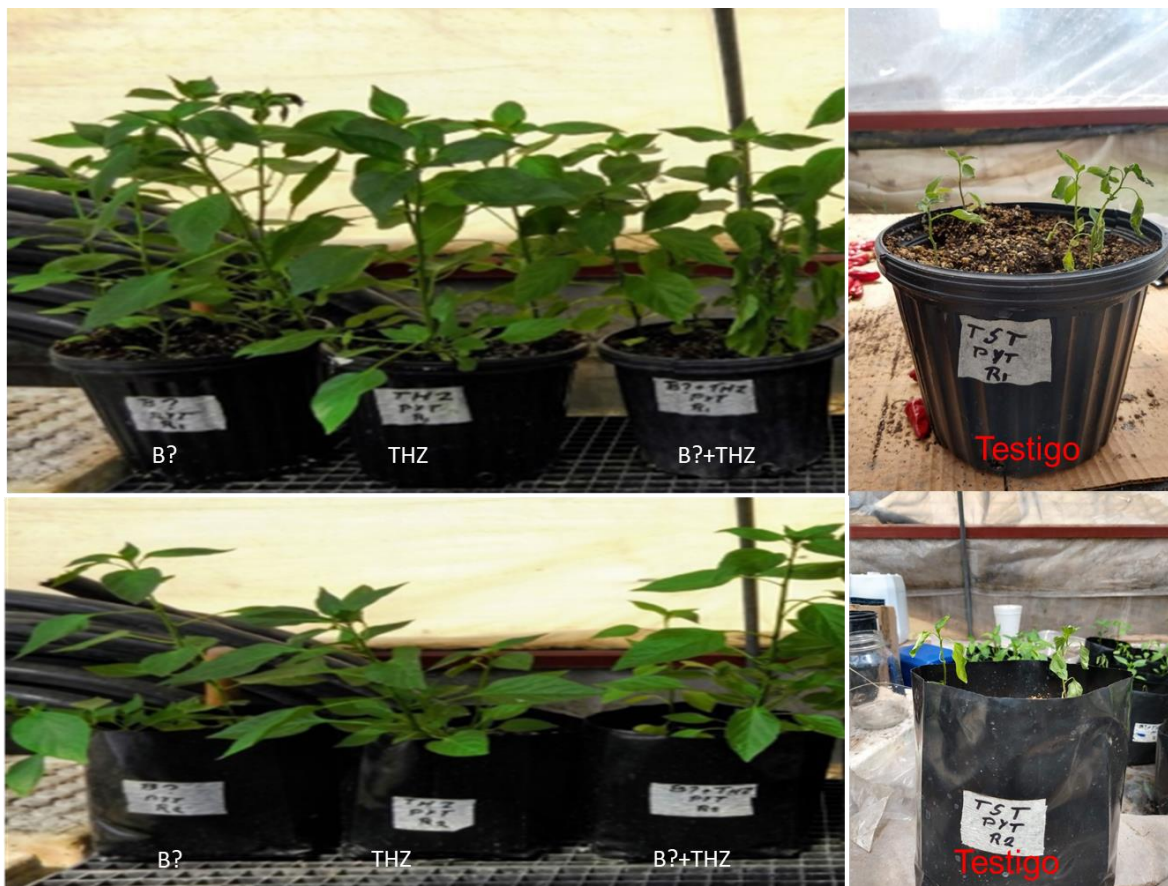
En la Figura 16 se puede observar que todos los tratamientos presentaron menor incidencia y severidad que los Testigos. Fue notorio apreciar síntomas relacionados con clorosis y caída de hojas provocados por ambos fitopatógenos en las plántulas de chile sin tratamiento, mientras que las plántulas con tratamiento los síntomas fueron de leves a desapercibidos (Fig. 17, 18 y 19).

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Guillen *et al.*, (2006) quienes señalan que en plantas de Chile inoculadas al momento del trasplante obtuvieron incidencias del 19% hasta el 28.80%, mediante la aplicación de tratamientos con diferentes cepas de *Bacillus spp.*, mientras el Testigo alcanzó una incidencia del 96%, datos similar a los obtenidos este trabajo en el que se reporta una incidencia del 100% en los Testigos de *P. aphanidermatum* y la mezcla de los fitopatógenos, mientras que los Testigos de *F. oxysporum* presentaron el 50% de incidencia, sin embargo, estos últimos presentaron una alta severidad aérea y de raíz del 79 y 91.67% (Fig. 16).



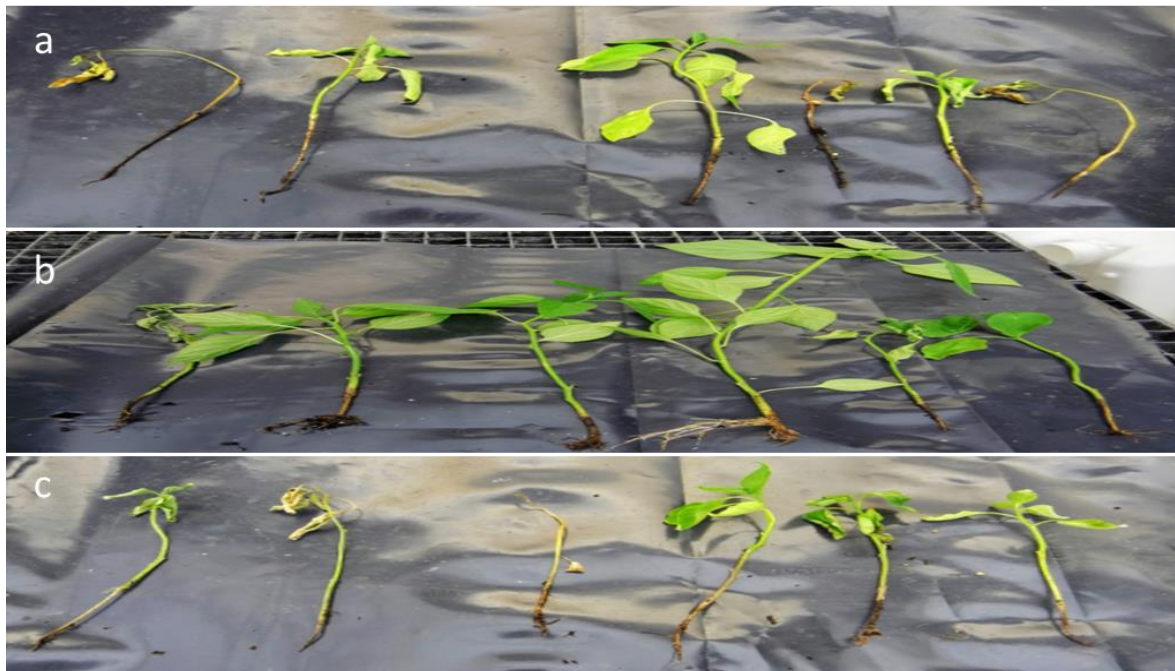
**Figura 16:** Incidencia, severidad aérea y de la raíz a los 25 días después del trasplante de las plántulas de Chile.

