



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia.



**El uso de *Trichoderma harzianum*, biochar y  
nanotubos de carbono como alternativas  
para el control de *Phytophthora capsici* en  
plantas de chile (*Capsicum annuum*)**

**TESIS**

Que para obtener el título de Licenciada en Ciencias Ambientales

P R E S E N T A

**Clara Migoya Bulnes**

Director de tesis: Dr. Carlos E. González Esquivel.

Co-tutora: Dra. Sylvia P. Fernández Pavía.

**Morelia, Michoacán., diciembre de 2015.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
SECRETARÍA GENERAL  
SERVICIOS ESCOLARES

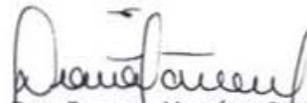
**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UNAM**  
**PRESENTE.**

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la sesión ordinaria 05 del H. Consejo Técnico de la ENES Unidad Morelia celebrada, el día 29 de abril del 2015, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el Examen Profesional de la alumna **CLARA MIGOYA BULNES** con número de cuenta **412115495**, con el trabajo profesional titulado: "**El uso de *Trichoderma harzianum*, biochar y nanotubos de carbono como alternativas para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de chile (*Capsicum annuum*)**" bajo la dirección del Tutor.- **Dr. Carlos González Esquivel.**

Presidente: Dr. John Larsen  
Vocal: Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno  
Secretario: Dr. Carlos González Esquivel  
Suplente: Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía  
Suplente: Dr. Pablo Fabián Jaramillo López

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Morelia, Michoacán a, 04 de mayo del 2015.

  
**DRA. TAMARA MARTÍNEZ RUIZ**  
**SECRETARÍA GENERAL**

**CAMPUS MORELIA**

Apartado Postal 27-3 (Santa Ma. De Guído). 58090, Morelia, Michoacán  
Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta  
58190, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443)322.38.05 y (55)56.23.28.05  
[www.enesmorelia.unam.mx](http://www.enesmorelia.unam.mx)

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la UNAM y a toda la gente de este país que con o sin saberlo nos brindan a tantísimos mexicanos la posibilidad de tener una educación universitaria pública y de calidad.

A las y los profesores de mi carrera que se esmeraron en ver crecer a la licenciatura en Ciencias Ambientales y han buscado enriquecerla desde sus orígenes. Su calidad como investigadores y personas hizo de esta carrera una gran experiencia. A todos los profesores que con pequeñas o medianas contribuciones me hicieron mejorar este trabajo. Un agradecimiento especial a Pacho, por ayudarme a desentrañar los retos estadísticos de esta tesis.

Al proyecto “Desarrollo de Procesos Nano y Micro Biotecnológicos para Elaborar Inoculantes Asepticos Enriquecidos con Promotores del Crecimiento Vegetal” con clave 198839 de PROINNOVA-CONACYT del cual fui beneficiaria.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Carlos, mi tutor. A John, Sylvia, Villegas y Pablo, por nutrir este trabajo con sus comentarios y tener siempre buena disposición y atención a las dudas que pudieran surgir. A Sylvia en específico por buscar enriquecer mi aprendizaje e invitarme a formar parte de sus salidas de campo, integrarme con gente de su laboratorio y procurar clases especializadas.

Al laboratorio de Agroecología y todos sus integrantes, que hacen de un espacio de trabajo también un lugar ameno y agradable. Un agradecimiento especial a tod@s aquell@s que me apoyaron además con observaciones, métodos y trabajo de cosecha; Netza, David, Omar, José Manuel, Ceci, Paloma, Brenda, Donovan, Dante, Marce.



A mi mamá, porque con o sin saberlo me ha enseñado tanto del amor, la comprensión y el crecimiento personal. Por brillar con tanta fuerza que su luz me acompaña a todos lados, y me recuerda las bendiciones con las que camino. Por compartirme a Dios sin nombrarlo.

A mi papá, que se esmera con cariño en verme crecer y superarme. Porque me ha enseñado a disfrutar de los placeres discretos de la vida, de generar equilibrios, de buscar aventuras. Por los diálogos sabrosos que generamos y los caminos andados y por andar.

A David y a nuestros años compartidos. Por ayudarme a lo largo de esta tesis. Por la intensidad disfrutada, los comentarios críticos y el sano escepticismo, por nuestras mañanas y el amor que nos hemos regalado día a día.

A mis compañer@s de generación, por las risas, las discrepancias, las críticas, las fiestas. A todas las hermosas personas que formaron parte de esta etapa tan importante en mi vida. A Aurora y Geli, por la hermosa familia que alguna vez formamos, el hogar que construimos y condimentamos, los proyectos que soñamos.

A l@s amig@s que realmente nunca estuvieron tan lejos. Sobre todo a Lucha, Wera, Evi, Ruy, que muchas veces me hicieron brincar los malos ratos con todo y los km por en medio. Su amor nunca ha dejado de acompañarme.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La problemática alrededor del control agroquímico de plagas y enfermedades .....	1
1.2. Prácticas agroecológicas: La diversidad como promotor de estabilidad .....	2
1.2.1. Control biológico con microorganismos.....	3
1.2.1.1. <i>Trichoderma harzianum</i> como antagonico de <i>P. capsici</i> .....	4
1.3. Las estructuras de carbono como promotores del crecimiento y vehículo de inoculación.....	5
1.3.1. Biochar .....	6
1.3.2. Nanotubos de carbono (NTC).....	7
1.4. La producción de chile en México .....	9
1.5. <i>Phytophthora capsici</i> .....	10
1.5.1. La enfermedad de marchitez en las plantas de chile .....	11
1.6. La producción de chile en el valle de Queréndaro .....	11
1.7. Justificación .....	13
2. PREGUNTAS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3.1. Diseño experimental .....	15
3.2. Biochar .....	16
3.3. Nanotubos de carbono.....	16
3.4. Control biológico con <i>Trichoderma harzarium</i> .....	17
3.5. Inóculo de <i>Phytophthora capsici</i> .....	17
3.6. Protocolo .....	17
3.6.1. Medición de la respuesta vegetal del chile.....	19
3.6.2. Severidad de daños por <i>P. capsici</i> .....	19
3.6.3. Desempeño vegetal.....	20
3.6.4. Análisis de datos.....	21
4. RESULTADOS .....	22
4.1. Daños ocasionados por <i>P. capsici</i> .....	22
4.2. Desempeño vegetal.....	25
5. DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES.....	35

7.	REFLEXIONES FINALES Y RECOMENDACIONES .....	36
8.	REFERENCIAS .....	37
9.	ANEXOS.....	45
9.1.	Anexo 1. Medio de cultivo selectivo para <i>Phytophthora sp.</i> .....	45
9.2.	Anexo 2. Bioensayo para la detección de <i>P. capsici</i> en suelo .....	45
9.3.	Anexo 3. Medio de cultivo V8.....	45
9.4.	Anexo 4. Medición de la capacidad de campo de un sustrato.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos aplicados en las plantas de chile para evaluar *T. harzianum*, nanotubos de carbono (NTC), y biochar como agentes de control sobre *P. capsici*. Tratamientos con 6 réplicas cada uno (108 ue).

**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. Dosis de nutrientes aplicados a las plantas de chile el día de trasplante y a las 4 y 6 semanas de iniciado el experimento ..... 19

Tabla 3. Índice de severidad de síntomas (ISS) para monitorear el desarrollo de la enfermedad provocada por *P. capsici* en las plantas de chile. .... 23

Tabla 4. Promedio del porcentaje de infección de raíz en las plantas muertas por *P. capsici* (n de cada tratamiento depende del número de individuos muertos. *T. harzianum*; 1, Biochar; 3, NTC; 2, *Trichoderma*-biochar; 5, Control; 2). ..... 25

Tabla 5. *n* poblacional de los tratamientos al momento de cosecha debido a los individuos muertos por marchitez (n original de 6 individuos). ..... 22

Tabla 6. Valores de *P*, respecto al desempeño vegetal y los daños por *P. capsici*, para las variables explicativas ..... 26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Progresión de la enfermedad causada por *P. capsici* de acuerdo al porcentaje de individuos afectados por tratamiento a lo largo del tiempo. (Todos los tratamientos presentes pertenecen al bloque inoculado con la cepa CH-11). ..... 25

Figura 2. AUDPS (Área Bajo la Escalera de Progreso de la Enfermedad) promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de LSD). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, C= control (AUDPS= 144, equivalente al 100% del área bajo la curva). ..... 26

Figura 3. Alturas promedio en centímetros por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, T-B= *T. harzianum*-biochar, T-NTC= *T. harzianum*-nanotubos de carbono, C= control. .... 27

Figura 4. Longitud promedio de la raíz, en centímetros, por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, T-B= *T. harzianum*-biochar, T-NTC= *T. harzianum*-nanotubos de carbono, C= control. .... 28

Figura 5. Biomasa promedio de la raíz, en gramos, por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, T-B= *T. harzianum*-biochar, T-NTC= *T. harzianum*-nanotubos de carbono, C=control. .... 28

Figura 6. Biomasa aérea promedio, en gramos, por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, T-B= *T. harzianum*-biochar, T-NTC= *T. harzianum*-nanotubos de carbono, C= control. .... 29

## RESUMEN

La enfermedad de marchitez del chile (*Capsicum annum*) es causada por el oomicete *Phytophthora capsici* y es la enfermedad más devastadora para este cultivo. Las pérdidas de producto por esta enfermedad representan grandes perjuicios a los productores y sus familias, y el control del patógeno se ha vuelto cada vez más difícil debido a que varias cepas han desarrollado resistencia a formulaciones químicas. El desarrollo de alternativas de control de *P. capsici* es de suma importancia para procurar el bienestar de los agricultores y la salud ambiental.

Con fines de explorar nuevas alternativas de manejo, se evaluó el efecto de un agente de control biológico (*Trichoderma harzianum*), dos estructuras de carbono (biochar y nanotubos de carbono) y sus interacciones, para el control de la enfermedad provocada por *P. capsici*. Se usaron 2 inóculos de *P. capsici* (nativo del valle de Queréndaro, Mich. y cepa CH-11, aislada previamente de chile y mantenida en un cepario). Los agentes de control se aplicaron desde la charola de germinación ( $1 \times 10^6$  esporas por g de *T. harzianum*, 30% v/v de biochar y 20  $\mu\text{g}$  de nanotubos de carbono (NTC) con 6 réplicas por tratamiento. Las plantas fueron trasplantadas e inoculadas con 10,000 zoosporas de *P. capsici* por planta y fueron cosechadas a los 4 meses de experimento. Se tomaron medidas de desempeño vegetal y daños por *P. capsici*: biomasa aérea y radicular, altura y longitud de raíz, índice de severidad de la enfermedad, Área Bajo la Escalera de Progreso de la Enfermedad (AUDPS) y porcentaje de infección de la raíz. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza de tres vías ( $\alpha=0.05$ ) y la comparación de medias se hizo a través de la prueba de Tukey.

Se observó un efecto significativo entre el tipo de inóculo y su interacción con las estructuras de carbono en todas las variables de desempeño vegetal y el AUDPS. Los tratamientos con inóculo nativo no mostraron síntomas de enfermedad mientras que la cepa CH-11 tuvo un impacto inmediato en la morbilidad y mortandad de las plantas. Las estructuras de carbono tuvieron un desempeño sumamente diferenciado entre sí al estar en interacción con *T. harzianum* y en presencia del patógeno: *T. harzianum*-biochar (con cepa CH-11) fue el tratamiento más afectado (inclusive por arriba del control) mientras que el tratamiento *T. harzianum*-NTC (con cepa CH-11) fue el más exitoso, sin que ninguna de las plantas mostrara

síntoma de marchitez ni infección de las raíces por *P. capsici*. Ningún agente mostró un desempeño superior a otro en los tratamientos control.

A pesar del indiscutible éxito de la interacción *T. harzianum*-NTC sobre el control de la marchitez, la controversia acerca de la toxicidad de los nanotubos de carbono nos llevarían a sugerir que este método de control sea más estudiado antes de ser aplicado en campo.

## **ABSTRACT**

The damping-off on chili plants (*Capsicum annum*) caused by the oomycete *Phytophthora capsici* is the most devastating disease in the production of this crop. The product losses bring great prejudices to the agricultures and their families, and the control of this pathogen has become increasingly difficult because of the genetic resistance that some strains have developed to chemical pesticides. It is imperative that new management strategies for the control of this pathogen are developed to procure human and environmental health.

The effect of a biological control agent (*Trichoderma harzianum*), two carbon structures (biochar and carbon nanotubes (CNT)) and their interactions, were evaluated in the control of the damping-off induced by *P. capsici*. Two inoculum of *P. capsici* were used (one native from Querendaro, Mich. and CH-11 strain, that was previously isolated and kept in a laboratory). The control agents were applied since the chili seedbed was plowed ( $1 \times 10^6$  spores per g of *T. harzianum*, 30% v/v of biochar and 20  $\mu\text{g}$  of CNT) with 6 replicates per treatment. The chili plants were transplanted and inoculated with  $10^7$  zoospores of *P. capsici* per plant, and all were processed for measuring at the 4<sup>th</sup> month of the experiment. Measures of plant performance and damage by *P. capsici* were taken: above-ground biomass, radicular biomass, height and root length, Area Under Disease Progress Stairs (AUDPS), and percentage of root infection by *P. capsici*. The results were evaluated through a three-way multivariate analysis ( $\alpha=0.05$ ) and the averages were compared with a Tukey test.

There was a significant effect between the type of inoculums and its interaction with carbon structures in all plant performance variables and in the AUDPS. The treatments with native inoculums didn't show sickness symptoms, while CH-11 strain had an immediate impact on plant mortality. Carbon structures had an extremely differentiated performance while being in interaction with *T. harzianum* and in presence of the pathogen: *T. harzianum*-biochar (with CH-11 strain) was the most affected treatment by *damping-off*, while *T. harzianum*-CNT (under

the same inoculums) was the most successful of all, showing no sickness symptoms during the whole experiment. No control agent induced an outstanding plant performance in control treatments.