En la Figura 17 se muestran imágenes de crecimiento de plantas de Chile tratadas y comparadas contra el Testigo, donde se observa claramente las diferencias en tamaño, follaje y vigor de las plantas tratadas con *P. donghuensis* mas *T. harzianum* (B?+THZ) donde fue posible comparar el efecto *in vitro* del laboratorio y del control de los fitopatógenos asociados "damping off" al trasplantar el cultivo.



**Figura 17:** Evaluación de la incidencia y severidad de plantas infestadas con *P. aphanidermatum* a los 25 días después del trasplante.

Se comprobó también en los Testigos que la incidencia de los fitopatógenos y los síntomas asociados tal y como se muestra en la Figura 20, donde se observa la necrosis en la base del tallo y la pudrición de raíz en casi todos los Testigos infestados tanto de manera individual como en la mezcla con ambos fitopatógenos; en dicha Figura se puede notar la falta de raíz y la necrosis asociada en tallo, comparativamente con el tratamiento de la mezcla de *T. harzianum* mas *P. donghuensis* (THZ+B?) donde las plantas inoculadas con este tratamiento no desarrollaron ninguno de estos síntomas, esto en el experimento de la mezcla de los fitopatógenos (Fig. 21).



**Figura 20:** Tratamientos Testigos de “damping off” a los 25 días después del trasplante. a) Testigo infestado con *P. aphanidermatum*, b) Testigo infestado con *F. oxysporum* y c) Testigo infestado con la mezcla de los fitopatógenos.



**Figura 21.** Tratamiento de *T. harzianum* mas *P. donghuensis* (THZ+B?) de plantas infestadas con *P. aphanidermatum* - *F. oxysporum* del experimento a 25 días después del trasplante. Notese la diferencia con respecto la Figura 20 donde los Testigos presentaron pudrición radical y muerte de la plantula.

## CONCLUSIONES

Los fitopatógenos *Pythium aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum* son agentes causales del “damping off” en plántulas de Chile. Se comprobó el antagonismo *in vitro* de algunas cepas de *Bacillus* hacia *F. oxysporum* y una cepa de *P. donghuensis* (B?) en contra de *P. aphanidermatum* al inhibir el crecimiento micelial por antibiosis. En el caso de la cepa de *Trichoderma harzianum* (THZ) está inhibió a *P. aphanidermatum* mediante parasitismo y a *F. oxysporum* mediante antibiosis. Además se demostró la compatibilidad *in vitro* de estos antagonistas, con excepción de *Bacillus subtilis* (BITV) que presentó antagonismo contra *P. donghuensis* (B?) y también para *T. harzianum* (THZ).

Tanto *Pythium* como *Fusarium* presentaron mayor incidencia en la etapa de postemergencia que en preemergencia. Se comprobó que *Pythium* presenta mayor incidencia que *Fusarium* en ambas etapas.

La aplicación de forma individual o en mezclas de microorganismos antagonistas en la producción de plántulas disminuye la incidencia de la enfermedad. Las plántulas tratadas con antagonistas presentan menor incidencia de síntomas de “damping off” a los 25 días después del trasplante.

Es factible realizar combinaciones sinérgicas de *P. donghuensis* y *T. harzianum* con el propósito de ampliar el rango de antagonismo para fitopatógenos y su control mediante el uso de microorganismos beneficiosos.

### Literatura Citada

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5a Ed., Academic Press. 922 pp.
- Abriouel, H., Franz C. M., Omar N. B. & Gálvez A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS microbiology reviews, Vol. 35(1), pp. 201-232.
- <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Aguilar, R. V. H., Corona T. T., López L. P., Latournerie M. L., Ramírez M. M., Villalón M. H., Aguilar C. J. A. (2010). Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, COLPOS, INIFAP, ITConkal, UANL, UAN. México. 114 pp.
- <https://www.researchgate.net/publication/235657255>
- Al-Sheikh, H. (2010). Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. Saudi Journal of Biological Sciences. 17(4): 347-352.
- <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.001>.
- Arbeláez, T. G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana. 17(1-3):11-16.
- <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538>
- Alvarado, G., & Matta, J. (2016). Reporte de la mosca del mantillo Fungus Gnat (*Bradysia* spp) en invernaderos del Valle de Quibor, Estado Lara, Venezuela. Mundo Pecuario. 11(1), pp. 01-05.
- <http://bdigital2.ula.ve:8080/xmlui/654321/1247>
- Álvarez, H. J. C. (2012). Comportamiento agronómico e incidencia de enfermedades en injertos de jitomate en jitomate nativo de México. Acta Agronómica. 61(2), pp. 117- 125.



[https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/22640](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/22640)

Apodaca, S. M. Á., Zavaleta, M. E., García, E. R., Osada, K. S., y Valenzuela, U. J. G. (2002). Frecuencia de Campos Infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su Control. Revista Mexicana de Fitopatología.20 (1):1-7.

<http://www.Reddalyc.org/articulo.oa?id=61220101>

Argumedo, D. R., Alarcon, A., Ferrera, C. R., & Peña, C. J. J. (2009). El Género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental.25(4):257-269.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018849992009000400006&lng=es&tlng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992009000400006&lng=es&tlng=pt).

Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ Microbiol.62(11): 4081-4085.

<https://aem.asm.org/content/aem/62/11/4081.full.pdf>

Avelar, M. J. J., Lara, H. A., Llamas, L. J. J., Luna, F. M. (2010). Enfermedades del chile en Zacatecas. Memorarías del Primer Foro para Productores de Chile 2010. pp.79-90.

[https://www.webconestilo.com/web/chilezac/logros/Memorias\\_1er\\_Foro\\_Chile\\_2010.pdf](https://www.webconestilo.com/web/chilezac/logros/Memorias_1er_Foro_Chile_2010.pdf)

Bautista, C.J., Huerta, L.M., García, E.R., (2014). Antagonistas a *Phytophthora capsici*, inoculados en sustratos de germinación de *Capsicum annum* Leonian y *Mucuna deeringiana* Bort. Avances en Investigación Agropecuaria. 18(2):95-114.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83731110007>

Becerra, J. M., Quintero, D., Martínez, M., & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 5(2): 186-194.

<https://doi.org/10.17584/rcch.2011v5i2.1265>

Bell D, Well, H. and Markham, C. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*.72:379-382.

[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04\\_379.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF)

Berrones, M. M., Garza, U. E., Vázquez, G. E. & Méndez, A. R. (2013). Producción de pimiento morrón en casa-malla para el sur de Tamaulipas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noreste, Campo Experimental Las Huastecas Villa Cuauhtémoc, Tam. Folleto Técnico No. MX-0-310301-11-03-14-09-30.

<http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/942.pdf>

Bruna, A. (1991). Marchitez y pudrición de corona y raíces de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) causado por *Fusarium oxysporum* Schlechtf. sp. asparagi Cohen. *Agricultura Técnica (Chile)*.51: 52-54.

[http://www.chileanjar.cl/files/V5111A08\\_es.pdf](http://www.chileanjar.cl/files/V5111A08_es.pdf)

Cano, M.A., (2011). Interacción de microorganismos benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.14(2): 15–31.

<https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>

<sup>a</sup>Castillo, A. C., Coh, M. D., Carrillo, Á. E. & Monsalvo, E. A. (2015). Producción de planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agroproductividad*. 8(4):73-78.

<https://biblat.unam.mx/hevila/Agroproductividad/2015/vol8/no4/12.pdf>

<sup>b</sup>Castillo, R. F., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Flores, O. A., Rodríguez, H. R., & Aguilar, C. N. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia Solani*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 6(3): 549-562.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200709342015000300009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342015000300009&lng=es&tlng=es)

Castro del Ángel, E. C., Hernández, F. D., Fuentes, Y. M. O., Morales, G. G., Reyes, F. C., & Tucuch F. M. (2017). Endophytic bacteria controlling *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in *Solanum tuberosum*. European Journal of Physical and Agricultural Sciences.5(1):29-39.

<https://www.idpublications.org/wp-content/uploads/2016/12/Full-Paper-endophytic-bacteria-controlling-fusarium-oxysporum-and-rhizoctonia-solani.pdf>

Castro del Ángel, E., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Ochoa, F. Y. M., & Castillo, R. F. (2019). Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, con formulados de bacterias endófitas y su efecto en la promoción de crecimiento en el cultivo de frijol. Revista Bio Ciencias.6:1-13.

<http://dx.doi.org/10.15741/revbio.06.e416>

Carrión, A. R., Criollo, R. G., Rojas, F. M., Rodríguez, A. S., & Torres G. R. (2016). Estudio de la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp., asociados a la marchitez vascular del babaco en Loja-Ecuador. Centro de Biotecnología. 3(1):61-72.

[https://www.researchgate.net/profile/Roldan\\_Torres\\_Gutierrez/publication/279941150](https://www.researchgate.net/profile/Roldan_Torres_Gutierrez/publication/279941150)

Chávez, A. R., Aquino J. A. S. (2014). Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp., con extractos vegetales. Investigación Agraria, [S.I.]: 14, (1): 17-23.

<http://www2.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/242>

Chávez, A. T. K., Guato, M. J. J., Peñafiel, J. F. M., Mestanza, U. A. C., & Canchignia, M. F. H. (2018). Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivares nativos de *Musa* sp. y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S. Ciencia y Tecnología. 11(2): 17-29.

DOI:10.18779/cyt.v11i2.204

Chew, M. Y. I., Vega, A. P., Palomo, R. M., Jimenez, D. F. (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annum* L.). INIFAP, Folleto Técnico Núm. 15. Campo Experimental la Laguna, Matamoros, Coahuila, México.

<https://www.compucampo.com/tecnicos/principalesenfermedades-chile.pdf>

Chirino, V. I., Kandula, D., Littejohn, C., Hill, R., Wlaker, M. Shields, M., Cummings, N., Heittiarachchi, D. y Wratten, S. (2016). Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-services provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. Scientific Reports. 6(1): 1-8.

<https://doi.org/10.1038/srep25109>

Dar, G. H., Mir, G. H., Rashid, H., Dar, W. A., & Majeed, M. (2015). Evaluation of microbial antagonists for the management of wilt/root rot and damping-off diseases in chilli (*Capsicum annum*). Vegetos. 28(4):102-110.

DOI: 10.5958/2229-4473.2015.00091.9

Díaz, CM., Rodríguez, AG., Silva, RHV., Pedraza, SME., Salgado, GR. y Fernández, PSP. (2011). Identificación de especies de *Pythium* aisladas

de plantas ornamentales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.2(3): 431-443.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200709342011000900003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342011000900003&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 2007-0934.

De Granada, E. G., De Amezquita, M. C. O., Mendoza, G. R. B. & Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana. 6(1): 7-2.

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462>

Espinoza, A. C. A., Gallegos, M. G., Ochoa, F. Y. M., Hernández, C. F. D., Méndez, A. R. & Rodríguez G. R. (2019). Antagonistas microbianos para biocontrol de la marchitez y su efecto promotor en el rendimiento de chile serrano. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. (23): 187-197.

DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2020>

Figuroa, C. H. R. y Pavia, SF. (2017). Técnica de evaluación para damping-off en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) infectado por *Pythium aphanidermatum*. Tecnociencia Chihuahua. 11(2): 41-47.

<https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/156>.

Fraire, C. M. D. L., Nieto, A. D., Cárdenas, S. E., Gutiérrez, A. G., Bujanos, M. R., & Vaquera, H. H. (2010). *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología. 28(1): 25-3.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092010000100003&lng=es&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092010000100003&lng=es&lng=es).

Fry, W. E. and Niklaus, J. G. (2010). Introducción a los Oomicetes. Trans. Alberto J. Valencia-Botín. 2012. The Plant Health Instructor.

DOI:10.1094/PHI-I-2012-0220-01

Gajera, H. P. y Vakharia, D. N. (2010). Caracterización molecular y bioquímica de aislados de *Trichoderma* que inhiben un hongo fitopatógeno *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Fisiopatología Fisiológica y Molecular de las Plantas*. 74 (3): 274–282.

DOI: 10.1016 / j.pmpp.2010.04.005

Takegne, E. R., Plasencia, M. O., Hernández, R. A., de La Fe, P. Y., & Martínez, C. B. (2017). Actividad antagónica de *Pseudomonas* spp. *fluorescentes* ante *Alternaria solani* Sorauer, patógeno de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista de Protección Vegetal*.32(3).

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522017000300002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522017000300002&lng=es&tlng=es).

Gao, J., Xie, G., Peng, F. y col. (2015). *Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore. *Antonie van Leeuwenhoek*.107: 83–94.