In spite of the indisputable success of the *T. harzianum*-CNT interaction on the control of the *damping-off* disease, the controversy around carbon nanotubes toxicity leads us to suggest more studies around this control method before it is applied in the field.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los suelos son un elemento de enorme importancia en nuestra sociedad: nos proveen de servicios esenciales para nuestro bienestar y el funcionamiento ecosistémico, como lo son el soporte de la biota edáfica, la vida vegetal y animal, el almacenamiento y ciclaje de agua y nutrientes, la descomposición de la materia orgánica, el control de patógenos y la protección de la calidad y cantidad del agua (Glanz, 1995; Doran *et al.*, 2000; WAI, 2001). De la misma forma, de los suelos depende en gran medida la calidad y rendimiento de los cultivos agrícolas. La salud del suelo en sí se define por la capacidad que éste tiene para funcionar como un sistema vivo equilibrado que provee estos servicios (Janvier *et al.* 2007), de manera que nuestro bienestar depende en gran medida de la salud del suelo (Slavich, 2007).

La salud del suelo se rige por múltiples niveles de equilibrio, que dependen de las compensaciones que se puedan dar dentro del sistema edáfico (tanto en términos físicos como biológicos). Las prácticas agrícolas y la diversidad que se mantiene dentro de los agroecosistemas, tanto vegetal como microbiana, tienen una gran influencia en la promoción o el deterioro de la salud del suelo (Altieri, 1999).

## **1.1. La problemática alrededor del control agroquímico de plagas y enfermedades**

A partir de la década de los años 40 el modelo de producción agrícola basado en el insumo de productos químicos cobró un enorme grado de adopción en numerosos países. Aunque el objetivo de dicho modelo tenía intenciones de disparar la productividad y rendimiento para satisfacer la creciente demanda de alimentos, tardó poco en revelar graves daños ambientales y económicos a raíz del uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas. Sin restar los beneficios que esta apuesta tecnológica tuvo, y sigue teniendo en muchos casos, los perjuicios han vuelto su uso indiscriminado incosteable en términos de sustentabilidad y salud ambiental (Restrepo, 1988; Rosset, 1997).

Aunque dependientes de la concentración, formulación química y tipo de contacto, la presencia y prevalencia de plaguicidas en suelos, agua y alimentos, presentan grandes amenazas sobre la salud humana, vegetal y animal (Gevao *et al.*, 2000; Karam *et al.*, 2004; Tsai, 2010). Producto de ello, gran cantidad de compuestos han sido prohibidos o regulados debido los

impactos negativos que presentan a la salud y al ambiente (FAO, 2006). No obstante, a pesar de la existencia de legislación en México, hay una regulación débil sobre la exposición ambiental a estos compuestos, así como el monitoreo de sus daños a la salud pública (Ortega-Ceseña *et al.*, 1994; Cifuentes *et al.*, 2010; Ortíz *et al.*, 2014).

El uso de plaguicidas como único método de control ha probado en un sinnúmero de casos agravar la incidencia de plagas y enfermedades a lo largo de los ciclos agrícolas, en vez de reducirla (Corbet, 1986; Restrepo, 1988; Mejía, 1999). En 1995 se estimó que menos de un 0.1% de los pesticidas aplicados tenían impacto sobre la plaga objetivo; el 99.9% entraba libremente al ambiente contaminando agua, suelo y aire, afectando a otros organismos (Pimentel y Hall, 1995). La capacidad que tienen numerosos organismos patógenos de evolucionar en pocas generaciones y desarrollar resistencia ante las formulaciones químicas hacen que, a pesar de los avances tecnológicos y la creación de plaguicidas específicos, la disminución en la efectividad de estos y la resistencia adquirida de los patógenos, sigan siendo observadas hoy en día (Sharma, 2012).

Adicionalmente, el impacto impremeditado hacia organismos no-blanco implica una pérdida de diversidad que reduce las poblaciones de enemigos naturales (Rosset, 1997) y los mecanismos de auto-regulación de los sistemas agrícolas (Altieri, 1995), generando por tanto un detrimento en la salud del suelo y los beneficios que esta puede otorgar a las poblaciones humanas. Al presentarse este problema se suelen aplicar dosis aún más altas o productos de mayor toxicidad, con lo que se agrava la contaminación del suelo y del agua, se genera inestabilidad biótica, y los riesgos a la salud de los agricultores y sus familias se incrementan (UNEP, 1999; FAO, 2004). Esta creciente resistencia de los patógenos y la eliminación de sus antagonistas, condiciona la estabilidad tanto del suelo como de los sistemas agrícolas en sí. De esta forma la vulnerabilidad del sistema aumenta, sin solucionar el problema original de daños por plagas.

Por ello, así como por las crecientes amenazas a la salud y débil regulación ambiental, se vuelve imperante la generación de alternativas para desarrollar un manejo de plagas que sea viable a largo plazo y que no afecte la diversidad de microorganismos en el suelo.

## **1.2. Prácticas agroecológicas: La diversidad como promotor de estabilidad**

Parte del fracaso de numerosos métodos de control de plagas y enfermedades reside en la visión reduccionista que se tiene de éstas dentro de los sistemas agrícolas, donde se conceptualiza al

organismo patógeno como un elemento aislado, mientras que el agroecosistema se compone tanto de organismos benéficos como de organismos perjudiciales. Los organismos fitopatógenos con origen en el suelo constituyen una parte integral de las comunidades microbianas, es decir, son habitantes naturales del suelo. La ocurrencia de epidemias o el brote de enfermedades es una indicación de desbalance en el ecosistema (van Bruggen y Semenov, 2000).

La diversidad ha sido señalada en numerosas ocasiones como un promotor de la estabilidad (M. a. Altieri, 1999; van Bruggen y Semenov, 2000), y el esfuerzo por restaurar esta diversidad, y por tanto sus propiedades emergentes (e.g. supresión de enfermedades), ha sido uno de los grandes pilares de la agricultura sostenible. De esta forma se busca que el propio sistema sea capaz de generar la salud y fertilidad de sus suelos, el control natural de plagas y la productividad de sus cultivos (Altieri, 1999). Este es uno de los objetivos que las prácticas agroecológicas buscan al dotar a los cultivos de mejores condiciones y herramientas para que puedan tolerar o incluso impedir la incidencia de patógenos (Mejía, 1999). Cambiar las condiciones de competencia de las plagas puede reducir los daños a un nivel mínimo que, si bien no elimina al organismo blanco, puede mantener sus daños por debajo del umbral de daño económico (Mejía, 1999).

Tanto para los métodos convencionales, como para estrategias de control alternativo de plagas y enfermedades, es importante tener presente que “el abuso de cualquier método de control, sin importar su eficacia, lo hará inefectivo a largo plazo y magnificará los efectos colaterales que este pueda tener” (Mejía, 1999).

El presente trabajo parte del reconocimiento de la complejidad de los sistemas agrícolas y las interacciones que se dan dentro de ellos. De forma que se nutre y busca ser una aportación a la corriente del manejo integrado de plagas (MIP). El MIP es una propuesta de manejo fitosanitario con enfoque múltiple que surge en la década de los años sesenta. Esta propuesta de manejo incluye tanto a distintas prácticas, como métodos y disciplinas (Zuluaga y Mesa, 2000), y parte del precepto de que lo óptimo es generar un sistema de manejo que no resida en una sola estrategia de control, y encontrar métodos que lleguen a establecer un equilibrio relativo entre las plagas y organismos antagónicos. Esto puede generar daños mínimos al cultivo, pero mantiene el equilibrio biótico del sistema (Romero, 2004).

### **1.2.1. Control biológico con microorganismos**

Los organismos vivos del suelo son esenciales para la sustentabilidad de los agroecosistemas, por lo que es deseable que se pongan en práctica aquellas prácticas que promuevan y aumenten la diversidad biótica de los suelos (Altieri, 1999).

Dentro de las alternativas de control de plagas, el control biológico a través de microorganismos antagonistas ha probado ser un medio para restaurar el equilibrio biótico. El control biológico de enfermedades tiene como objetivo lograr la reducción poblacional de un patógeno, o sus efectos, a través de uno más organismos, introducidos de manera natural al sistema o por la manipulación del ambiente (Baker y Cook, 1974).

Las prácticas de control biológico, han sido señaladas como un elemento importante en el manejo integral de plagas (MIP) que pueden encaminar a los sistemas agrícolas hacia el equilibrio biológico, manteniendo a las plagas por debajo del umbral de daño económico (Zuluaga y Mesa, 2000; Alatorre *et al.* 2014). La urgencia de adoptar prácticas para una agricultura sostenible, o simplemente la necesidad de un control alternativo al agroquímico, así como los numerosos casos de éxito a través del control biológico (Gurr *et al.*, 2000) han hecho que estas prácticas cobren una importancia cada vez mayor tanto en la investigación académica como en las prácticas agrícolas.

#### **1.2.1.1. Trichoderma harzianum como antagonico de P. capsici**

El género *Trichoderma* ha sido muy estudiado como antagonista de patógenos y se ha vuelto de los más utilizados para el control de ciertos patógenos del suelo (Sivan *et al.*, 1984; Vega, 2001; Howell, 2003). En específico, *Trichoderma harzianum* ha sido reportado como un agente exitoso en el control de *P. capsici*, reduciendo la enfermedad causada por éste en las plantas en un 50% y hasta en un 65% (Ahmed *et al.*, 2000; Ezziyyani *et al.*, 2004).

Los mecanismos usados por *T. harzianum* en el control de organismos patógenos son diversos. Uno de ellos, que ha llegado a clasificarse como micoparasitismo, se lleva a cabo por la penetración a las hifas del patógeno y la disolución del citoplasma a través de enzimas como la gliotoxina y gliovirina (Wells *et al.*, 1972; Chet, 1987; Howell *et al.*, 1993). La competencia por recursos es otra estrategia de *T. harzianum* que es reconocida por ser efectiva en el control de patógenos. No obstante, el éxito de esta estrategia recae en la cepa usada y qué tan competente es en la rizósfera (Howell, 2003).

Otras investigaciones se inclinan más por un efecto de supresión a través de la liberación de quitinasas y/o glucanasas producidas por el agente de control que desintegran la pared celular del patógeno (Woo *et al.*, 1999). En estos mismos estudios se reconoce que el efecto de control por parte de *Trichoderma* reside en diversos mecanismos como los recién mencionados, lo que indica que otros factores, además de la actividad de la quitinasa, son importantes en el proceso de control biológico. Otros estudios encontraron inclusive relaciones sinérgicas entre enzimas y antibióticos producidos por *Trichoderma*, mostrando mejores resultados que el desempeño individual de estos. De la misma forma, se ha probado que *Trichoderma* induce la resistencia sistémica de la planta, además de promover su crecimiento, ejerciendo así un control indirecto sobre el patógeno ( Windham *et al.* 1986; Kleifeld y Chet 1992; Di Pietro *et al.* 1993; Schirmbock *et al.* 1994; Ahmed *et al.* 2000; Nawrocka y Małolepsza 2013). No obstante, un problema recurrente en el uso de inóculos es asegurar su establecimiento e interacción con el organismo deseado. En estos casos suele ser necesario el uso de “alimentos” para el hongo, o enmiendas orgánicas para ayudar en su establecimiento (Miller, 1990).

### **1.3. Las estructuras de carbono como promotores del crecimiento y vehículo de inoculación**

Es sabido que la composición y riqueza de las comunidades microbianas son dependientes del microambiente, lo que sugiere la necesidad de nichos específicos para que estas comunidades proliferen (Gayosso, 2010). La formulación de inóculos microbianos, su almacenamiento y método de aplicación, son factores críticos en el éxito de un producto (Jha y Prasad, 2006). De esta forma, es deseable que los organismos usados para el control biológico (en especial para los patógenos con origen en el suelo) tengan una ventaja significativa en el suelo respecto al organismo perjudicial.

Las enmiendas orgánicas han sido reconocidas como uno de los medios más importantes para el manejo de la biodiversidad en el suelo (Brussard *et al.*, 2007), y como parte de ello se ha comprobado su potencial para aumentar los niveles de actividad microbiana en la rizósfera e iniciar importantes procesos del control de enfermedades (Fry, 1982).

A diferencia de las formas de materia orgánica no carbonizada, las estructuras de carbono alotrópico como el carbono amorfo y el grafito, tienen la ventaja de permanecer en el suelo por periodos prolongados de tiempo. Esto puede presentar grandes ventajas en términos de fertilidad

y calidad del suelo, debido a que las estructuras de carbono cuentan con una gran superficie interior y un volumen de poros que ayuda al crecimiento de la vida microbiana bajo dosis apropiadas. Entre otras cosas, también se ha reportado que estas estructuras pueden mejorar la conductividad eléctrica y la capacidad de intercambio catiónico en el suelo (Ogata y Yamabe, 1986; Beck, 1991; Takagi y Yoshida, 2003). Estas cualidades dotan a materiales como el carbón vegetal y a los nanotubos de carbono de un potencial para la formulación de biofertilizantes y bioplaguicidas.

### **1.3.1. Biochar**

El biochar es un material rico en carbono que se obtiene de la combustión de materia orgánica en condiciones de poco oxígeno o pirolisis. Este término se empezó a usar hace relativamente poco para diferenciarlo conceptualmente del carbón vegetal; biochar es el término usado cuando este producto es aplicado deliberadamente al suelo con el fin de mejorar las propiedades de este último (Lehmann y Joseph, 2009).

Las características del biochar, y por tanto sus impactos al ser incorporado al suelo, dependen de las propiedades del material en sí. El material de origen del biochar, la temperatura y duración de la pirolisis, el grado de oxidación, y las propiedades que surgen de estas condiciones (carga superficial, densidad, distribución y tamaño de poros) tendrán impacto en su desempeño en el suelo (Lehmann, 2007; Chan *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que el desempeño del material puede cambiar dependiendo de las características del suelo (propiedades físicas, químicas y biológicas) y del cultivo en el que se aplica (Khodadad *et al.*, 2011; Lehmann *et al.*, 2011).

Los beneficios del carbón vegetal en la regeneración de vegetación y la germinación de semillas son conocidos desde hace tiempo, y desde hace ya tres décadas las investigaciones alrededor del uso de biochar con fines agrícolas y de restauración han cobrado gran popularidad (Steiner *et al.*, 2007; Lehmann y Joseph, 2009; Beesley *et al.*, 2011).

Debido a su gran volumen de poros y su alta capacidad de intercambio catiónico, el biochar incrementa la disponibilidad de agua, la aireación y la adsorción e inmovilización de compuestos tóxicos. Se ha observado que tanto estas propiedades, como su gran superficie interior, proveen un hábitat significativo a los microorganismos y de esta forma la biología edáfica es favorecida e incentivada por su presencia (Lehmann *et al.*, 2011; Quilliam *et al.*, 2013).