<https://doi.org/10.1007/s10482-014-0306-1>

Gómez, J. R., Hernández, F. L. M., Cossio, V. L. E., López, A. J. G., y Sánchez, L. R. (2011). Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico Núm. 19, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México.

<https://www.compucampo.com/tecnicos/enfermedadesfungosasbacterianas-tomate-nay.pdf>

Gómez, V. J. M., & Melero, V. J. M. (2011). Patogenia de *Pythium aphanidermatum* y *Pythium* spp. sobre plántulas de pepino: I Influencia del cultivar y del sustrato en la gravedad de la enfermedad. *Bol. San. Veg. Plagas*, 37: 207-223.

[https://digital.csic.es/bitstream/10261/84091/4/patogenia\\_pythium\\_I\\_Gomez.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/84091/4/patogenia_pythium_I_Gomez.pdf)

Gravel, V., Martinez, C., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2005). Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. *BioControl*. 50(5): 771-786.

<https://doi.org/10.1007/s10526-005-1312-z>

Grijalba, P. E. y Ridao A. D. C. (2017). Control químico de *Pythium* spp. en plántulas de soja. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 43(1): 67-71.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86451165010>

Grijalba, P. E., Zapata, R. L., Palmucci, H. E., y Baron, C. (2015). Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 50(1): 11-15.

DOI: <http://dx.doi.org/10.31055/1851.2372.v50.n1.10843>.

Guerra, G. A., Betancourth, C. A., & Salazar, C. E. (2011). Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a *Fusarium oxysporum* fsp. pisi Schtdl en arveja (*Pisum sativum* L.). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*?14(2):33-42.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012342262011000200004&lng=en&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012342262011000200004&lng=en&tlng=pt)

Guerrero, A. R. (2010). Producción de plántula de chile (*Capsicum annuum*) en invernadero. *Memoriarías del Primer Foro para Productores de Chile 2010*, pp. 71- 78.

[https://www.webconestilo.com/web/chilezac/logros/Memorias\\_1er\\_Foro\\_Chile\\_2010.pdf](https://www.webconestilo.com/web/chilezac/logros/Memorias_1er_Foro_Chile_2010.pdf)

Guillén, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E., & Reyes, V. M. H. (2006). *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y

rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 24(2):105-114.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224204>

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2(1): 43–56.

DOI: 10.1038/nrmicro797

Heffer, L. V., Polwelson, L. M., Johnson, B. K. (2012). Oomycetes. The Plant Health Instructor.

DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0225-01.

Hernández, H., E. J., Hernández, R. I., Almaraz, S. J. J., López, L. A., Torres, A. M., & Morales, F. F. J. (2018). Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9 (3): 525- 537.

<http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i3.335>

Higuera, M. D. 2008. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. Investigación aplicada y Desarrollo. Orius Biotecnología Villavicencio, Colombia.

<https://portalcamaronero.com/wpcontent/uploads/2016/10/Losmicroorganismosdel-suelo-en-la-nutrici%C3%B3n-vegetal.pdf>

Jaramillo, M. P., Sepúlveda, E. S., Rosero, N. C., Pinargote, C. B., Prieto, H., & Martínez, H. F. C. (2016). Activación de resistencia sistémica inducida en vid “Thompson Seedless”, en respuesta *Pseudomonas veronii* R4. Revista Ciencia y Tecnología. 9(1):1-9.

DOI: <https://doi.org/10.18779/cyt.v9i1.161>

Khalaf, A., Emad, I. H., Khalid, M. A. B., Mahmoud, A. K., Wesam, A. K., Jacob, H. J., Mohamad, A. S., Asharaf, K. and Mohamed, I. H. (2011).



Identification and Controlling *Pythium* sp. Infecting Tomato Seedlings Cultivated in Jordan Valley using Garlic Extract" Khalaf Alhussaen, "Emad I. Hussein, "Khalid M. Al-Batayneh," Mahmoud Al-Khatib. Asian Journal of Plant Pathology. 5(2): 84-92.

DOI: 10.3923/ajppaj.2011.84.92

Kerkeni, A., Daami, R. M., Tarchoum, N., y Ben, K. M. (2007). *In vitro* and *in vivo* suppression of *Pythium ultimum* the causal agent of the Cucumber Damping-off by some compost fungi. Asian Journal of Agricultural Research.1 (2).50-58.

DOI: 10.3923 / ajar.2007.50.58

Kipngeno, P., Losenge, T., Maina, N., Kahangi, E., & Juma, P. (2015). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. Biological Control.90: 92-95.

DOI: 10.1016/j.biocontrol.2015.05.017

Larios, E. J. L., Nava, J. D. J. W. V., Cupul, W. C., López, F. A. G., Sánchez, G. M., & Nava, M. T. B. (2019). Biocontrol de Damping off y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq) con *Trichoderma* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.10(3): 471-483.

<http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v10i3.332>

Latha, P., Anand, T., Prakasam, V., Jonathan, E. I., Paramathma M., y Samiyappan R. (2011). Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma* strains with orgenic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. Applied Soil Ecology. 49: 215–223.

DOI: 10.1016 / j.apsoil.2011.05.003

Latournerie, L., Chávez, J. L., Pérez, M., Hernández, C. F., Martínez, R., Arias, L. M., & Castañon, G. (2001). Exploración de la diversidad morfológica de

chiles regionales en Yaxcaba, Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana*.12(1): 41-48.

<http://dx.doi.org/10.15517/rac.v43i1.35649>

Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Ramírez, L. C. C. y Leal, L. C. S. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*.9 (16):177-187.

<https://doi.org/10.22490/24629448.501>

Leiva, M. M., Bernal, C. A., Alvarado, C. Y., Portal, G. N., Acosta, S. M., Cruz, M. M., Sánchez, C., Morales, B. R. (2009). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de microorganismos biocontroladores frente a *Pythium derbayanum* Heese. *Centro Agrícola*. 36 (2): 53- 56.

[http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V36Numero\\_2/cag092091672.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V36Numero_2/cag092091672.pdf)

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* burkinafaso. Laboratory manual. Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa. Pp. 212- 218.

López, L. P. y Montes H. S. (2006). Situación actual y perspectivas de los recursos genéticos y la producción de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot., Solanaceae) en México. Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Celaya, Gto. México. Pp 466. Libro Científico Núm. 1.

<https://www.researchgate.net/publication/283491883>

Martínez B., Infante D., & Peteira B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el Género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*. 30: 11-22.