Al estimular el crecimiento de la vida microbiana, el biochar puede aumentar las interacciones benéficas planta-microbio. Estas interacciones pueden dotar al cultivo en cuestión de un mejor acceso a los nutrientes presentes en el suelo, así como protección contra organismos patógenos (Lehmann, 2011). En este aspecto en particular, se ha descubierto que el control de plagas y enfermedades puede incentivarse por el biochar de tres formas; a través de promover la presencia y actividad de organismos antagónicos (Lehmann, 2011), ejerciendo un control indirecto a través de la promoción del crecimiento vegetal (Elmer, 2012) e induciendo resistencia sistémica en las plantas (Elad *et al.*, 2010). Se ha probado que las interacciones entre el biochar, suelo, microbios y las raíces de las plantas, ocurren en un corto tiempo después de la incorporación de este en el suelo (Lehmann y Joseph, 2009), lo que permite observar cambios en el corto plazo.

Es importante recordar que el éxito de la aplicación de biochar siempre será dependiente tanto de sus propiedades, como del suelo o cultivo en el que se aplique. Se ha observado que el tipo de suelo y la naturaleza del biochar, favorecen más a ciertos microorganismos que a otros (Khodadad *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2014). Debido a esto, se considera necesario llevar a cabo experimentos controlados antes de que este material sea aplicado en campo.

### **1.3.2. Nanotubos de carbono (NTC)**

A diferencia del carbón vegetal y del biochar, los nanotubos de carbono (NTC) son formas alotrópicas de carbono pero pertenecientes a una variedad cercana al fullereno. Estos fueron observados por primera vez en 1991 por Ijima y se conforman de paredes de grafito enrolladas de forma tubular con una separación de 0.34 nanómetros (nm) entre capas, aproximadamente, y con un diámetro de 0.5 a 5 nm. Existen nanotubos de carbono de pared simple y nanotubos de pared múltiple. Los segundos, a los que nos referiremos el resto del documento como NTC, son los que se usaron en el presente estudio debido a que han mostrado un desempeño superior en la interacción con organismos vivos y mejores propiedades físico-eléctricas (Khodakovskaya *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Servin *et al.*, 2015).

Los nano materiales de carbono han cobrado gran importancia en el campo de la industria debido a que cuentan con propiedades físicas, químicas y eléctricas únicas: alta conductividad eléctrica, resistencia superior a la de cualquier metal, baja densidad, estabilidad térmica, entre otras (Popov, 2004). En las escalas nanométricas la relación superficie-área-volumen se vuelve

muy grande. Esta relación aumenta conforme las partículas disminuyen en tamaño, lo que provoca un incremento en la adsorción de átomos cercanos y por tanto el cambio en propiedades y comportamiento del material (Dinesh *et al.*, 2012). Esto ha hecho que los nanotubos sean sumamente atractivos para ser usados como vehículos de distintos elementos y partículas. El proceso por el que se acoplan diferentes grupos químicos, proteínas, enzimas, etc. a la superficie de los nanotubos se llama “funcionalización”. A través de este método los nanotubos han sido usados para numerosos propósitos en el ámbito industrial, médico, el desarrollo de nanotecnología, biosensores, y la remoción de metales pesados del agua (Upadhyayula *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Kasel *et al.*, 2013).

Aplicaciones distintas a las que se dan en el ámbito industrial han sido poco exploradas (Popov, 2004). A pesar de esto, las cualidades tamaño-dependientes, la alta proporción volumen-superficie, y las propiedades eléctricas únicas de los nanotubos de carbono, los hacen materiales atractivos para estudios en biotecnología agrícola (Ghormade *et al.*, 2011). Los mayores avances en este campo se han hecho sobre sus aplicaciones en la formulación de pesticidas, fertilizantes y el uso de biosensores para incrementar la eficiencia en el uso de insumos (Khot *et al.*, 2012; Servin *et al.*, 2015). No obstante, existen estudios recientes que revelan beneficios directos sobre las plantas. El interés en este material reside sobre todo en la capacidad eléctrica del mismo, ya que es útil como un campo de emisión de electrones debido a su tamaño nano, su estabilidad química, y sobre todo su gran conductividad eléctrica (Rinzler *et al.*, 1995). Debido a su capacidad de adsorción sobre fertilizantes y compuestos orgánicos (Navarro *et al.*, 2008; Upadhyayula *et al.*, 2009), es posible que los NTC puedan servir como almacén de nutrientes a largo plazo para la biota del suelo. De esta forma, estas estructuras podrían fomentar la biota edáfica presente o bien ser usados como vehículo de inoculación y promoción de grupos microbianos. De ser exitosas estas aplicaciones, esto implicaría para la planta una ventaja en términos de nutrición y protección contra organismos patógenos.

Por otro lado, se han documentado beneficios directos a la planta por parte de estas estructuras. Zheng *et al.* (2015) observaron que los NTC aceleraban el desdoblamiento de sustancias orgánicas, provocando la liberación de radicales de oxígeno e incrementando así la tasa fotosintética de las plantas. Asimismo, se han hecho observaciones sobre la activación de los canales de absorción de agua de las células, lo que fomenta el crecimiento vegetal y la germinación de semillas (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2012).

De esta forma, la aplicación de NTC, sea con fines de estimular la presencia y acción de grupos microbianos (ej. como vehículo de inoculación) o de tener impacto directo sobre el crecimiento vegetal, podría favorecer a la planta en términos de nutrición y de protección contra plagas y enfermedades.

No obstante, existen numerosos estudios sobre los impactos de los NTC sobre el ambiente, la salud humana y animal (Lam *et al.*, 2004; Zhao y Liu, 2012; Du *et al.*, 2013; Kasel *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014). Esto se debe a que el impacto de estas estructuras sobre las células vivas depende altamente de la dosis bajo las cuales sean aplicadas, así como su destino y movilidad en el ambiente. Experimentos sobre ratones han mostrado riesgos a la salud por contacto directo e inhalación de estas estructuras a partir de 0.1mg (Zhao *et. al.*, 2012). De misma forma, los daños a la biota edáfica se han reportado a partir de aplicaciones de dosis mayores a 500mg/l (Chung *et al.*, 2011). La realidad se reduce a que a pesar de los numerosos estudios sobre los impactos positivos y negativos de los NTC en los seres vivos, sigue sin haber un consenso acerca de la toxicidad, dosis adecuadas, ni el destino de los NTC en el ambiente (Saleh *et al.*, 2008). Afortunadamente, la investigación en temas de toxicidad sigue creciendo, así como los avances en la producción de nanopartículas con un nivel de rápida degradabilidad (López y Golovátaya, 2004; Corradini *et al.*, 2010; Guan *et al.*, 2010; Mohamed y Khairou, 2011). Independientemente, es necesario saber que la respuesta de los NTC dependerá siempre de la especie de planta, el substrato y condiciones de crecimiento donde se encuentre. Por lo expuesto anteriormente, es de suma importancia tener presente que la dosis en la que los NTC sean aplicados, definirá la línea entre los efectos positivos y perjudiciales que puedan tener sobre los seres vivos (Servin *et al.*, 2015).

#### **1.4. La producción de chile en México**

Con una producción de un millón y medio de toneladas anualmente, México es el segundo productor más grande de chile a nivel mundial (Santoyo y Martínez, 2013). La importancia de este cultivo, sin embargo, no radica únicamente en la producción extensiva y con fines de comercialización; es cultivado de forma tradicional a lo largo de todo el país en solares familiares y parcelas dedicadas a la autosuficiencia alimentaria. Es de los cultivos más importantes del país por su gran consumo entre la población nacional y su fuerza como símbolo de identidad gastronómica (Namesny, 2006).

El cultivo de chile se ve puede ver afectado principalmente por *Oomycetes*, virus, nemátodos, bacterias, hongos e insectos (López y González, 2001), los cuales son responsables en distinto grado de las pérdidas en producción y del rendimiento de los cultivos.

### **1.5. *Phytophthora capsici***

*Phytophthora capsici* es un pseudohongo perteneciente a la clase de los *Oomycetes*. A pesar de compartir con los hongos el desarrollo de hifas, la absorción directa de nutrientes y la dispersión por esporas, los *Oomycetes* tienen paredes celulares formadas de celulosa en vez de quitina, micelio no septado y un ciclo de vida predominantemente diplonte (con fases de reproducción diploide y haploide) lo que los hace diferentes a los hongos verdaderos (Heffer *et al.*, 2012).

La reproducción de *P. capsici* puede ser asexual o sexual. La reproducción asexual se lleva a cabo a través de la germinación directa del esporangio con la formación de un tubo germinativo o germinación indirecta con la liberación de zoosporas que, al ser transportadas por un medio acuoso, buscan tejido vegetal dónde enquistarse. Una vez que el patógeno se establece en la planta, las hifas se ramifican y se generan nuevos esporangios que repiten el ciclo. Esto puede ocurrir varias veces en un solo ciclo agrícola, así como durante el desarrollo de la planta (Rocha *et al.*, 2012). La reproducción sexual se lleva a cabo a través de la fusión de gametangios femeninos y masculinos, los cuales producen estructuras altamente resistentes a embates ambientales, llamadas oosporas, que una vez bajo condiciones propicias generan un tubo germinativo y forman esporangios que inician el ciclo de vida asexual (West *et al.*, 2003). Las oosporas son el principal propágulo de supervivencia del patógeno, debido a que pueden permanecer en el suelo por más de dos años hasta que se den condiciones propicias para su germinación (Widmer, 2010).

*P. capsici* es un patógeno con un amplio espectro de hospederos que afecta a más de 50 especies de solanáceas, cucurbitáceas y fabáceas (Erwin y Ribeiro, 1996; Hausbeck y Lamour, 2004; Gevens *et al.*, 2008; Quesada-Ocampo *et al.*, 2009). Inclusive, en caso de que no haya hospederos presentes a lo largo de un ciclo agrícola, las oosporas del patógeno hibernan en el suelo y pueden inducir otra explosión poblacional en el siguiente ciclo del cultivo (Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour y Kamoun, 2009).

En general, los *Oomycetes* tienen una flexibilidad genética y rapidez de mutación muy alta, que les permite desarrollar resistencia a fungicidas y vencer las barreras de resistencia en las

plantas (Tyler, 2001). *Phytophthora capsici* en particular, ha sido señalada por presentar alta variabilidad genética intra e interespecífica, siendo así una de las especies con mayor variabilidad dentro del género *Phytophthora* (Truong *et al.*, 2010; Erwin y Ribeiro, 1996). Esta especie ha demostrado desarrollar resistencia a mefenoxam, matalaxyl, propamocarb clorhidrato y azoxystrobin (Lamour y Hausbeck, 2000; Parra y Ristaino, 2001; Pérez *et al.*, 2004).

### **1.5.1. La enfermedad de marchitez en las plantas de chile**

La enfermedad de marchitez, o secadera, es comúnmente causada por *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp. y algunas veces por un consorcio de los tres géneros o una combinación de dos de ellos. En el 2002, González *et al.*, realizaron un muestreo de plantas enfermas por marchitez en siete estados de México y se encontró que 65%, 33% y 33% del origen de la enfermedad se asociaba a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, respectivamente. No obstante, a pesar de tener una frecuencia de mención menor que *Fusarium* sp., *P. capsici* sigue siendo considerada hasta hoy en día la enfermedad más devastadora, a nivel mundial, en la producción de chile (Ristaino y Johnston, 1999), debido a que puede ocasionar pérdidas de hasta 80% en la producción (Li *et al.* 2007), e incluso del 90% en condiciones ambientales propicias (SAGARPA, 2004).

Los síntomas que expresa la planta tras la infección por el patógeno son: pérdida de turgencia, clorosis en hojas y tallos, necrosis y adelgazamiento en la base del tallo, así como pudrición de raíces. *P. capsici* puede infectar tanto raíces como tallos, hojas o frutos en cualquier etapa de desarrollo de la planta, además de que puede presentarse varias veces en un solo ciclo agrícola (Erwin y Ribeiro, 1996). Se ha determinado que los mayores daños por diseminación de la enfermedad, son ocasionados por exceso de irrigación y/o lluvia pesada (Li *et al.*, 2007), ya que estos favorecen la dispersión del inóculo (Lamour y Kamoun, 2009) la cual ocurre rápidamente y en grandes extensiones de terreno, llegando a infectar hasta un 100% del cultivo, de un día para otro. Estos efectos pueden acrecentarse en suelos de textura arcillosa, ya que en estos el drenaje es deficiente.

### **1.6. La producción de chile en el valle de Queréndaro**

Queréndaro es un municipio que se localiza al norte del estado de Michoacán, a 35 km de Morelia. Con una población de 13,550 habitantes, el valle de Queréndaro es una zona con

vocación agrícola donde se cultiva principalmente trigo, maíz, sorgo y chile (DOF, 2011). Prácticas agrícolas tradicionales en el cultivo de chile como el uso de variedades criollas, la selección de semilla, y el proceso de secado al sol en petates (alfombras de palma tejida), han hecho de Queréndaro un lugar reconocido y de gran importancia histórica y cultural en el cultivo de chile a nivel estatal (Jimenez, 2012). En Queréndaro se lleva a cabo anualmente la Feria del chile entre los meses de septiembre y octubre. Esta localidad, a pesar de no ser destacada por volumen de producción, guarda gran prestigio en la calidad de su producto, el cual tiene fama de sobresalir en sabor y nivel de pungencia.

La producción de chile representa una actividad de gran importancia económica y social, pues de esta dependen directa e indirectamente un gran número de familias y es generadora de alrededor de 600 empleos permanentes y temporales. La principal amenaza de este ingreso, de acuerdo con los productores, son las enfermedades y plagas, y la comercialización.

Durante los últimos diez años este cultivo se ha visto seriamente afectado por el incremento desmedido de insectos plaga. Insectos vectores de virus y fitoplasmas, como la mosca blanca, pulgones, trips, picudo y gusanos, que pueden ocasionar en conjunto pérdidas que varían del 10 al 70 % de la producción. De todas las enfermedades que se presentan, la más devastadora es la marchitez o secadera, ocasionada por *P. capsici*, que de no tener un manejo adecuado puede ocasionar pérdidas de hasta 90% (Valadés, 2013).

De una serie de entrevistas llevadas a cabo en abril de 2013, Valdés señaló que el 95% de los productores sembraba semilla criolla y aplicaba agua de riego por gravedad, cosechaba un promedio de 5 a 7 ton/ha de chile y el 100% aplicaba, aunque en distinta medida, agroquímicos para el control de plagas y enfermedades. No obstante, la aplicación de fungicidas para el control de *P. capsici*, además de presentar un gasto económico grande y riesgos para la salud de los agricultores, ha sido cada vez menos efectiva.

Miembros de la Asociación de Chileros de Queréndaro, que cuenta con 29 productores (algunos provenientes de la región chilera de Yurécuaro, Michoacán), con ayuda del asesor técnico Ing. Jaime Valadés Raya, quien nos comentó que han empezado a llevar a cabo estrategias alternativas en el control de *P. capsici* (comunicación personal), que incluyen prácticas de control químico, físico, cultural, biológico y mecánico. En lo que concierne a las prácticas de control biológico, han estado experimentando con mezclas bacterianas que son aplicadas en las charolas de cultivo o almácigos, antes de ser trasplantadas a campo.

Con la finalidad de profundizar en las alternativas de control de *P. capsici* a través del uso de microorganismos antagonicos y estructuras de carbono, así como proporcionar información que pueda ser de utilidad para la Asociación de Chileros de Queréndaro, los objetivos de este estudio se plantearon considerando las características de producción de Queréndaro; el tipo de suelo donde se cultiva y la producción de plántula en invernadero.

### **1.7. Justificación**

Los daños ocasionados por el uso indiscriminado de agroquímicos, como único método de control de plagas, han vuelto esta práctica insostenible en términos de salud humana, vegetal y animal, economía campesina y equilibrio ecológico. Resulta cada vez más apremiante el desarrollo y la puesta en marcha de alternativas para el control de plagas y enfermedades. El manejo integrado de plagas (MIP) ofrece no sólo métodos más sustentables para manejar la salud y productividad de los cultivos, sino que brinda un marco más integral para el análisis del sistema agrícola y sus problemáticas. El presente estudio busca proponer, como elemento del MIP, una estrategia de control que pueda ser aplicada desde el momento de germinación de las plántulas de chile. Esta aplicación temprana tiene el objetivo de dar protección al cultivo desde el estado de desarrollo más vulnerable, buscando reducir en gran medida el uso de productos químicos y lograr el establecimiento de una microbiología edáfica favorable para el equilibrio del sistema.

De la misma forma el desarrollo de esta alternativa de control busca aportar más información a los productores de Queréndaro respecto al manejo de la enfermedad provocada por *P. capsici*, así como hacer uso de estrategias de aplicación temprana que asemejen la producción en campo que realiza la Asociación de Chileros.

## 2. PREGUNTAS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo a la problemática planteada surgieron las siguientes preguntas, que tienen el propósito de investigar el éxito de los agentes de control mencionados anteriormente en el manejo de la enfermedad provocada por *P. capsici*: (a) ¿La presencia de *T. harzianum* en el suelo disminuye la severidad de la marchitez? (b) ¿La presencia de estructuras de carbono en el suelo disminuye la severidad de la marchitez? (c) ¿Las estructuras de carbono a usar presentan diferencias entre sí en cuanto al control de la marchitez? (d) ¿La interacción entre las estructuras de carbono y *T. harzianum* es efectiva en el manejo de la marchitez? y (e) ¿La respuesta frente a uno u otro tipo de estructura de carbono es diferenciada?

Para responder estas preguntas se plantearon los siguientes objetivos: el objetivo general de esta investigación es determinar la efectividad de *Trichoderma harzianum*, biochar y NTC en el control de la enfermedad ocasionada por *P. capsici* a través del desempeño de cada uno de ellos de manera individual, así como el de su interacción usando las estructuras de carbono como un vehículo de inoculación. Los objetivos particulares son i) evaluar el efecto individual de *T. harzianum*, biochar y NTC en la morbilidad y mortandad de las plantas de chile inoculadas con *P. capsici* y ii) evaluar el efecto de la interacción entre *T. harzianum*-biochar y *T. harzianum*-NTC en la morbilidad y mortandad de las plantas de chile inoculadas con *P. capsici*.

La hipótesis de este trabajo sostiene que la presencia de *T. harzianum* y las estructuras de carbono (biochar y NTC), ya sea de forma individual o en interacción, disminuyen los daños de *P. capsici* sobre la planta de chile.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se probó el efecto de los agentes de control sobre dos inóculos de *P. capsici*: un inóculo nativo de la región de Queréndaro, Mich., y la cepa CH-11. Esta cepa fue provista por el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y fue aislada de un cultivo de chile en la localidad de Cuitzillo, Michoacán.

#### 3.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue factorial de 3 vías, teniendo como agentes de control biochar, NTC y *T. harzianum*.

Factor 1: Estructuras de carbono, con 3 niveles: Biochar, NTC y sin estructuras de carbono.

Factor 2: Control biológico, con dos niveles: con y sin *T. harzianum*.

Factor 3: Tipo de inóculo de *P. capsici*, con tres niveles: Inóculo nativo, inóculo de cepa CH-11 y sin inóculo.

La combinación de los tres factores dio como resultado 18 tratamientos, con seis repeticiones por tratamiento, para un total de 108 unidades experimentales (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tratamientos aplicados en las plantas de chile para evaluar *T. harzianum*, nanotubos de carbono (NTC), y biochar como agentes de control sobre *P. capsici*.

	Inóculo nativo	Inóculo con cepa CH-11	Suelo sin inóculo
<i>T. harzianum</i>	T1	T2	T3
Biochar	T4	T5	T6
Nanotubos de carbono	T7	T8	T9
<i>T. harzianum</i> + biochar	T10	T11	T12
<i>T. harzianum</i> + NTC	T13	T14	T15
Testigo	T16	T17	T18

Tanto *T. harzianum* como las estructuras de carbono fueron aplicados en la charola de germinación. Esta aplicación temprana de los métodos de control alternativo tuvo un triple

propósito; proteger a la planta de Chile desde el estadio más vulnerable, permitir la colonización temprana de *T. harzianum*, y generar un método que fuera apropiado y práctico para los agricultores de Queréndaro. Esto último, se consideró debido a que el momento en que los productores tienen mayor control sobre su cultivo es durante la germinación de semillas cuando las charolas de crecimiento se encuentran bajo condiciones de invernadero.

### **3.2. Biochar**

El biochar usado en este experimento se obtuvo de un gasificador experimental en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Para comprobar la inocuidad y calidad de este material se siguió el protocolo de Mulcahy et al. (2013) con modificaciones. Se germinaron semillas de lechuga en almácigos con 10%, 30% y 50% de biochar, y se midió el porcentaje de germinación y supervivencia de las plántulas. Los resultados de esta prueba de fitotoxicidad determinaron la proporción de biochar que sería utilizada en el experimento, la cual fue de un 30% basada en el éxito de germinación de las semillas.

### **3.3. Nanotubos de carbono**

Los NTC fueron adquiridos del laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) en una dilución de 5mg/20ml. Los NTC fueron obtenidos por el método de deposición química de vapor (o CVD por sus siglas en inglés) utilizando  $\alpha$  pireno como fuente de carbono y semillas de soya molidas como agente catalizador. La dosis a usar, 20  $\mu$ g de NTC por planta. Dicha dosis fue definida de acuerdo a experimentos previos de germinación y desempeño vegetal (Lara-Romero et al., *sin publicar*). Para hacer la aplicación de esta dosis se tomaron 10 ml de dilución de los 20 ml totales y se aforaron a 50 ml. Posteriormente el pH se ajustó a 5.5 con ácido clorhídrico y la dilución se aforó por última vez a 100 ml. Esto dio como resultado una concentración de 25  $\mu$ g de NTC por ml de dilución. La aplicación de NTC se hizo al momento de la siembra, aplicando con una pipeta 0.8 ml de suspensión sobre la semilla de cada unidad experimental para contar con la concentración deseada.

### **3.4. Control biológico con *Trichoderma harzarium***

El inóculo de *T. harzianum* se obtuvo de un producto comercial (*TricSoil*) del Corporativo de Desarrollo Sustentable S.A. de C.V. Esta es una empresa michoacana conformada por investigadores y profesionales del área agronómica que busca desarrollar tecnologías sustentables para la agricultura y contribuir a mejorar la calidad de los suelos y del medio ambiente. De acuerdo a pruebas de concentración y viabilidad de esporas de un estudio preliminar (Barocio, 2015) se determinó el volumen de producto a usar para inocular con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/gramo de inóculo.

### **3.5. Inóculo de *Phytophthora capsici***

La cepa CH-11 de *P. capsici* fue traída del laboratorio del IIAF y se transfirió a cajas petri con medio de cultivo V8 (Anexo 3). Una vez que el micelio creció lo suficiente, el medio de cultivo se cortó en cuadros de aproximadamente 1cm x 1cm y fue lavado cada 24 h con agua destilada estéril por 7 días para inducir la producción de esporangios. Posteriormente las cajas petri se refrigeraron por 30 min a 4°C para inducir la esporulación. Se contabilizó la concentración de zoosporas en la cámara de Neubauer (Neubauer cat. 0610130 Marienfeld, Germany) y con esta se hicieron los cálculos para inocular el volumen equivalente a 10'000 zoosporas/ml en cada planta (Ristaino et al., 1999).

### **3.6. Protocolo**

Se usó semilla criolla de chile pasilla (*Capsicum sp.*), la cual fue proporcionada por los productores en las primeras visitas a Queréndaro en diciembre de 2014. Esta semilla es la misma que usan muchos productores de la asociación de chileros de Queréndaro. También se visitó una parcela donde el productor reportó que se había presentado un alto grado de infección por *P. capsici* durante ciclo agrícola anterior, con pérdidas de más del 70% del cultivo (comunicación personal). De esta parcela se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 3 a 15 cm, para hacer pruebas en el laboratorio e identificar cepas de *P. capsici*. Aproximadamente un mes después, se regresó al sitio para coleccionar de la parcela el suelo necesario para llevar a cabo el experimento. Fue este suelo el que aportó al experimento el inóculo nativo de *P. capsici*.

Con el suelo colectado se hizo un bioensayo en medio de cultivo selectivo NARPH (Anexo 1) para comprobar la presencia y potencial de infección de *P. capsici* (Anexo 2). Posteriormente el suelo fue procesado: se extendió en lonas plásticas para eliminar el exceso de humedad, se tamizó y se homogeneizó para ser usado posteriormente en el experimento. Una tercera parte del suelo de Queréndaro se mantuvo sin tratamiento para ser usada en los tratamientos con inóculo nativo. El resto del suelo (las dos terceras partes restantes) fue esterilizado en autoclave a 130°C y 15 lb de presión durante una hora para ser usado en los tratamientos control y en aquellos inoculados con la cepa CH-11 de *P. capsici*.

El sustrato de germinación para las plantas de chile estuvo compuesto de turba, arena y vermiculita en proporción 3:1:1/2. Este sustrato se mezcló previamente con  $1 \times 10^6$  esporas/g de *T. harzianum* (usando arena como portador y mezclando posteriormente con el resto del sustrato) y 30% de biochar, según el tratamiento. Una vez que las charolas fueron llenadas con el sustrato correspondiente, se sembraron las semillas a una profundidad de 0.5 cm y se aplicó 0.8 ml de la suspensión de NTC sobre la semilla en los tratamientos con NTC. Las charolas de germinación se mantuvieron en el invernadero del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES) de la UNAM, campus Morelia donde se regaron diariamente por dos meses.

Posteriormente, las plantas se trasplantaron a macetas plásticas con capacidad de 1.5 L. El suelo sin esterilizar fue usado para los tratamientos con inóculo nativo (Fig. 1), mientras que el suelo esterilizado fue usado para los tratamientos con inóculo (CH-11) y sin inóculo. A todas las bolsas de suelo se les aplicó fertilizantes (Tabla 2) y las bolsas se llenaron de aire y agitaron para lograr una homogeneización de los nutrientes. Posteriormente, se trasplantaron las plántulas. Se tomó la altura de las plantas a las 3, 5 y 9 semanas después del trasplante. Se hicieron fertilizaciones posteriores en todos los tratamientos a las 4 y a las 6 semanas del trasplante. Únicamente la primera aplicación contó con fosfato de potasio, debido a que la baja movilidad del fósforo en el suelo, y la irrigación controlada y la duración del experimento provocan que este elemento se mantenga disponible para la planta.

El experimento se mantuvo con riego frecuente a 80% de capacidad de campo (ver Anexo 4) durante todo el experimento, a excepción de 24 h antes y después de la inoculación con *P. capsici*, momento en el que se mantuvo al 100% de capacidad de campo para facilitar la movilidad y potencial de infección de las zoosporas.

**Tabla 1.** Dosis de nutrientes aplicados a las plantas de chile el día de trasplante y a las 4 y 6 semanas de iniciado el experimento.

Nutriente	Fórmula	Concentración (g/L)	Aplicación por kg de suelo (ml)	Aplicación en términos absolutos (g)
Sulfato de potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	3	0.1125
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	25	3	0.1125
Micronutrientes	Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub>	0.7	0.099
	Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub>	1.8	0.25
	Sulfato de manganeso	Mn SO <sub>4</sub>	3.5	0.49
	Sulfato de cobalto	Co SO <sub>4</sub>	0.13	0.02
	Sulfato de magnesio	Mg SO <sub>4</sub>	15	2.12
	Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.06	0.008
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	28.57	3	0.1286
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	43.93	10	0.6590

La inoculación con la cepa CH-11 en los tratamientos 13 a 18 (Fig. 1) se realizó 3 semanas después del trasplante, aplicando con una micropipeta 1ml de 10<sup>7</sup>000 zoosporas/ml en medio líquido en la base del tallo.

### 3.6.1. Medición de la respuesta vegetal del chile

Para evaluar la respuesta vegetal del chile a los distintos factores de control biológico, estructuras de carbono e inóculo patógeno, se midió el desempeño vegetal del chile y los daños ocasionados por *P. capsici*.