<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>

Martínez, G. M., Hernández, D. S., Padilla, R. J. S. & Mayek, P. N. (2004). Diversidad Patogénica y Genética de Aislamientos de *Fusarium* de

Aguascalientes, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 22 (3): 321-327.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61222301>

<sup>a</sup>Martínez, H. F. C., Rosero, N. C., Álvarez, A. E. B., Morante, C. J., Malagón, G. C., & Jaramillo, M. P. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del Género *Pseudomonas* spp., como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. Revista Ciencia y Tecnología. 8(1): 25-30.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5319281>

<sup>b</sup>Martínez, V. K. J., Ceceña, D. C., González, M. D. & Grimaldo, J. O. (2015). Control de la Marchitez *Fusarium oxisporum* f. sp. medicaginis en Alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el Valle de Mexicali, Baja California. OmniaScience, pp. 1-22.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.275>

Mejía, B. M. Á., Reyes, R. A., Cristóbal, A. J., Tun, S. J. M., del Carmen, B. G. L. & Pacheco, A. J. R. (2016). *Bacillus* spp. in the Control of Wilt Caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología. 34(3): 208-222.

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163318699>

Montes, H. S., Ramírez, M. M., Villalón, M. H., Medina, M. T., Morales, C. A., Heredia, G. E., y Martínez, T. H. L. (2006). Conservación y aprovechamiento sostenible de chile silvestre (*Capsicum* spp. Solanaceae) en México. Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. INIFAP-CIR-CENTRO. Celaya, Guanajuato, México. pp. 71-134.

Moreno, R. A., Carda, M. V., Reyes, C. J. L., Vásquez, A. J. & Cano, R. P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de

biofertilización para la agricultura sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología. 20(1): 68-83.

<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>

Nasner, G. & Yasman, K. (2014). Control de “damping off” en arveja (*Pisum sativum*.), utilizando *Trichoderma harzianum*, Fosfito Potásico, CaCO<sub>3</sub> y Proganic Mega. Repositorio del Centro de Investigación, Transferencia Tecnológica y Emprendimiento (CITTE), Artículo Investigación Código: (CI-01-2011).

<http://repositorio.upec.edu.ec/handle/123456789/24>

Palmucci, H. E., Wolcan, S. M. & Grijalba, P. E. (2011). Status of the Pythiaceae (Straminipila) in Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 46 (3-4): 197-211.

<http://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/3993>

Patiño, T. C. & Sánchez, de P. M. (2014). Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento del ají (*Capsicum annum* L.). Acta Agronómica. 63(2):136-144.

<https://dx.doi.org/10.15446/acag.v63n2.36956>

Peralta, D., Mena, J. P. & Grefa, V. (2017). Caracterización del cultivo de tomate (*solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annum*) bajo condiciones controladas Review.

<https://www.researchgate.net/publication/319162681>

Perdomo, M., Peña, J., Guédez, C., Castillo, C. & Cánsales, L. (2007). *Trichoderma harzianum* in the control of “Sancocho” disease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). ACADEMIA. 6(12): 52-61.

<https://pdfs.semanticscholar.org/d5da/c48ef0cf70a6188bb9a6139f6f41a49e9e36.pdf>

<sup>a</sup>Pérez, Á. S., Coto, A. O., Echemendía, P. M. & Ávila, Q. G. (2015). *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?. Revista de Protección Vegetal. 30(3), 225-234.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522015000300008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522015000300008&lng=es&tlng=es)

<sup>b</sup>Pérez, C. L. M., Castañón, N. G., Ramírez, M. M. & Mayek, P. N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.2(4): 117-128.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200790282015000100009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200790282015000100009&lng=es&tlng=es)

Ramiro, C. A. (2003). El cultivo de chile serrano en la zona media de San Luis Potosí. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Palma de la Cruz, San Luis Potosí, México. Folleto Técnico Núm. 37.

<http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/125.pdf>

Retana, K., Ramírez, C. J. A., Castro, O. & Blanco, M. M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costarricense.42(1):115-126.

DOI 10.15517/RAC.V42I1.32199

<sup>a</sup>Reveles, H. M., Velásquez, V. R., Huchín, A. S., Velásquez, V. M. A. (2010). Producción de plántulas de chile en almácigos. Memorarías del Primer Foro para Productores de Chile 2010, pp. 56-70.

[https://www.webconestilo.com/web/chilezac/logros/Memorias\\_1er\\_Foro\\_Chile\\_2010.pdf](https://www.webconestilo.com/web/chilezac/logros/Memorias_1er_Foro_Chile_2010.pdf)

<sup>b</sup>Reveles, H. M., Velásquez, V. R., Trejo, H. A. S. C., Ruíz, T. J. (2010). Producción de plántula de chile en invernadero. Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valle del Guadiana. Folleto Técnico Núm. 41. CIRNOC- INIFAP, p. 40.

<http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/prcChileInv.pdf>

Reynoso, M. M., Figueroa, G. R. M., Castro, Z. C. E., González, C. B., Reyes, V. W. P. (2005). Estudio de las poblaciones de *Fusarium* (sección Liseola) aisladas de híbridos de maíz cultivados en parcelas experimentales del CUCBA. Características ecofisiológicas y genéticas. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA, pp. 669-673.

[http://www.floradejalisco.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances\\_2005/Veterinaria/ReynosoMariaMarta/ReynosoMariaMarta.pdf](http://www.floradejalisco.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances_2005/Veterinaria/ReynosoMariaMarta/ReynosoMariaMarta.pdf)

Rios, V. C, Cisneros, C. C., Berlanga, R. D., Ruíz, C. M. F., Ornelas, P. J., Salas, M. M., Villalobos, P. E. y Guerrero, P. V. (2016). Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp., isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología. 34: 84-99.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1507-1

Rivera, J. M. N., Zavaleta, M. H. A., Rebollar, A. A., Aguilar, R. V. H., García, S. G., Vaquera, H. H. & Silva, R. H. V. (2018). Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano'pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. Mycological Progress. 17(11):1237-1249.

<https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>

Robledo, D'Angelo O. (2016). Enfermedad de damping-off en plántulas de lechuga: un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias, 13 (3): 680-685.

<http://hdl.handle.net/10498/18505>

SAGARPA. (2015). El chile, de México para el mundo.

<https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/el-chile-de-mexico-para-el-mundo>

SAGARPA. (2016). Producción nacional de chile alcanza 2.3 millones de toneladas.

<https://www.gob.mx/agricultura/prensa/produccion-nacional-de-chile-alcanza-2-3-millones-de-toneladas>

SAGARPA. (2017). Plan agrícola nacional 2017- 2030. Chiles y Pimientos mexicanos.

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/PotencialChiles\\_y\\_Pimientos-parte\\_uno.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/PotencialChiles_y_Pimientos-parte_uno.pdf)

Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G. E., Sosa, M. C. (2015) Biocontrol with *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* causal of "damping off" in pre and post emergence in onion. Rev. Fac. Agro.114 (1):61-70.

<http://rdi.uncoma.edu.ar/bitstream/handle/123456789/15563/Biocontrol%20Fusarium%202015%20FCAYF.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sánchez, M. Á. A., Mejía, E. Z., Kawasoe, S. O., Espinosa, R. G. y Ureta, J. G. V. (2004). Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 22(1):22-29.

<https://www.redalyc.org/pdf/612/61222104.pdf>.

Sandoval, I. & López, M. O. (2001). Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii*, sobre diferentes hongos fitopatógenos. Fitosanidad. 5(1): 41-44.

<http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/905/760>

Sharma, S., Kaur, M. & Prashad, D. (2014). Isolation of fluorescent *Pseudomonas* strain from temperate zone of Himachal Pradesh and their evaluation as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). The Bioscan. 9(1): 323-328.

[http://thebioscan.in/Journal%20Supplement/91Sup17%20SHWETA%20S HARMA\\_3012.pdf](http://thebioscan.in/Journal%20Supplement/91Sup17%20SHWETA%20S HARMA_3012.pdf)

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.

<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Sivasakthi, S., Usharani, G. & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. African Journal of Agricultural Research. 9(16): 1265-1277.

DOI: 10.5897/AJAR2013.7914

Tejera, H. B., Rojas, B. M. M. & Heydrich, P. M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 42(3): 131-138.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1812/181222321004>

Torres, Ó. G. V. (2016). Importancia de los Fosfatos y Fosfitos en la nutrición de cultivos. Acta Agrícola y Pecuaria. 2(3): 55-61.

<http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/57>

Tsuneo, W. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRC Press\_Taylor & Francis, Group Boca Raton London New York. pp. 26-68.

Valdés, R.O.A., García, E.R., Sánchez, S.O. y Pérez, V. A. (2011). Aislamiento y patogenicidad de un posible *Pythium aphanidermatum* en *Jatropha curcas* L. no tóxica. Tropical and subtropical agroecosystems. 14(2): 649-660.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-04622011000200022](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200022)



Valverde, C., & Ferraris, G. (2009). Las *Pseudomonas*: un grupo heterogéneo con diversos mecanismos promotores del desarrollo vegetal. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz, pp. 22-43.

[https://inta.gob.ar/sites/default/files/scripttmpinta\\_microorganismos\\_trigo\\_maiz.pdf#page=22](https://inta.gob.ar/sites/default/files/scripttmpinta_microorganismos_trigo_maiz.pdf#page=22)

Van der Plaats-Niterink A. J. 1981. Monograph of the Genus *Pythium*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 21.

[file:///C:/Users/Asus/Documents/proyecto/van%20der%20Plaats%20Niterink,%20AJ%20\(1981\).%20Monografía%20del%20género%20Pythium%20Vol.%2021.%20Baarn.html](file:///C:/Users/Asus/Documents/proyecto/van%20der%20Plaats%20Niterink,%20AJ%20(1981).%20Monografía%20del%20género%20Pythium%20Vol.%2021.%20Baarn.html)

Van West P., Appiah, A. A. y Gow, N. A. R. (2003). Avances en la investigación sobre patógenos de raíz de oomiceto. Fisiopatología fisiológica y molecular de las plantas. 62(2): 99-113.

DOI: 10.1016 / s0885-5765 (03) 00044-4

Vargas, B. P. & Castro, B. L. (2019). Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de Andisoles de Costa Rica. Agronomía Costarricense. 43(1):47-68.

<http://dx.doi.org/10.15517/rac.v43i1.35649>

Velásquez, V. R., Amador, R. M. D., Medina, A. M. M. & Lara, V. F. (2007). Presencia de Patógenos en Almácigos y Semilla de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 25(1):75-79.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092007000100010&lng=es&tlng=](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100010&lng=es&tlng=)

Velásquez, V. R., Reveles, H. M. y Reveles, T. L.R. (2014). Manejo de enfermedades de los almacigos tradicionales de Chile, para secado en Zacatecas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatecas. Folleto Técnico. Núm 54. CIRNOC –INIFAP, 28 pp.

<http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/manejoEAlmacigosChile.pdf>

Villa, M. A., Pérez L. R., Morales M. H. A., Basurto S. M., Soto P. J. M., & Martínez E. E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*.64(2): 194-205.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

Villa, P. M., Frías, A. & González, G. (2005). Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp., para el control de hongos fitopatógenos, que afectan cultivos de interés económico. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba (ICIDCA). 39(3):40-44.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2231/223120688007>

Villanueva, D. M. L. (2018). Eficacia de biofungicidas frente a la caída de plántula de pepino, inducida por *Pythium aphanidermatum*. *Revista de Investigación en Agroproducción Sustentable*.2(1): 72-78.

DOI:10.25127/aps.201801.257

Villarreal, D. M. F., Villa, R. E. D., Cira, C. L. A., Estrada, A. M. I., Parra, C. F. I. & Santos, V. S. D. L. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36(1): 95-130.

<http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Wolcan, S. M., Lori, G. A., Ronco, L. M. A. F. & Fernández, R. (2001). Enanismo y podredumbre basal de *Eustoma grandiflorum* y su relación con la densidad de *Fusarium solani* en el suelo. *Fitopatología Brasileira*.26(4):710-714.

<https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000400003>

Zapata, R. L., Palmucci, H. E., Murray, V. B. & López, V. (2001). Ensayos para el control biológico del mal de los almácigos en berenjena con *Pseudomonas fluorescences* y *Trichoderma harzianum*. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires*.21(3): 207-211.

<http://ri.agro.uba.ar/files/download/revista/facultadagronomia/2001zapatarl.pdf>

## ANEXOS

**Tabla 5:** Porcentaje de incidencia de “damping off” en preemergencia y postemergencia de plántulas de chiles infestadas con *P. aphanidermatum* en invernadero.

Tratamientos	Medias	
	Preemergencia	Postemergencia
B?+THZ	34.17 a	20.26 b
THZ	32.50 a	35.83 a
Testigo	28.33 b	39.53 a
B?	27.50 b	19.53 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (Duncan  $p > 0.05$ ).

**Tabla 3:** Porcentaje de incidencia de “damping off” en preemergencia y postemergencia de plántulas en charolas infestadas con *F. oxysporum* en invernadero.