### 3.6.2. Severidad de daños por *P. capsici*

Se monitorearon diariamente los síntomas de la enfermedad ocasionados por *P. capsici* en las plantas de Chile a través de un Índice de Severidad de Síntomas (ISS) que fue desarrollado de acuerdo a una escala visual que correspondiera a la respuesta de las plantas del experimento. Con el registro del ISS a lo largo del experimento, se obtuvo el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC, por sus siglas en inglés). El AUDPC es una herramienta útil para resumir cuantitativamente la intensidad de la enfermedad a través del tiempo, y se puede usar para comparar el desempeño de diferentes agentes de control o estrategias de manejo. Este valor fue ajustado para obtener el AUDPS (Area Under Disease Progress Stairs) el cual ha sido señalado por la Sociedad Fitopatológica Americana (SIMKO y Piepho, 2012) como un indicador más preciso que el AUDPC, debido a que da el mismo peso a todas las observaciones del ISS a través del tiempo, incluyendo la primera y última. Con los valores del AUDPS se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias significativas en los tratamientos y significancia de los factores (estructuras de carbono, control biológico y tipo de inóculo) sobre la variabilidad de los datos.

$$\begin{aligned}
 AUDPS &= \left[ y_1 \times \left\{ \frac{t_2 - t_1}{2} + \frac{D}{2(n-1)} \right\} \right] + \left[ \sum_{i=2}^{n-1} \left( y_i \times \frac{t_{i+1} - t_{i-1}}{2} \right) \right] + \left[ y_n \times \left\{ \frac{t_n - t_{n-1}}{2} + \frac{D}{2(n-1)} \right\} \right] \\
 &= \left[ \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \right] + \left[ \frac{y_1 + y_n}{2} \times \frac{D}{n-1} \right] = AUDPC + \left[ \frac{y_1 + y_n}{2} \times \frac{D}{n-1} \right]
 \end{aligned}$$

Con el fin de determinar el porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*, se separaron al momento de cosecha 2 g de raíz de cada unidad experimental. Estas muestras fueron cortadas en segmentos de 0.5-1 cm y agitadas en una bolsa de plástico inflada para homogeneizarlas. Se tomó una sub muestra de raíz de aproximadamente 0.5 g, la cual fue desinfectada por 10 seg en alcohol de 96° y enjuagada con agua estéril. Posteriormente se sembraron veinte de estos segmentos en cajas Petri con medio selectivo para *P. capsici* (NARPH). Las cajas fueron incubadas a 26°C y a los 3 y 7 días se contabilizó el número de segmentos infectados por *P. capsici* para obtener el porcentaje de infección de cada unidad experimental.

### 3.6.3. Desempeño vegetal

El experimento se cosechó 4 meses después de la siembra. De las plantas cosechadas se midió longitud y peso fresco de la parte aérea y radicular. Después de tomar la submuestra necesaria de raíz para los análisis de porcentaje de infección, tanto parte aérea como radicular fueron secadas en horno de extracción de humedad por 24 hrs a una temperatura de 80°C, con lo que se obtuvieron los valores de biomasa seca.

#### **3.6.4. Análisis de datos**

Los resultados obtenidos se evaluaron a través análisis de varianza de una y dos vías, utilizando el programa Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.06. Los promedios fueron comparados usando la prueba de Tukey de rangos múltiples, con un nivel de significancia del 5%. Previamente se usó una prueba de Levene para asegurar la homogeneidad de la varianza entre tratamientos.

## 4. RESULTADOS

Dos semanas después del trasplante, murieron dos individuos del tratamiento 1 y 13 (ver tabla 1) –ambos con inóculo nativo- con síntomas de marchitez. Estos fueron cosechados y se les tomaron las medidas de desempeño vegetal, así como el porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*. Posteriormente, casi 6 semanas después del trasplante (39 días) y poco más de 2 semanas después de la inoculación con la cepa CH-11, se cosecharon nueve plantas muertas con síntomas de marchitez, todas provenientes de tratamientos inoculados con CH-11 (a excepción del tratamiento 14, *T. harzianum*-NTC, el cual no presentó síntoma alguno de enfermedad). El número de unidades experimentales vivas por tratamiento al momento de cosecha puede ser observado en la Tabla 3. Estas muestras fueron procesadas como se describió anteriormente. Dado que la cantidad de raíz recuperada de las plantas enfermas fue muy pequeña y era necesario usarla en su totalidad para las pruebas de porcentaje de infección, los valores de biomasa radicular se obtuvieron con una estimación del peso fresco de raíz del tratamiento, y el promedio del porcentaje de humedad que se obtuvo de los tratamientos restantes.

Los datos de las 97 unidades experimentales restantes se registraron 2 semanas después de cosechar las plantas muertas (4 meses después de iniciado el experimento) cuando las plantas dejaron de mostrar cambios en el índice de severidad de síntomas (ISS).

**Tabla 3.** *n* poblacional de los tratamientos al momento de cosecha debido a los individuos muertos por marchitez (*n* original de 6 individuos).

Tratamiento	Inóculo nativo	Cepa CH-11	Sin inóculo
<i>T. harzianum</i>	5	5	6
Biochar	6	4	6
NTC	6	5	6
<i>T. harzianum</i> -biochar	6	1	6
<i>T. harzianum</i> -NTC	5	6	6
Control	6	4	6

### 4.1. Daños ocasionados por *P. capsici*

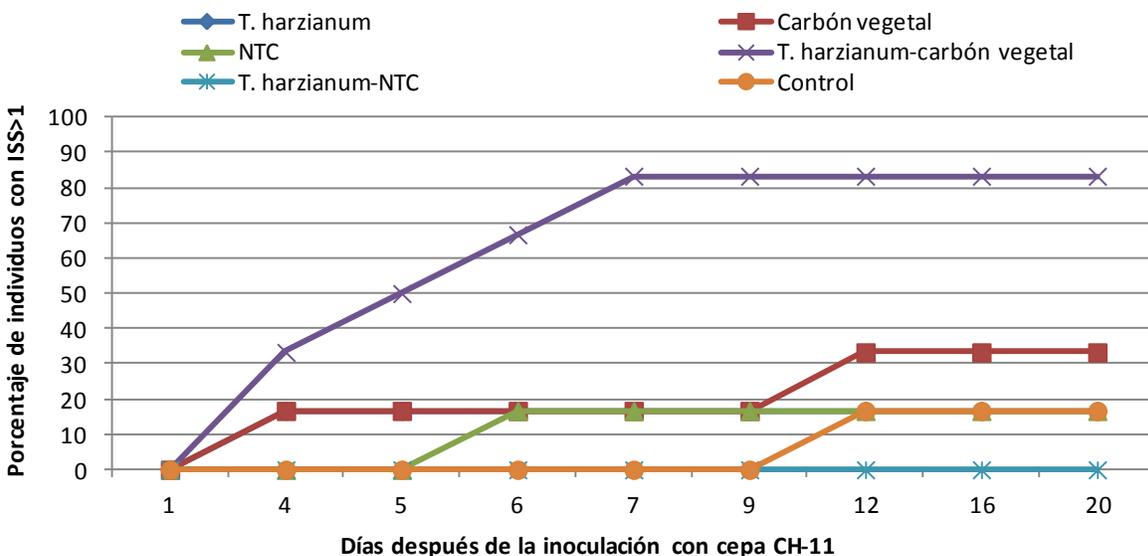
Los únicos tratamientos que presentaron síntomas de enfermedad fueron aquellos inoculados con la cepa CH-11, a excepción del tratamiento con T-NTC. El avance de la enfermedad se registró

desde el día posterior a la inoculación con el Índice de Severidad de Síntomas (ISS) que se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Índice de severidad de síntomas (ISS) para monitorear el desarrollo de la enfermedad provocada por *P. capsici* en las plantas de Chile.

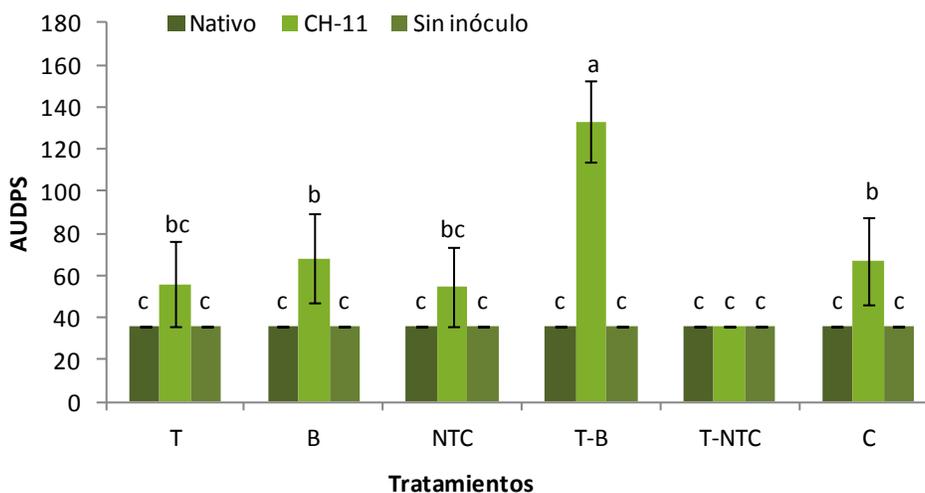
Índice de severidad	Síntomas
1	Planta sana
2	Pérdida de turgencia en las hojas
3	Pérdida de turgencia e inicio de necrosis en la base del tallo (1-3 cm)
4	Pérdida de turgencia y necrosis muy desarrollada (>3 cm)
5	Planta muerta

Con el objetivo de ilustrar la severidad de la enfermedad en los distintos tratamientos, se graficó la tasa a la que se suman nuevos individuos enfermos (con un ISS mayor) por tratamiento. Como se muestra en la Figura 1, los tratamientos T, B, NTC y C muestran un aumento muy moderado en la severidad de la enfermedad a lo largo del tiempo en comparación con el tratamiento T-B con cepa CH-11, mientras que el tratamiento T-NTC no presenta cambio alguno en el ISS durante todo el experimento.



**Figura 2.** Progresión de la enfermedad causada por *P. capsici* de acuerdo al porcentaje de individuos afectados por tratamiento a lo largo del tiempo. (Todos los tratamientos presentes pertenecen al bloque inoculado con la cepa CH-11)

El AUDPS se obtuvo con el ISS de cada tratamiento a lo largo del tiempo. Para el análisis de los resultados se realizó un ANOVA, el cuál reveló al tipo de inóculo y las estructuras de carbono como factores significativos ( $p < 0.05$ ) en la variación de los datos. De la misma forma, las interacciones que mostraron un efecto sobre el AUDPS fueron: control biológico- estructuras de carbono, tipo de inóculo-estructuras de carbono, y la interacción triple entre los tres factores (Tabla 6). Con la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher) se identificaron tres grupos homogéneos: el primero formado por todos los tratamientos bajo inóculo nativo y sin inóculo además de los tratamientos T, NTC y T-NTC bajo cepa CH-11, el segundo por los tratamientos T, B, NTC y C bajo cepa CH-11, y el tercero por el tratamiento T-B bajo cepa CH-11 únicamente. Este último tratamiento reflejó diferencias significativas con respecto a todos los demás (Fig. 2).



**Figura 2.** AUDPS (Área Bajo la Escalera de Progreso de la Enfermedad) promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de LSD). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, C= control (AUDPS= 144, equivalente al 100% del área bajo la curva).

Todos los individuos con síntomas murieron y fueron cosechados al momento (2 semanas antes de la cosecha general). Esto se hizo con la finalidad de detectar a tiempo la presencia del patógeno en la raíz y realizar el análisis del porcentaje de infección de las raíces por *P. capsici*. Para evaluar el porcentaje de infección por *P. capsici* en las raíces se usó la prueba de Kruskal

Wallis, debido a la heterocedasticidad de los datos, la cual probó diferencias significativas entre tratamientos ( $p=0.0004$ ). Al realizar el análisis con la prueba de Tukey, el tratamiento T-B con inóculo de CH-11 mostró diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, a excepción del tratamiento de B bajo el mismo tipo de inóculo ( $p<0.05$ ). No obstante, este último tratamiento no tuvo diferencias significativas con el resto. De esta forma se detectaron únicamente dos grupos homogéneos. En la Tabla 4 se muestra el porcentaje de infección promedio que presentaron los tratamientos de las plantas muertas por marchitez.

**Tabla 2.** Promedio del porcentaje de infección de raíz por *P. capsici*

Agente de control	Inóculo nativo	Cepa CH-11	Sin inóculo
<i>Trichoderma</i>	0	15	0
Biochar	0	22	0
NTC	0	5	0
<i>Trichoderma</i> -biochar	0	26	0
<i>Trichoderma</i> -NTC	0	0	0
Control	0	5	0

#### **4.2. Desempeño vegetal**

La mortalidad ocasionada por *P. capsici* se vio reflejada en las medidas de desempeño vegetal. El número de unidades experimentales al momento de la cosecha, por tratamiento, puede ser observado en la tabla 5.

Para todas las variables de desempeño vegetal (altura, longitud de raíz, biomasa radicular y aérea) la variación de los datos fue explicada por el tipo de inóculo y la interacción de este factor con las estructuras de carbono ( $p<0.05$ ). Adicionalmente, la interacción de las estructuras de carbono y la presencia/ausencia de *T. harzianum*, como factores explicativos, tuvieron un impacto significativo en la biomasa aérea (Tabla 6). De igual manera, el análisis de datos arrojó una triple interacción significativa de los factores explicativos para las variables de altura, biomasa aérea y AUDPS.

**Tabla 3.** Valores de *P*, respecto al desempeño vegetal y los daños por *P. capsici*, para las variables explicativas nivel de nivel de confianza del 95% (valores menores a 0.05 tienen significancia estadística).