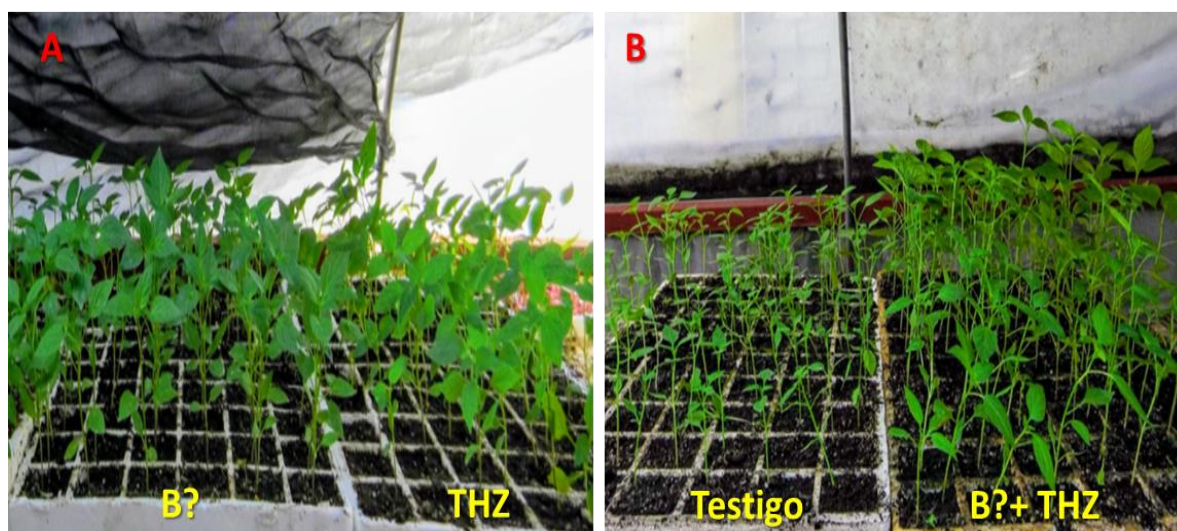
Tratamientos	Medias	
	Preemergencia	Postemergencia
Testigo	23.33 a	34.78 a
THZ	20.00 a	29.17 b
BITV	18.33 a	20.41 c

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (Duncan  $p > 0.05$ ).

**Tabla 7:** Porcentaje de incidencia de “damping off” en preemergencia y postemergencia de plántulas en charolas infestadas con la Mezcla de los fitopatógenos en invernadero.

Tratamientos	Medias	
	Preemergencia	Postemergencia
Testigo-	25.00 a	37.78 a
THZ	21.67 b	24.47 b
THZ+B?	19.17 c	14.44 c

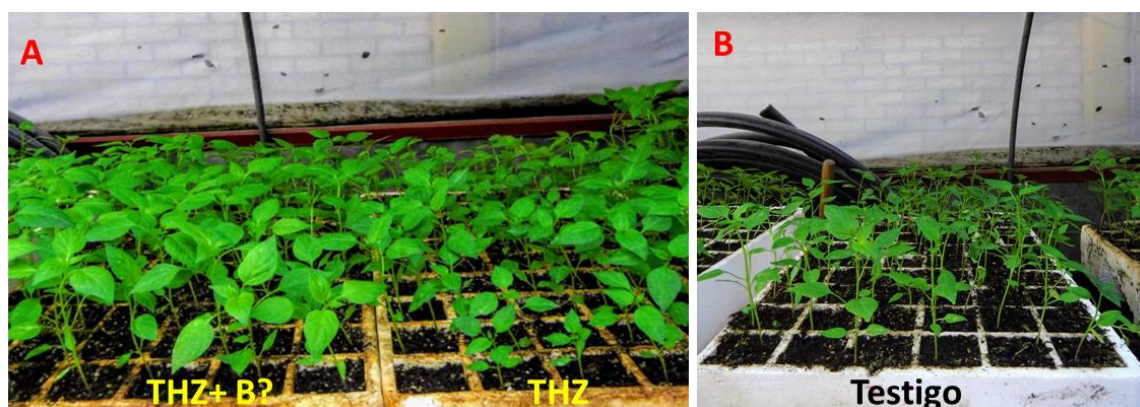
Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (Duncan  $p > 0.05$ ).



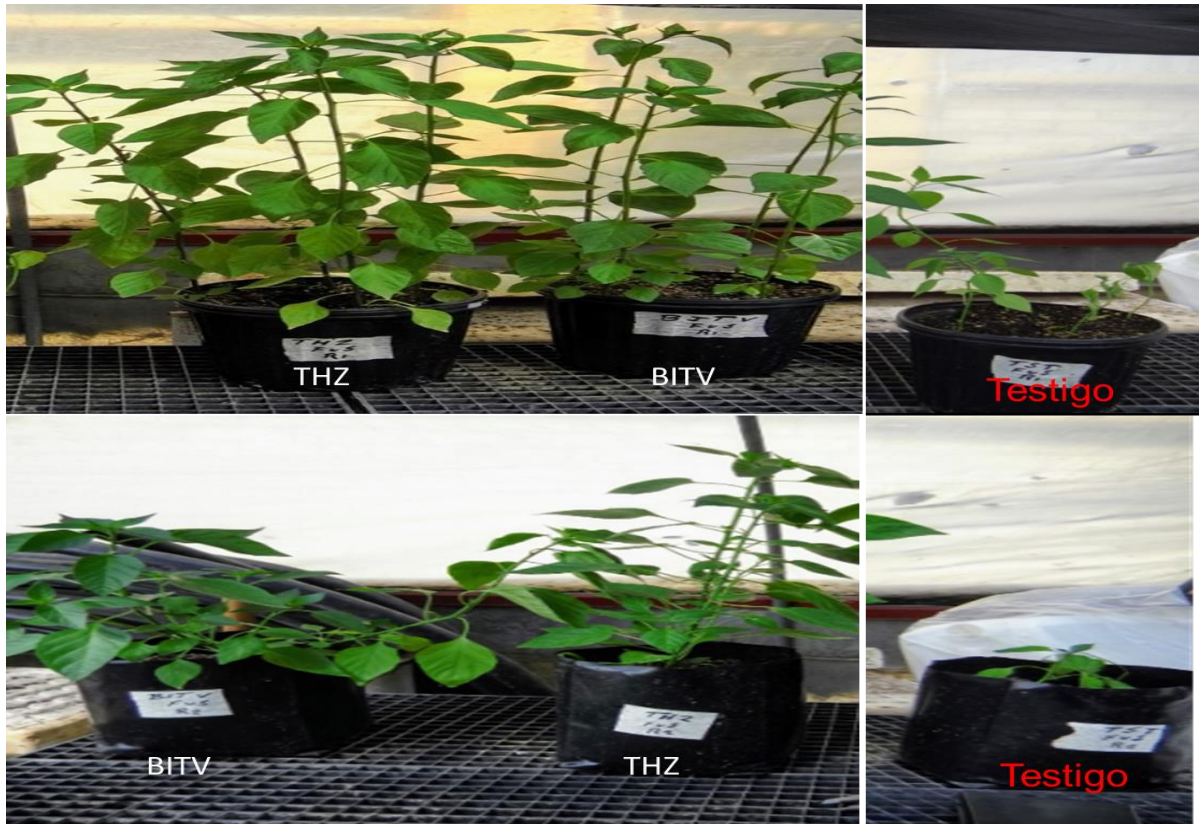
**Figura 13:** Evaluación de la incidencia del “dampin off” causado por *Pythium aphanidermatum*, a los 42 días después de la germinación. A) Diferencia del desarrollo entre los tratamientos B? y THZ. B) Diferencia en el desarrollo del tratamiento B?+ THZ y el Testigo. Notese que el tratamiento Testigo fue el que presentó un menor desarrollo y mayor mortalidad de plántulas, en comparación con los demás tratamientos.



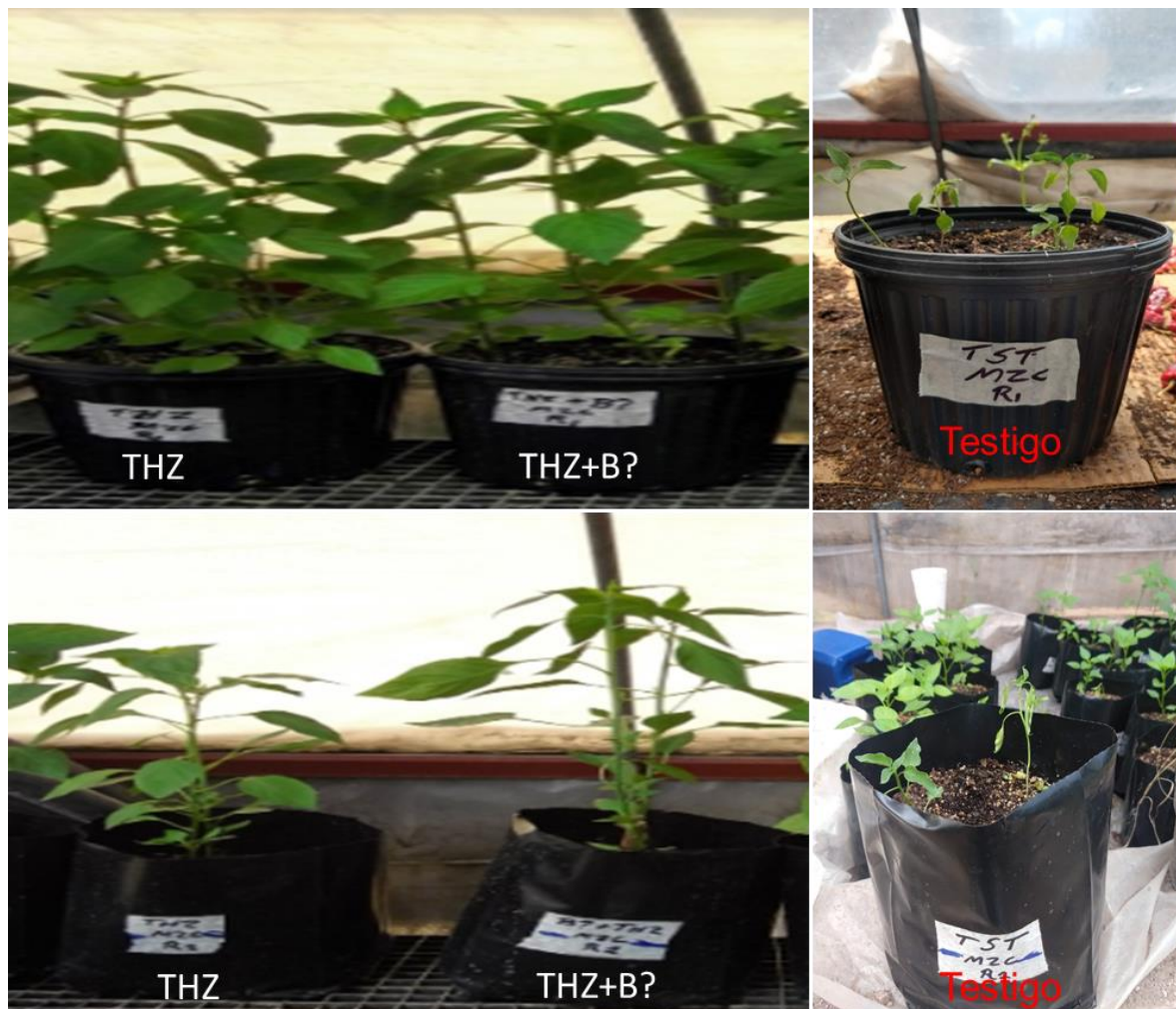
**Figura 14:** Evaluación de la incidencia del “dampin off” causado por *Fusarium oxysporum*, a los 42 días después de la germinación. A) Diferencia del desarrollo entre los tratamientos THZ y BITV. B) Tratamiento Testigo. Notese que el tratamiento Testigo fue el que presentó un menor desarrollo y mayor mortalidad de plántulas, en comparación con los tratamientos THZ y BITV, siendo este último la menor mortalidad.



**Figura 15:** Evaluación de la incidencia del “dampin off” causado por la mezcla de *Pythium aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum*, a los 42 días después de la germinación. A) Diferencia del desarrollo entre los tratamientos THZ+ B? y THZ. B) Tratamiento Testigo. Notese que el tratamiento Testigo fue el que presentó un menor desarrollo y mayor mortalidad de plántulas, en comparación con los tratamientos THZ+ B? y THZ, siendo el tratamiento THZ+ B? el de mayor desarrollo y menor mortalidad.



**Figura 18:** Evaluación de la incidencia y severidad de plántulas infestadas con *F. oxysporum* y tratadas con *Bacillus subtilis* (BITV) y *T. harzianum* (THZ) a los 25 días después del trasplante.



**Figura 19:** Evaluación de la incidencia y severidad de plántulas infestadas con *F. oxysporum* y *P. aphanidermtum* y tratadas con *T. harzianum* (THZ) y *P. donghuensis* (B?) a los 25 días después del trasplante.