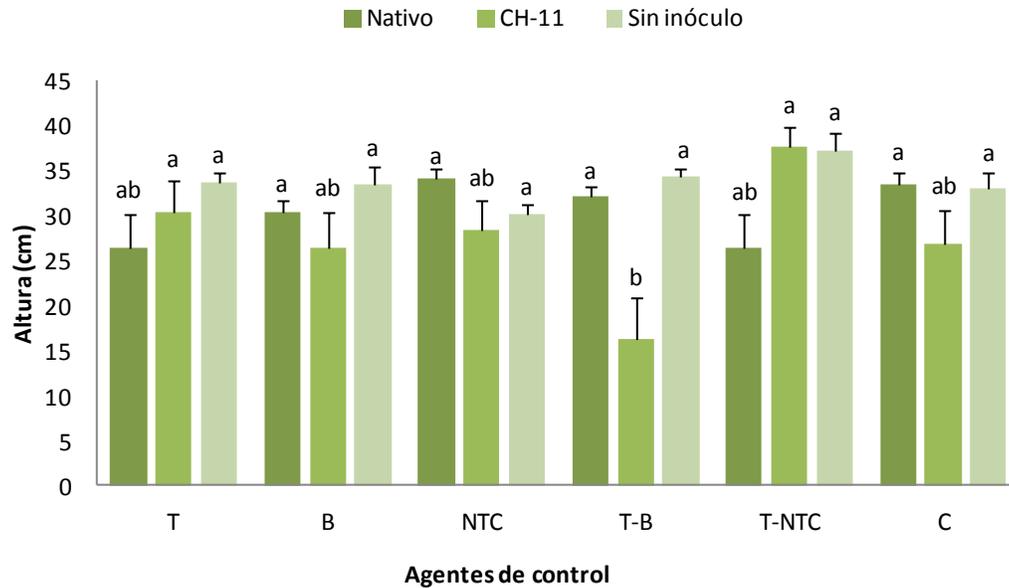
	Variable dependiente	<i>T. harzianum</i> (x)	Inóculo de <i>P. capsici</i> (y)	Estructuras de carbono (z)	x-y	x-z	y-z	x-y-z
Desempeño vegetal	Altura	0.845	0.000	0.078	0.054	0.198	0.006	0.003
	Biomasa aérea	0.718	0.000	0.083	0.074	0.041	0.000	0.002
	Biomasa radicular	0.534	0.004	0.150	0.195	0.229	0.003	0.185
	Longitud de raíz	0.356	0.001	0.632	0.158	0.573	0.037	0.058
Daños por <i>P. capsici</i>	AUDPS	0.438	0.000	0.010	0.547	0.045	0.001	0.016

Los tratamientos de biochar (B), nanotubos de carbono (NTC), *T. harzianum*-biochar (T-B) y control (C) inoculados con cepa CH-11, así como el tratamiento de *T. harzianum* (T) con inóculo nativo, tuvieron menor altura que el resto de los tratamientos. No obstante, de los tratamientos recién mencionados, únicamente T-B presentó una diferencia significativa con los tratamientos restantes (Fig. 3). Los únicos tratamientos inoculados con CH-11 que presentaron una ventaja en términos de altura respecto al más afectado (T-B) fueron T y *T. harzianum*-nanotubos de carbono (T-NTC). No hubo diferencias significativas entre ningún tratamiento control.

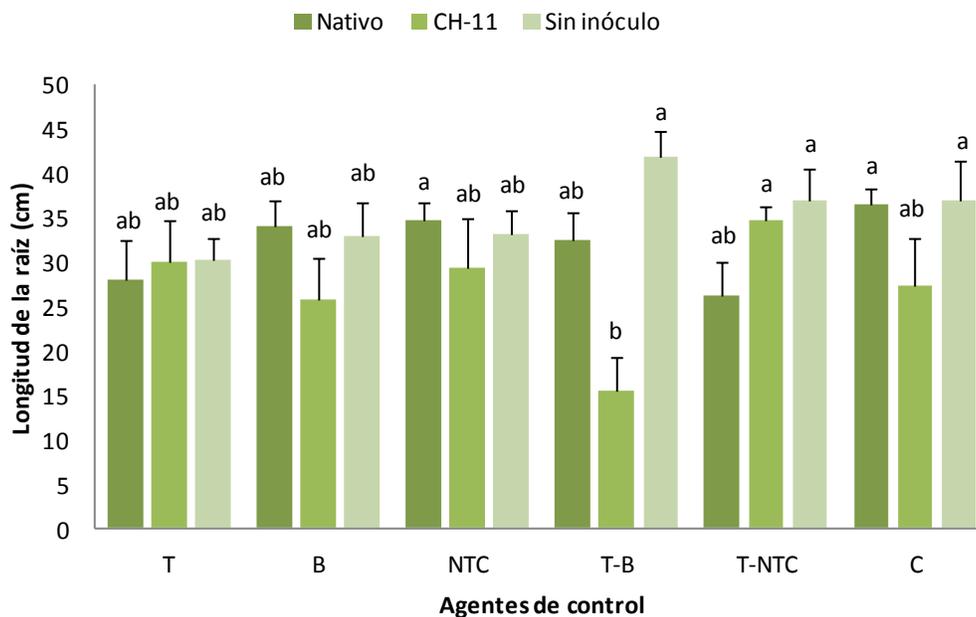
Al realizar el análisis mediante la prueba de Tukey, se encontraron dos grupos homogéneos para la longitud de raíz; el primero formado por los tratamientos NTC y C con inóculo nativo; T-B, T-NTC y C sin inóculo; y T-NTC con inóculo de CH-11, y el segundo por T-B con inóculo de la cepa CH-11. Las diferencias se presentaron únicamente entre estos dos grupos, sin tener ninguno de ellos diferencias con el resto de los tratamientos (Fig. 4).

En el caso de la biomasa radicular (Fig. 5) se encontraron dos grupos homogéneos: el primero representado por el tratamiento T-B con cepa CH-11, el segundo conformado por todos los controles a excepción del agente NTC, por los tratamientos T-NTC y NTC bajo cepa CH-11, y por el control absoluto bajo inóculo nativo. La variación de los datos, de acuerdo con el análisis

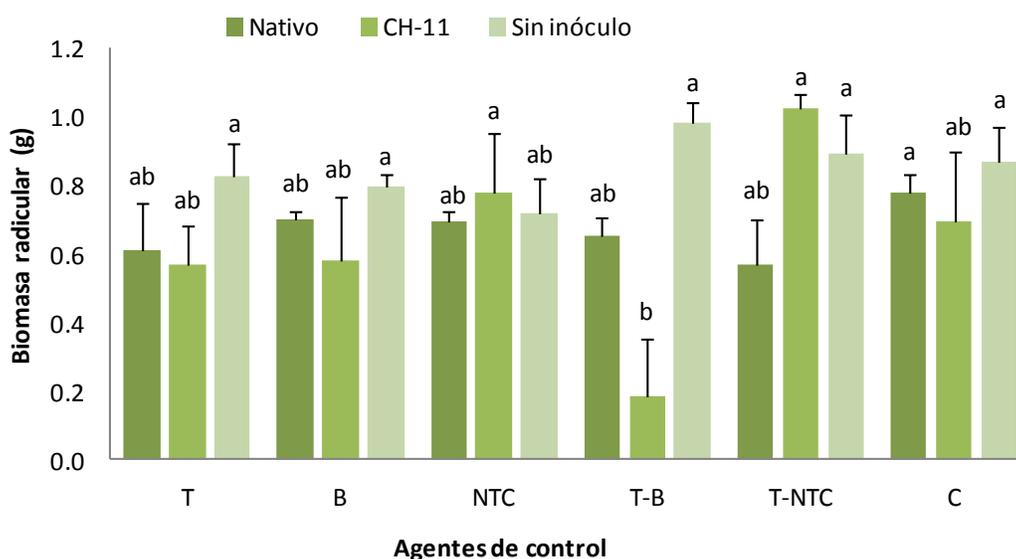
de varianza, fue explicada de igual forma por el tipo de inóculo y la interacción del mismo con las estructuras de carbono ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Altura promedio de plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono C= control.

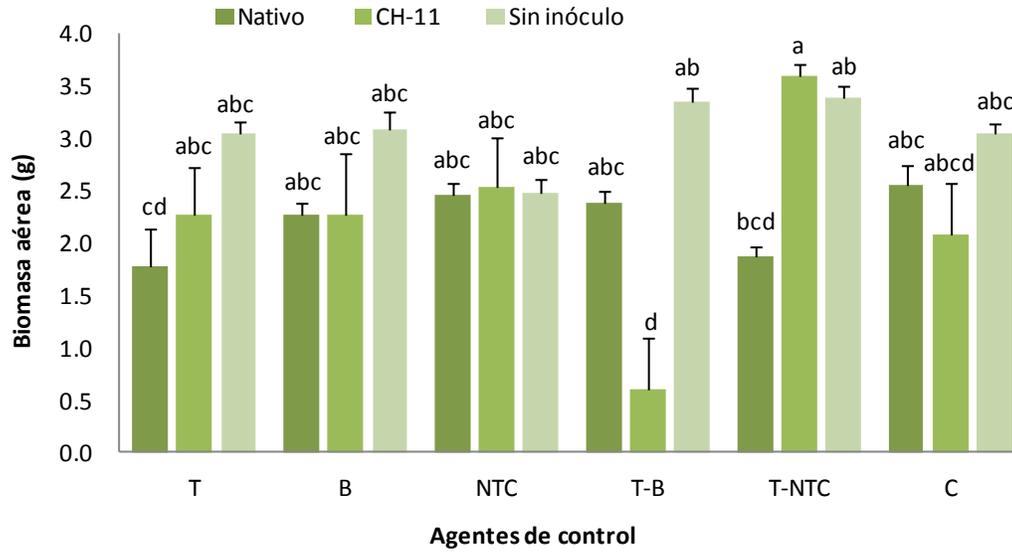


**Figura 4.** Longitud promedio de la raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, C= control



**Figura 5.** Biomasa promedio de la raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, C=control.

En cuanto a la biomasa aérea, casi todos los tratamientos (a excepción de T y T-NTC bajo inóculo nativo y el tratamiento control con cepa CH-11), presentaron diferencias significativas con respecto al tratamiento T-B con cepa CH-11 (Fig. 6). El tratamiento de T con inóculo nativo fue desfavorecido en comparación con los controles de T-B, T-NTC y T-NTC con cepa CH-11. El agente de control T-NTC tuvo un desempeño significativamente favorable con la cepa CH-11 comparado con su homólogo con inóculo nativo. Cabe mencionar que, excluyendo el caso de T-B y T-NTC, en lo que respecta a los agentes de control no se encontró ninguna diferencia significativa en cuanto al tipo de inóculo en el que estuvieron. Es decir, el tipo de inóculo fue un factor que afectó entre los distintos agentes de control, más no fue una diferencia dentro de los mismos. Esta observación se repite en las variables de altura y longitud de raíz, con la excepción de los agentes T-B, T-NTC y el control.



**Figura 6.** Biomasa aérea promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). T= *T. harzianum*, B= biochar, NTC= nanotubos de carbono, C= control.

## 5. DISCUSIÓN

Se pudo observar que el tipo de inóculo fue invariablemente el factor que tuvo mayor influencia directa sobre la variación de los datos. De la misma manera, en todas las variables la interacción de este factor con las estructuras de carbono probó ser un elemento determinante en la severidad de la enfermedad.

A pesar de que no hubo interacciones pareadas entre todos los factores, la interacción triple de estos fue significativa sobre las variables de altura, biomasa aérea y AUDPS ( $p < 0.05$ ). Esto refleja que la suma de estos factores fue sinérgica y determinó la variación de los datos.

El papel que jugó el tipo de inóculo fue muy claro. Las desventajas que tuvieron los tratamientos en variables de desempeño así como de daños por *P. capsici* se debieron a la presencia de la cepa CH-11. Es posible que la falta de efecto y la falta de síntomas de enfermedad en las plantas con inóculo nativo de *P. capsici* se debiera al manejo previo que recibió el suelo antes de ser usado en el experimento. El suelo de la parcela infestada fue muestreado con aleatoriedad a una profundidad correspondiente a la ubicación de *P. capsici* en la rizósfera. No obstante, debido al altísimo porcentaje de humedad que tuvo al ser colectado (en temporada de lluvias) el suelo tuvo que ser secado y aireado en el exterior, antes de que se tamizara, homogeneizara y almacenara. Es probable que la exposición al sol y la pérdida de humedad del suelo afectara las estructuras presentes de *P. capsici*, si bien no eliminándolas por completo, reduciendo considerablemente su capacidad de crecimiento e infección.

Etxeberria et al. (2011) reportaron que el tiempo necesario para inactivar el 100% de oosporas de *P. capsici* a una temperatura de 40°C es poco mayor a 8 días. La exposición del suelo en este experimento fue de 4-5 días con una temperatura ambiental aproximada de 35°C, lo que pudo haber inactivado una proporción considerable de estructuras infecciosas. Por lo que podemos atribuir la muerte de los dos individuos pertenecientes a los agentes de control T y T-NTC bajo inóculo nativo a la supervivencia de algunas oosporas en el suelo. Esto sin embargo, debe de ser considerado posiblemente como un efecto aleatorio, debido a que en términos de desempeño vegetal y daños por *P. capsici* estos tratamientos no presentaron ningún ISS posterior a la muerte de los primeros 2 individuos y no fueron significativamente afectados en desempeño vegetal en comparación a otros con inóculo nativo.

Las diferencias significativas entre tratamientos, de forma general, dependieron sobre todo de la mortandad de las plantas y por ende la supresión del crecimiento. Adicionalmente, no

se mostraron diferencias significativas entre tratamientos control (sin importar los agentes que estuvieran presentes). Si consideramos que la variación de los datos en general se centró sobre todo en los efectos de las estructuras de carbono y su interacción con otros factores, entonces podemos inferir que estas estructuras actuaron propiciando la infección por *P. capsici* o dotando a la planta de ventajas frente a la severidad de la enfermedad (directa o indirectamente). Este es, respectivamente, el caso de los tratamientos T-B y T-NTC inoculados con cepa CH-11.

No se presentaron muchas diferencias en las medidas de desempeño vegetal de los tratamientos, aún bajo condiciones donde el patógeno no está presente. No obstante, el desempeño vegetal puede ser evaluado en función de la *n* poblacional que presentó cada tratamiento al momento de la cosecha final. La *n* poblacional al final del experimento es un indicador de la susceptibilidad que los agentes de control (*T. harzianum*, biochar y NTC) confirieron a las plantas frente a *P. capsici*.

Si bien el tratamiento de biochar inoculado con cepa CH-11 tuvo afectaciones, la combinación de este agente con *T. harzianum* inclusive resultó perjudicial (con más daños que el control) bajo la presencia del patógeno. El aumento en el daño en presencia de este organismo podría deberse a condiciones desfavorables para la planta ocasionadas por el biochar, y/o por el gasto energético de la planta respecto a su interacción con el organismo benéfico. Se sabe que el establecimiento inicial de organismos como este hongo implica un gasto energético para la planta debido a los exudados que debe secretar la raíz, de la misma forma que ocurre con la presencia de otros habitantes del suelo (Nguyen, 2003). El gasto energético inicial de la planta, aunado a la ventaja que presentó *P. capsici* en este tratamiento, podrían haber facilitado la infección y desarrollo de la enfermedad. A pesar de que este gasto energético también puede ocurrir bajo la interacción de T-NTC, puede ser que el control del patógeno haya sido efectivo debido a que la compensación entre gasto energético y protección contra organismos patógenos es positiva.

El biochar probó ser un agente que favorece la infección por *P. capsici*, reflejándose esto en el porcentaje de infección un daño de la misma magnitud entre el agente sólo y el reflejado por T-B. El tratamiento donde sólo estaba presente *T. harzianum* mostró diferencias significativas respecto al más afectado (T-B). Esto sugiere que los efectos perjudiciales provienen principalmente de la presencia del biochar y de alguna forma fueron acrecentados con la presencia de *Trichoderma*, hipotéticamente -como se comentó- debido a los gastos energéticos en torno a la presencia de este hongo benéfico.

Respecto a los efectos negativos del biochar, se ha observado que en ciertas plantas su uso puede promover el crecimiento de hongos patógenos específicos. Como se mencionó en un inicio, la composición y origen del biochar (material, humedad, pH, temperatura y duración de la combustión) lo hacen más conducente hacia microorganismos específicos (Gravel *et al.* 2013). En el experimento de Gravel *et al.* (2013), la presencia de biochar de procedencia vegetal en plantas de pimiento, geranio y albahaca promovió la infección de *Pythium ultimum* en las raíces ( $p < 0.0001$ ). No obstante, las autoras mencionan que esto no ocurrió en otros cultivos, por lo que no se debe descartar al biochar como un agente de control efectivo, sino a evaluarlo de forma dependiente al cultivo y tipo de suelo en el que es aplicado. Desconocemos el origen y mecanismo por el que el biochar incentivó la enfermedad en las plantas de Chile, sin embargo (debido a la ausencia de efectos de fitotoxicidad en las pruebas de germinación, así como de desventajas de desempeño en los tratamientos control) suponemos que por características intrínsecas al material, este fue propenso a la colonización por *P. capsici*. Asimismo otros autores señalan que las enmiendas de biochar pueden tener un efecto en la proliferación de fitopatógenos a través de la estimulación de microorganismos originarios del suelo (Yedidia *et al.*, 1999; Atkinson *et al.*, 2010; Elad *et al.*, 2010).

A excepción de su efecto en conjunto con los NTC, *T. harzianum* no mostró los beneficios en desempeño vegetal y protección contra patógenos que se han reportado (Yedidia *et al.*, 1999; Harman, 2001). Esto se vio reflejado no únicamente en los tratamientos con presencia de *P. capsici*, sino incluso en los tratamientos control. Creemos que el establecimiento de *T. harzianum* fue efectivo en presencia de los NTC, no obstante por motivos de tiempo y recursos esta suposición no pudo comprobarse. Al ver las diferencias casi nulas en la mayor parte de los tratamientos donde este hongo estaba presente, inferimos que su establecimiento pudo haberse afectado probablemente por condiciones independientes al tipo de inóculo. Schippers *et al.* (1987), señala que la proporción de componentes de arcilla en el suelo tiene una enorme influencia en el movimiento de agua, la disponibilidad de oxígeno, y por tanto sobre la matriz del suelo en la que los hongos crecen y se dispersan. Esto se confirma con los estudios de Stotzky y Rem (1967) que reportaron una reducción en la respiración de *Trichoderma viride* ocasionada por materiales arcillosos. Es probable que el suelo de Queréndaro, debido a su origen lacustre y su textura, presente condiciones poco favorables para el establecimiento de ciertos microorganismos, pero apropiadas para la saturación de agua y proliferación de organismos

patógenos como *P. capsici*. A pesar de que la inoculación se hizo inicialmente sobre un sustrato ideal (turba) puede que después del trasplante el crecimiento del organismo se viera limitado.

Además de no mostrar síntomas ni infección por *P. capsici*, el desempeño vegetal del tratamiento T-NTC con inóculo de cepa CH-11 fue, si acaso no sobresaliente, superior al tratamiento más afectado (T-B con cepa CH-11), en variables de altura y longitud de raíz. Si bien no en términos de biomasa, la presencia de *T. harzianum* y su interacción con los nanotubos de carbono, mostró ventajas relativas sobre el crecimiento longitudinal de las plantas de chile. Tanto *T. harzianum* como los NTC han sido reportados como promotores del crecimiento en solanáceas (Kleifeld y Chet, 1992; Windham *et al.*, 1986; Khodakovskaya *et al.*, 2012).

El mecanismo que produjo un efecto de protección en las plantas tratadas con T-NTC se desconoce, sin embargo hipotetizamos que a pesar de que el organismo de control biológico no tuviera el efecto esperado sobre *P. capsici*, su interacción con los NTC aumentó considerablemente su desempeño y efecto sobre el patógeno. Es reconocido que los NTC tienen un potencial de adsorción muy grande (Upadhyayula *et al.*, 2009) y uno de los mecanismos de control de *Trichoderma* es la producción de gliotoxinas que inhiben el crecimiento del patógeno e incluso la germinación de conidios, así como la secreción de enzimas que degradan las paredes celulares del mismo (Howell, 2003). Es probable que la retención de estos compuestos y la promoción del crecimiento de *T. harzianum* por los NTC en la rizósfera, generaran una barrera propicia para impedir el crecimiento de *P. capsici*.

En contraste con el biochar, los NTC tienen una proporción área:volumen (sa/vol) mucho mayor. Esta proporción, en la mayor parte de los materiales, aumenta conforme las partículas son más pequeñas, lo que provoca mayor adsorción de los átomos circundantes (Dinesh *et al.*, 2012). El biochar, a pesar de reportar una porosidad apta para el crecimiento microbiano, puede tener relaciones de menor magnitud tanto con los compuestos como con los organismos cercanos a la rizósfera. Esto basado en que conforme el tamaño de partícula aumenta, las interacciones con células vivas decrece (Shrestha *et al.*, 2013), lo que hace que los materiales reducidos a la nano escala exhiban propiedades muy diferentes que las que muestran en la micro escala. De cualquier forma se requieren más estudios que cubran el efecto de otros tipos de biochar (diferentes materiales de origen y condiciones de producción), así como de dosis menores.

Es importante señalar que las pruebas previas a aplicación de NTC en campo son necesarias debido a la incertidumbre que existe alrededor del impacto que estos pueden tener sobre otros

seres vivos. Este riesgo disminuye significativamente si se considera que las aplicaciones con fines agrícolas se realizan en el suelo con dosis sumamente bajas (al nivel de una o dos decenas de  $\mu\text{g}$ ). Las pruebas de toxicidad de estas estructuras se reportan en dosis altas y a través de la inhalación de las mismas por mamíferos pequeños (Zhao y Liu, 2012). Chung *et al.* (2011) observaron que por debajo de los  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , los nanotubos de carbono no representan daño alguno sobre la biomasa microbiana del suelo. La composición de la microbiología edáfica, la textura del suelo, la pureza de los nanotubos, su forma de aplicación y sobre todo su dosis, son elementos que se han mencionado como determinantes en los impactos sobre los microorganismos del suelo (Shrestha *et al.*, 2013). Queda mucha investigación por hacerse en esta área de la biotecnología agrícola, y por tanto hay que tomar las medidas pertinentes antes de formular recomendaciones respecto a su uso. Algunos expertos mencionan que, tras conocer las especies vegetales donde esta tecnología es segura de aplicar (Khot *et al.*, 2012) se podría evitar la fitotoxicidad a otras especies al crecer las plántulas en invernadero para su posterior trasplante en campo. De igual forma, la aplicación de esta tecnología sería más apropiada en producción de invernadero o vivero, una vez establecidas las dosis límite para la especie vegetal a cultivar.

## 6. CONCLUSIONES

La promoción del crecimiento vegetal y el éxito como vehículo de inoculación que reporta la literatura respecto al biochar no se pudieron corroborar mediante los resultados de este experimento. Este no fue el caso para los NTC, los cuales a pesar de no mostrar ventajas de forma individual, tuvieron un desempeño excepcional en el control de *P. capsici* a través de la interacción con *T. harzianum*, impidiendo así el desarrollo de la enfermedad en la planta. No se mostró un desempeño vegetal sobresaliente en ningún tratamiento, a excepción del T-NTC en variables de altura y longitud de raíz, donde su ventaja sobre el patógeno le permitió diferenciarse de los tratamientos más afectados.

Este trabajo es una aportación al campo de estudio del control alternativo de plagas y de la biotecnología, mas -debido al estado de conocimiento acerca de los nanomateriales de carbono en general- es necesario que sea visto una como investigación preliminar.

## 7. REFLEXIONES FINALES Y RECOMENDACIONES

Sin importar el éxito que pueda tener una alternativa exitosa en el control de patógenos como *P. capsici*, las medidas a tomar en torno al agro ecosistema deben ser integrales. La sustitución de métodos de control de plagas sin generar cambios en el manejo del agroecosistema (ej. rotación y asociación de cultivos, labranza, riego controlado, promoción de enemigos naturales, enmiendas orgánicas, solarización, etc.), el monitoreo de plagas efectivo y un manejo integral (MIP) es un ángulo de acción que, si bien resuelve temporalmente la problemática, no necesariamente será efectivo a largo plazo.

Hay aspectos del manejo agrícola en Queréndaro que bien pueden estar jugando un papel preponderante en la permanencia de las afectaciones por *P. capsici*. De inicio, el origen lacustre de la zona agrícola y la gran proporción de arcillas en los suelos de la región, hacen que el manejo de patógenos de suelo (en especial hongos) sea muy difícil. Si a esto agregamos que la gran mayoría de los productores de Chile realizan riego por gravedad, el cual muchas veces es excesivo, encontramos que las condiciones para que el patógeno prospere son óptimas. Desgraciadamente no pudimos corroborar la virulencia del inóculo nativo de *P. capsici* en comparación con el de laboratorio, por lo que la protección que tanto el material vegetal como los agentes de control puedan haber ejercido sobre ella queda pendiente para experimentos posteriores.

## 8. REFERENCIAS

- Ahmed, A. S., Sánchez, C. P., y Candela, M. E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 817–824.
- Altieri, M. A. (1995). *Agroecology: The science of sustainable agriculture*. Westview Press, Boulder, CO.
- Altieri, M. a. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 74(1-3), 19–31. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Atkinson, C. J., Fitzgerald, J. D., y Hipps, N. a. (2010). Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant and Soil*, 337(1-2), 1–18. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0464-5>
- Barocio, C. (2015). *Estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas (Trichoderma sp), y hongos entomopatógenos (Metarhizium anisopliae, y Beauveria bassiana)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Beck, D. P. (1991). Suitability of charcoal amended mineral soil as a carrier for *Rhizobium* inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 41–44.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J. L., Harris, E., Robinson, B., y Sizmur, T. (2011). A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental Pollution*, 159(12), 3269–82. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.023>
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. In I. Chet (Ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control* (John Wiley, pp. 137–160). New York.
- Chung, H., Son, Y., Yoon, T. K., Kim, S., y Kim, W. (2011). The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 569–575.
- Cifuentes, E., Trasande, L., Ramírez, M., y Landrigan, P. J. (2010). A qualitative analysis of environmental policy and Intersecretarial Control del children's health in Mexico. *Environmental Health*, 9:14.
- Corbet, P. S. (1986). Pest resistance to pesticides. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 15(1), 75–76. [http://doi.org/10.1016/0167-8809\(86\)90116-7](http://doi.org/10.1016/0167-8809(86)90116-7)

- Corradini, E., de Moura, M. R., y Mattoso, L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters*, 4(8), 509–515.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M., y Harman, G. E. (1993). Endo-chitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology*, 83, 308–313.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., y Hamza, S. (2012). Geoderma Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, 173-174, 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.12.018>
- Du, J., Wang, S., You, H., y Zhao, X. (2013). Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 451–62. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2013.05.007>
- Elad, Y., David, D. R., Harel, Y. M., Borenshtein, M., Kalifa, H. Ben, Silber, A., y Graber, E. R. (2010). Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology*, 100(9), 913–21. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0913>
- Elmer, W. H. (2012). Influence of Biochar and Earthworms on Plant Growth , Fusarium Crown and Root Rot , and Mycorrhizal Colonization of Asparagus. In A. Casas y K. Coronado (Eds.), *XII International Asparagus Symposium* (pp. 263–270).
- Erwin, C. D., y Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS-Press.
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, P., Sid-Ahmed, A., Requena, M. E., y Candela, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología. Universidad de Murcia, España*, 26(35-45).
- FAO, O. de las N. U. para la A. y la A. (2006). Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de plaguicidas.
- Gayosso, E. M. (2010). *Búsqueda de control biológico de Phytophthora capsici en Chile mediante alta diversidad microbiana, considerando al patosistema como sistema adaptativo complejo*. Colegio de Postgraduados.
- Gevao, B., Semple, K. T., y Jones, K. C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, 108, 3–14.
- Gevens, A. J., Donahoo, R. S., Lamour, K. H., y Hausbeck, M. K. (2008). A detached cucumber fruit method to screen for resistance to *Phytophthora capsici* and effect of fruit age on susceptibility to infection. *Plant Disease*, 90, 1276– 1282.

- Ghormade, V., Deshpande, M. V., y Paknikar, K. M. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*, 29(6), 792–803. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.007>
- Gravel, V., Dorais, M., y Ménard, C. (2013). Organic potted plants amended with biochar : its effect on growth and Pythium colonization. *Canadian Journal of Plant Science*, 93, 1217–1227. <http://doi.org/10.4141/CJPS2013-315>
- Guan, H., Chi, D., Yu, J., y Li, H. (2010). Dynamics of residues from a novel nano- imidacloprid formulation in soyabean fields. *Crop Protection*, 29, 942–946.
- Gurr, G., Wratten, S. D., y Wratten, S. (2000). *Biological Control: Measures of Success*. (G. Geoff y W. Steve, Eds.). Springer Science y Business Media.
- Harman, G. E. (2001). Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. In *Int. Sympos. Biol. Control Plant Dis. New Century-Mode Action Application Technol* (pp. 4–14).
- Hausbeck, M. K., y Lamour, K. H. (2004). Phytophthora capsici on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88, 1292–1303.
- Heffer, V., Powelson, M. L., y Johnson, K. B. (2012). Oomycetes. The Plant Health Instructor.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases : *Plant Disease*, 87(1), 4–10.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D., y Lumsden, R. D. (1993). Antibiotic production by strains of Gliocladium virens and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science Technology*, 3, 435–441.
- Hu, L., Cao, L., y Zhang, R. (2014). Bacterial and fungal taxon changes in soil microbial community composition induced by short-term biochar amendment in red oxidized loam soil. *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, 30(3), 1085–92. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1528-5>
- Jha, M. N., y Prasad, A. N. (2006). Efficacy of new inexpensive cyanobacterial biofertilizer including its shelf-life. *World J Microbiol Biotechnol*, 22, 73–9.
- Jimenez, S. (2012, August 5). Entre lo ancestral y la modernidad, los productores de chile de Queréndaro. *Cambio de Michoacán*. Morelia, Michoacán. Retrieved from <http://www.cambiodemichoacan.com.mx/vernota.php?id=179707>
- Jin, L., Son, Y., Deforest, J. L., Jin, Y., Kim, W., y Chung, H. (2014). Single-walled carbon nanotubes alter soil microbial community composition. *Science of the Total Environment*, 466-467, 533–538. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.035>

- Karam, M. Á., Ramírez, G., Bustamante, L. P., y Galván, J. M. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia Ergo Sum*, 11, 246–254.
- Kasel, D., Bradford, S. a, Simunek, J., Pütz, T., Vereecken, H., y Klumpp, E. (2013). Limited transport of functionalized multi-walled carbon nanotubes in two natural soils. *Environmental Pollution*, 180, 152–8. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.031>
- Khodadad, C. L. M., Zimmerman, A. R., Green, S. J., Uthandi, S., y Foster, J. S. (2011). Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(2), 385–392. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.005>
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., y Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10), 3221–3227.
- Khodakovskaya, M. V, Silva, K. De, Biris, A. S., Dervishi, E., y Villagarcia, H. (2012). Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells. *ACS Nano*, 6(3), 2128–2135.
- Khot, L. R., Sankaran, S., Mari, J., Ehsani, R., y Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection : A review. *Crop Protection*, 35, 64–70. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>
- Kleifeld, O., y Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*- interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, 144, 267–272.
- Lam, C.-W., James, J. T., McCluskey, R., y Hunter, R. (2004). Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicological Sciences*, 77, 126–134. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfg243>
- Lamour, K. H., y Hausbeck, M. K. (2000). Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology*, 90, 396–400.
- Lamour, K., y Kamoun, S. (2009). *Phytophthora capsici*: Sex, selection and the wealth of variation. In *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, interactions and Research Tools*. (p. 582).
- Lehmann, J., y Joseph, S. (2009). Biochar for environmental management: an introduction. In J. Lehmann y S. Joseph (Eds.), *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. (pp. 1–12). London: Earthscan.
- Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. a., Hockaday, W. C., y Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>

- Li, Z., Long, W., Zheng, J., y Lei, J. (2007). Isolation and Identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong Province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation. *Frontiers of Agriculture in China*, 1, 377–381.
- López, C., y González, P. A. (2001). Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19, 49– 56.
- López, P., y Golovátaya, E. (2004, April). Método para reducir la toxicidad de los nanotubos de carbono. *MUNDO NANO. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 10–11. Retrieved from file:///C:/Users/ClaraM/Downloads/26621-26610-1-PB.pdf
- Mejía, Z.-. (1999). Management Alternatives for Plant Diseases. *Terra*, 17(3), 201–207.
- Mohamed, M. M., y Khairou, K. S. (2011). Preparation and characterization of nano-silver/mesoporous titania photocatalysts for herbicide degradation. *Microporous Mesoporous Materials*, 142, 130–138.
- Mulcahy, D. N., Mulcahy, D. L., y Dietz, D. (2013). Biochar soil amendment increases tomato seedling resistance to drought in sandy soils. *Journal of Arid Environments*, 88, 222–225. <http://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.07.012>
- Namesny, A. (2006). Pimientos. In *Compendios de Horticultura 16* (2da Ed. De, p. 167). Barcelona, España.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., y Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372–386.
- Nawrocka, J., y Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67(2), 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.005>
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23, 375–396.
- Ogawa, M., y Yamabe, Y. (1986). Effects of Charcoal on VA Mycorrhiza and Nodule Formations of Soy Bean, Studies on Nodule Formation and Nitrogen Fixation in Legume Crops,. *Bulletin of Green Energy Program Group II*, 8, 108– 134.
- Ortega-Ceseña, J., Espinosa-Torres, F., y López-Carrillo, L. (1994). El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública Mexicana*, 36, 624–632.

- Ortíz, I., Avila-chávez, M. A., y Torres, L. G. (2014). Plaguicidas en México : usos , riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Y Algal*, 4(1), 26–46.
- Parra, G., y Ristaino, J. B. (2001). Resistance to Mefenoxam and Metalaxyl Among Field Isolates of *Phytophthora capsici* Causing Phytophthora Blight of Bell Pepper. *The American Phytopathological Society*, 85(10), 1069–1075.
- Pérez, M. L., Duran, O. L. J., Ramírez, M. R., Sánchez, P. J. R., y Olalde, P. V. (2004). Sensibilidad in vitro de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas. *Primera Convención Mundial Del Chile, León, Gto.*, 144–150.
- Pimentel, D., y Hall, C. (1995). Amounts of Pesticides Reaching Target Pests : Environmental Impacts and Ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8(1), 17–29.
- Popov, V. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 43(3), 61–102. <http://doi.org/10.1016/j.mser.2003.10.001>
- Quesada-Ocampo, L. M., Fulbright, D. W., y Hausbeck, M. K. (2009). Susceptibility of Fraser fir to *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 93, 135–141.
- Quilliam, R. S., Glanville, H. C., Wade, S. C., y Jones, D. L. (2013). Life in the “charosphere” – Does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms? *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 287–293. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.06.004>
- Restrepo, I. (1988). Los plaguicidas en México. Naturaleza Muerta. *Revista Ciencias, UNAM*, 40–50.
- Ristaino, J. B., Carolina, N., y Johnston, S. A. (1999). Ecologically Based Approaches to Management of *Phytophthora* Blight on Bell Pepper. *Plant Disease*, 83(12), 1081–1089.
- Rocha, C., Pavía, F., Patricia, S., Ávila, O., Obregón, C., Rocha, A. C., ... Biomédicas, I. D. C. (2012). Mecanismos de Defensa del Chile en el Pato sistema *Capsicum annum* - *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 49–65.
- Romero, F. (2004). *Manejo integrado de plagas: las bases, los conceptos, su mercantilización* (Universida). Tezcoco, México.
- Rosset, P. M. (1997). La crisis de la agricultura convencional , la sustitución de insumos y el enfoque agroecológico. *CLADES, II*(Agroecología y desarrollo).
- Saleh, N. B., Pfefferle, L. D., y Elimelech, M. (2008). Aggregation kinetics of multiwalled carbon nanotubes in aquatic systems: measurements and environmental implications. *Environmental Science y Technology*, 42, 7963–7969.

- Santoyo, A. J., y Martínez, C. O. (2013). *Nutrición orgánica y mineral para la producción de chiles picosos en el sur de Sinaloa*. Retrieved from <http://www.fps.org.mx/divulgacion/attachments/article/867/Nutricion Organica y Mineral para la produccion de chiles picosos en el sur de Sinaloa.pdf>
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., ... Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, *60*, 4364–4370.
- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., Torre-roche, R. De, Hamdi, H., White, J. C., y Dimkpa, C. (2015). *Nanoscale Micronutrients Suppress Disease*. Washington, D. C.
- Sharma, H. C. (2012). Conventional and biotechnological approaches for pest management: potential and limitations. *Environmental Safety of Biotech and Conventional IPM Technologies*, 3–25.
- Shrestha, B., Acosta-Martinez, V., Cox, S. B., Green, M. J., Li, S., y Cañas-Carrell, J. E. (2013). An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on soil microbial community structure and functioning. *Journal of Hazardous Materials*, *261*(2013), 188–97. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.031>
- SIMKO, y Piepho, H. (2012). AUDPC and AUDPS: What is the difference?, Poster Session: Analytical and Theoretical Plant Pathology. In *APS Annual meeting, Communicating science*.
- Sivan, A., Elad, Y., y Chet, I. (1984). Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Phythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, *74*(4), 498–501.
- Steinbeiss, S., Gleixner, G., y Antonietti, M. (2009). Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*(6), 1301–1310. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.016>
- Steiner, C., Teixeira, W. G., Lehmann, J., Nehls, T., Macêdo, J. L. V., Blum, W. E. H., y Zech, W. (2007). Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. *Plant and Soil*, *291*(1-2), 275–290. <http://doi.org/10.1007/s11104-007-9193-9>
- Takagi, K., y Yoshida, Y. (2003). In situ bioremediation of herbicides simazine-polluted soils in a golf course using degrading bacteria-enriched charcoal. In *Proceedings of the International Workshop on Material Circulation through Agro Ecosystems in East Asia and Assessment of its Environmental Impact* (pp. 58–60). Tsukuba, Japan.
- Tsai, W.-T. (2010). Current Status and Regulatory Aspects of Pesticides Considered to be Persistent Organic Pollutants (POPs) in Taiwan. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, *7*, 6615–3627.

- Upadhyayula, V. K. K., Deng, S., Mitchell, M. C., y Smith, G. B. (2009). Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: a review. *The Science of the Total Environment*, 408(1), 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.027>
- Valadés, J. (2013). *I Diagnóstico de la región del valle de Queréndaro, Horticultores del valle de Queréndaro*. Morelia, Michoacán.
- Van Bruggen, A. H. C., y Semenov, A. M. (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, 15, 13–24.
- Vega, O. F. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62, 96–100.
- Wells, H. D., Bell, D. K., y Jaworski, C. A. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 62, 442–447.
- West, P., Appiah, A., y Gow, N. (2003). Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 99–113.
- Widmer, T. (2010). *Phytophthora kernoviae* oospore maturity, germination and infection. *Fungal Biology*, 114, 661–668.
- Windham, M. L., Elad, Y., y Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76, 518–521.
- Windham, M. T., Elad, Y., y Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76, 518–521.
- Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., ... Lorito, M. (1999). Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12, 419–429.
- Yedidia, I., Benhamou, N., y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1061–1070.
- Zhang, C., Sui, J., Li, J., Tang, Y., y Cai, W. (2012). Efficient removal of heavy metal ions by thiol-functionalized superparamagnetic carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*, 210, 45–52. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.062>
- Zhao, X., y Liu, R. (2012). Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environment International*, 40, 244–255. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2011.12.003>
- Zuluaga, J. I., y Mesa, N. C. (2000). *Manual de manejo integrado de plagas agrícolas* (Coordinado). Cali, Colombia.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1. Medio de cultivo selectivo para *Phytophthora sp.*

Para 1L de medio de cultivo:

- I. Disolver 17g de agar de harina de maíz (AHM) en un L de agua destilada. (primero el AHM y después el agua)
- II. Esterilizar a 130°C y 15lb de presión por 20 min
- III. Enfriar el medio a 49°C
- IV. Agregar los siguientes antibióticos por cada litro de medio de cultivo:  
Pentacloronitrobenzeno (PCNB): 0.10 g/L  
Natamicina (Delvolid): 0.02 g/L  
Ampicilina: 0.27 g/L  
Rifampicina: 0.01 g/L  
Hymexazol: 0.075 g/L

V. Vaciar el medio de cultivo en las cajas petri dentro de la campana de flujo laminar

Nota: se debe considerar el volumen de los antibióticos al momento de agregar el agua destilada al medio de cultivo, por ejemplo, si se prepara 1L de medio, se agregan solamente 990ml de agua destilada (10ml de antibióticos). Cubrir la rifampicina y el PCNB con papel durante el descongelamiento por la fotosensibilidad. Almacenar las cajas petri envueltas en aluminio.

### 9.2. Anexo 2. Bioensayo para la detección de *P. capsici* en suelo

- I. Se pesan 10g de suelo y se colocan en 20 ml de agua destilada. Se toman 5 hojas de azalea (*Azaleastrum sp.*), se lavan y enjuagan 10 segundos con alcohol al 90% y se dejan por 48 hr en la mezcla de suelo.
- II. Posteriormente se enjuagan las hojas de azalea son enjuagadas con agua destilada estéril y se siembran en una caja petri con medio de cultivo selectivo NARPH.
- III. Se incuban en las cajas petri 24°C en oscuridad por dos o tres días y se comprueba la presencia del patógeno observando las cajas con micelio bajo el microscopio óptico.

### 9.3. Anexo 3. Medio de cultivo V8

(Guo et al, 1993) modificado, para 1L de medio de cultivo

- I. Disolver 17g de agar harina de maíz (AHM) y 0.4g de carbonato de calcio en 800ml de agua destilada. Agregar 200ml de jugo de vegetales V8 Campbell Esterilizar en el autoclave a 130°C y 15lb de presión por veinte minutos
- II. Vaciar en cajas de petri dentro de la campana de flujo laminar

#### **9.4. Anexo 4. Medición de la capacidad de campo de un sustrato**

Para calcular la capacidad de campo se pesó una cantidad conocida de sustrato en una balanza analítica y se secó en un horno para muestras vegetales a 80°C hasta alcanzar peso constante, este fue registrado como el peso seco del sustrato. Posteriormente el sustrato fue colocado en un vaso de precipitado y se le agregó agua con micropipeta hasta alcanzar el punto de saturación. Esta muestra fue pesada en balanza analítica. Se calculó el porcentaje de agua a partir de la diferencia de peso entre la muestra de sustrato saturado y sustrato seco.

% de agua:  $[(\text{sustrato saturado} - \text{sustrato seco}) * 100] / \text{sustrato saturado}$

Se contó con 3 repeticiones. El porcentaje de agua promedio fue usado para conocer el peso que debe alcanzar cierta cantidad de sustrato (g) para estar a 100% de capacidad de campo.

1kg de suelo a 100% de CC=  $(\% \text{ de agua} * 100) + 1000\text{g}$